

**PREPARASI SEDIAAN NANOPARTIKEL KLINDAMISIN HCl-KITOSAN
DAN UJI AKTIVITASNYA TERHADAP BAKTERI
*Propionibacterium acnes***

NASKAH PUBLIKASI



Oleh:

DESY RATNASARI

NIM. I22111023

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK**

2016

NASKAH PUBLIKASI

**PREPARASI SEDIAAN NANOPARTIKEL KLINDAMISINHCI-KITOSAN
DAN UJI AKTIVITASNYA TERHADAP BAKTERI *Propionibacterium
acnes***

Oleh:
DESY RATNASARI
NIM: I22111023

Telah Dipertahankan Dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura
Tanggal : 29 Desember 2015

Disetujui,

Pembimbing Utama



Wintari Taurina, M.Sc., Apt.

NIP. 198304212008012007

Penguji Pertama



Andhi Fahrurroji, M.Sc., Apt

NIP.198408192008121003

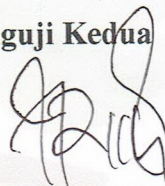
Pembimbing Pendamping



Hafrizal Riza M.Farm., Apt.

NIP. 198304272008121005

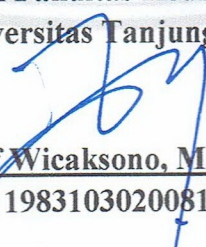
Penguji Kedua



Rafika Sari, M. Farm., Apt.

NIP. 198401162008012002

Mengetahui,
**Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura**



dr. Arif Wicaksono, M. Biomed
NIP. 198310302008121002

Lulus tanggal : 29 Desember 2015
No. SK Dekan FK Untan : 5974 / UN. 9 / DT / 2015
Tanggal : 29 Desember 2015

**PREPARASI SEDIAAN NANOPARTIKEL KLINDAMISIN HCl-
KITOSAN DAN UJI AKTIVITASNYA TERHADAP BAKTERI
*Propionibacterium acnes***

Desy Ratnasari¹, Wintari Taurina², Hafrizal Riza³
¹²³ **Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura,
Pontianak**
deesytratnasari@gmail.com

ABSTRAK

Jerawat (*Acne vulgaris*) merupakan penyakit kulit yang umumnya melibatkan peradangan kelenjar polisebasea. *Propionibacterium acnes*, bakteri anaerob yang terdapat dalam kelenjar sebaceous, merupakan penyebab utama jerawat. Klindamisin merupakan antibiotik yang banyak digunakan untuk mengobati jerawat secara topikal karena memiliki efek anti-mikroba dan anti-inflamasi. Akan tetapi dari berbagai formulasi klindamisin, penyerapan dikulit bervariasi dari 0,7 sampai 12,9% dari dosis yang diterapkan selama 24 jam. Penelitian ini bertujuan untuk memformulasikan antibiotik klindamisin menjadi sediaan nanopartikel klindamisin HCl-kitosan agar penyerapan dikulit lebih baik dan untuk menguji aktivitasnya terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Preparasi nanopartikel klindamisin HCl-kitosan dibuat dengan metode gelasi ionik menggunakan polimer kitosan (0,1%, 0,2% dan 0,3%) dengan penaut silang natrium tripolifosfat (0,1%). Nanopartikel klindamisin HCl-kitosan dievaluasi karakteristiknya yang meliputi distribusi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial, morfologi partikel dan efisiensi penjerapan. Selanjutnya nanopartikel diujikan aktivitasnya terhadap bakteri *P.acnes* dengan metode *disc diffusion* (tes Kirby-Bauer). Berdasarkan hasil karakterisasi menunjukkan bahwa nanopartikel klindamisin HCl-kitosan memiliki nilai rata-rata ukuran partikel 209,5nm, nilai indeks polidispersitas 0,271, nilai zeta potensialnya +50,5mV, morfologi partikelnya tidak beraturan dan nilai efisiensi penjerapan sebesar 64,413%.

Kata Kunci: *Klindamisin, Nanopartikel Klindamisin HCl-Kitosan, Gelasi Ionik, Propionibacterium acnes, Jerawat*

**PREPARATION OF CLINDAMYCIN HCl-CHITOSAN
NANOPARTICLES AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST
*Propionibacterium acnes***

Desy Ratnasari¹, Wintari Taurina², Hafrizal Riza³

**¹²³ Pharmacy Study Program, Faculty of Medicine, Tanjungpura University,
Pontianak
deesyrtatnasari@gmail.com**

ABSTRACT

Acne (*Acne vulgaris*) was a skin disease that caused inflammation in pilosebaceous gland. *Propionibacterium acnes* an anaerobic bacteria that lived in sebaceous gland, was a major caused of acne. Clindamycin was an antibiotic that widely used to treat acne topically because it has effect of anti-microbial and anti-inflammatory. But the various of formulation clindamycin, absorption in the skin varies from 0.7 to 12.9% of dose applied for 24 hours. This research determined to formulated clindamycin antibiotics into a dosage of clindamycin HCl-chitosan nanoparticles in order to better skin absorption and to tested the activity against *Propionibacterium acnes* bacteria. Preparation of clindamycin HCl-chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method using chitosan polymer (0.1%, 0.2% dan 0.3%) with cross-linker sodium tripolyphosphate (0.1%). Clindamycin HCl-chitosan nanoparticle characterization was evaluated include particle size distribution, index polydispersity, zeta potential, particle morphology and entrapment efficiency. After that, nanoparticles was tested it activity against *Propionibacterium acnes* bacteria by disc diffusion method. Based on characterization results indicated that clindamycin HCl-chitosan nanoparticles have average value of 209.5 nm, index polydispersity value of 0.271, the zeta potential value of +50.5 mV, the morphology of the particles is irregular and entrapment efficiency value of 64,413%.

Keywords: *Acnes vulgaris, Clindamycin, Clindamycin HCl-Chitosan Nanoparticles, Ionic Gelation, Propionibacterium acnes*

PENDAHULUAN

Propionibacterium acnes adalah organisme anaerobik yang terdapat didalam kelenjar *sebaceous* yang berkontribusi pada patofisiologi jerawat dalam beberapa cara. *P. acnes* menstimulasi inflamasi melalui produksi mediator-mediator proinflamasi yang berdifusi melalui dinding folikel⁽¹⁾.

Klindamisin banyak digunakan topikal pada acne berkat efek menghambatnya terhadap *Propionibacterium acnes* ⁽²⁾. Dilaporkan dari berbagai formulasi dari klindamisin, penyerapan perkutan bervariasi dari 0,7 sampai 12,9% dari dosis yang diterapkan selama 24 jam ⁽³⁾. Suatu obat diinginkan penyerapan yang maksimal pada sistem penghantaran.

Dasar pertimbangan pada pengembangan teknologi untuk terapi farmasetis terdiri dari tiga faktor utama yaitu menciptakan sistem yang efektif (*effectiveness*), menekan efek bahaya pada sistem jika diaplikasikan (*safety*), dan membuat agar sistem dapat diterima dengan baik oleh pasien (*acceptability*).

Salah satu teknologi penghantaran obat yang banyak dikembangkan adalah teknologi nanopartikel. Nanopartikel mempunyai berbagai keunggulan yang digunakan antara lain dapat meningkatkan kelarutan senyawa, mengurangi dosis pengobatan dan meningkatkan absorpsi, meningkatkan stabilitas obat,

memungkinkan untuk memasukkan obat lipofilik dan hidrofilik serta peningkatan efikasi obat⁽⁴⁾.

Penelitian ini bertujuan untuk memformulasikan antibiotik klindamisin menjadi sediaan nanopartikel klindamisin-kitosan dan untuk menguji aktivitasnya terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

Preparasi nanopartikel klindamisin-kitosan dibuat dengan metode gelasi ionik menggunakan polimer kitosan (0,1%, 0,2% dan 0,3%) dengan penaut silang natrium tripolifosfat (0,1%). Nanopartikel klindamisin-kitosan dievaluasi karakteristiknya yang meliputi distribusi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial, morfologi partikel dan efisiensi penyerapan. Selanjutnya nanopartikel diujikan aktivitasnya terhadap bakteri *P.acnes* dengan metode *disc diffusion* (tes Kirby-Bauer).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Scanning Electron Microscopy (SEM), *Zetasizer*, spektrofotometer UV-Vis, *Freeze dry*, *thermostat*, *magnetic stirer*, *Laminar Airflow Cabinet* (HL 36Ae[®]), oven (*memmert*[®]), autoklaf (HL 36Ae), lemari pendingin (LG), timbangan digital (Precisa Tipe XB 4200C[®]), sentrifuge (*Tenaco*[®]), pH meter (Soil Tester SDT-60 SDT-300), corong kaca (*Iwaki Pyrex*[®]), labu ukur (*Iwaki Pyrex*[®]), gelas ukur (*Iwaki Pyrex*[®]), Erlenmeyer (*Iwaki Pyrex*[®]), Beaker glass

(*Iwaki Pyrex*[®]), tabung reaksi (*Iwaki Pyrex*[®]), mikropipet (*Rainin E1019705K*).

Bahan

Antibiotik Klindamisin, Kitosan, Na-TPP, Media Agar Darah (*Blood Agar*), Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA), Aquadest, Dapar Asetat, aluminium foil, kertas saring Whatman no. 1, larutan Standar Mc. Farland no. 0,5 (Merck), larutan natrium klorida (NaCl) 0,9% (Merck), Metilen Klorida, Indikator Bromocresol Green, *Propionibacterium acnes*

Tempat dan Waktu

Laboratorium Teknologi Fakultas Kedokteran Program Studi Farmasi Universitas Tanjungpura Pontianak, Laboratorium Biologi Farmasi, Laboratorium Analisis Farmasi, Laboratorium Teknologi Farmasi ITB, Laboratorium Teknologi Farmasi UII dan Unit Laboratorium Kesehatan (ULK) Pontianak.

Pembuatan Larutan Kitosan

Ditimbang 1 g kitosan dan dilarutkan dalam 100mL dapar asetat pH 5^(5,6).

Pembuatan Larutan Natrium Tripolifosfat

Natrium tripolifosfat sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 10 mL aquadest⁽⁷⁾.

Pembuatan Suspensi Nanopartikel Klindamisin - Kitosan

Klindamisin dilarutkan dalam aquadest. larutan natrium tripolifosfat ditambahkan kedalam

larutan klindamisin. Kemudian ditambahkan larutan kitosan pada temperatur kamar (25°C) diaduk dengan kecepatan 1500rpm selama 3jam. Selanjutnya nanopartikel di buat dengan metode *Freeze dry*⁽⁸⁾.

Berikut adalah formula yang digunakan untuk membuat suspensi nanopartikel Klindamisin-kitosan:

Tabel 1. Formula suspensi nanopartikel Klindamisin – Kitosan

Formula	Klindamisin (%)	Kitosan (%)	Na-TPP(%)
F1	1	0.1	0.1
F2	1	0.2	0.1
F3	1	0.3	0.1

Evaluasi Karakterisasi Nanopartikel

a. Penetapan Distribusi Ukuran Partikel dan Potensial Zeta

Nanopartikel klindamisin-kitosan diukur diameternya menggunakan alat *Particle Size Analyzer*. Kemudian nanopartikel diukur menggunakan alat *zetasizer*, maka akan diperoleh hasil distribusi ukuran partikel, indeks polidispersitas dan potensial zeta.

b. Efisiensi Penjerapan

Efisiensi penjerapan dilakukan dengan metode sentrifugasi. Serbuk nanopartikel klindamisin-kitosan disuspensikan dengan aquadest kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Supernatan dari larutan tersebut diambil dan diukur serapannya pada

spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimal klindamisin (412nm) dan dihitung persentase efisiensi penjerapannya ⁽⁹⁾.

b. Morfologi Nanopartikel

Morfologi nanopartikel diperiksa menggunakan *scanning electro microscopy* (SEM). Droplet suspensi nanopartikel diteteskan grid tembaga, setelah meresap dan kering kemudian dicoating dengan karbon, kemudian dianalisis menggunakan SEM ⁽⁵⁾.

Pengujian Aktivitas Antibakteri Klindamisin - Kitosan

Pengujian aktivitas antibakteri nanopartikel klindamisin-kitosan dilakukan dengan metode difusi cakram. Pada permukaan media Blood agar yang telah diinokulasikan bakteri *Propionibacterium acnes* diletakkan kertas cakram kemudian dipipet 20 μ L larutan uji nanopartikel klindamisin-kitosan dan diletakkan diatas kertas cakram. Setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam kemudian diukur diameter daerah hambatan (zona jernih) pertumbuhan di sekitar cakram. Kemudian dilakukan hal yang sama pada kontrol positif(klindamisin murni) dan kontrol negatif(aquadest dan kitosan-NaTPP). Percobaan ini direplikasi sebanyak tiga kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Pendahuluan

Pengamatan uji pendahuluan ini dilakukan terhadap ketiga formula nanopartikel dengan variasi

lamanya pengadukan yaitu 1 jam, 2 jam, dan 3 jam. Dari hasil pengamatan uji pendahuluan, dapat diketahui bahwa formula nanopartikel dengan waktu pengadukan selama 3 jam antara kitosan dan NaTPP memberikan hasil yang optimum. Dimana dari partikel melayang dan endapan yang terbentuk dari ketiga formula setelah pengamatan selama 7 hari. Pada pengamatan lamanya waktu pengadukan selama 1 dan 2 jam, adanya partikel melayang mulai terbentuk dari hari ke- 4 pengamatan dan mulai terbentuknya endapan pada hari ke- 6. Partikel melayang dan endapan yang terbentuk semakin bertambah hingga hari ke - 7 pengamatan. Terbentuknya endapan ini diperkirakan karena ukuran partikel yang terbentuk berukuran lebih besar dari ukuran nanometer. Sehingga gaya gravitasi partikel lebih besar dan terbentuknya endapan juga lebih mudah.

Formula nanopartikel yang diujikan masing-masing di *scale-up* sesuai kebutuhan. Setelah dibuat dalam bentuk suspensi, nanopartikel tersebut dibuat dalam bentuk serbuk dengan metode *freeze dry*. Metode ini digunakan untuk menghindari pemanasan zat aktif. Setiap formula yang di *freeze dry* diperoleh serbuk berwarna putih, dengan berat masing-masing serbuk yaitu 1,25 g (F1); 1,8 g (F2); 2,2 g (F3)

Karakterisasi Nanopartikel Klindamisin-Kitosan

Karakterisasi nanopartikel meliputi ukuran dan distribusi ukuran partikel, zeta potensial, efisiensi penjerapan, dan morfologi partikel.

Tabel 3. Hasil Uji Karakterisasi

Formula	Ukuran Partikel (nm)	Indeks Polidispers	Zeta Potensial (mV)	Efisiensi Penjerapan (%)	Morfologi
F1	205,9	0,271	+50,5	64,413	Tdk beraturan
F2	231	0,337	+48,9	65,41	-
F3	461,5	0,209	-	-	-

Keterangan: F1 = konsentrasi klindamisin 1%, kitosan 0,1% dan NaTPP 0,1%, F2 = konsentrasi klindamisin 1%, kitosan 0,2% dan NaTPP 0,1%, F3 = konsentrasi klindamisin 1%, kitosan 0,3% dan NaTPP 0,1%

Ukuran Partikel

Hasil *particle size analyzer* (PSA) F1 dengan konsentrasi larutan kitosan 0,1 % menunjukkan rerata ukuran partikel 205,9 nm. Hasil PSA F2 dengan konsentrasi larutan kitosan 0,2% menunjukkan rerata ukuran partikel 231nm. Hasil PSA F3 dengan konsentrasi larutan kitosan 0,3% menunjukkan rerata ukuran partikel 461,5 nm. Perbedaan ukuran partikel dalam masing-masing formula dapat disebabkan oleh adanya perbedaan konsentrasi

Indeks Polidispers

Distribusi ukuran partikel dinyatakan dalam indeks polidispersitas. Rentang indeks polidispersitas berada di antara 0 sampai dengan 1. Nilai indeks polidispersitas dengan nilai lebih dari 0,5 menunjukkan heterogenitas yang tinggi ⁽¹¹⁾. Indeks polidispersitas (IP) menggambarkan lebarnya distribusi ukuran partikel. Ukuran partikel yang sempit mengindikasikan keseragaman ukuran partikel yang homogen. Indeks polidispersitas

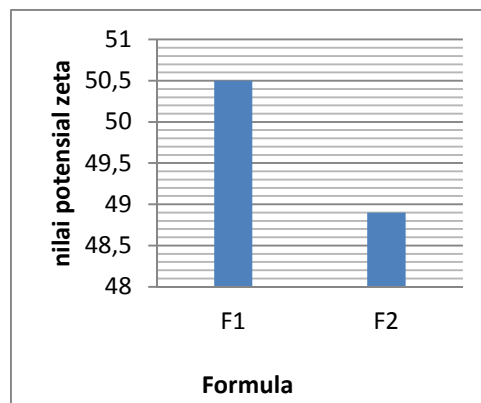
larutan kitosan yang dipakai pada setiap masing-masing formula. Menurut Gupta dan Kompella rentang ukuran nanopartikel yang baik untuk sistem penghantaran obat menggunakan polimer kitosan berkisar antara 100-300 nm⁽¹⁰⁾. Pada uji ini dieliminasi formula 3 karena tidak memasuki rentang ukuran nanopartikel yang baik. Formula 3 memiliki ukuran 461,5nm, sehingga formula tersebut dapat dikatakan tidak memasuki rentang ukuran nanopartikel yang baik untuk sistem penghantaran obat. bertujuan untuk melihat persebaran ukuran partikel yang terjadi dalam sistem nanopartikel. Indeks polidispers F1,F2 dan F3 berturut-turut adalah 0,271, 0,337, dan 0,209. Hasil dari ketiga formula ini memiliki indeks polidispersitas sekitar 0.2-0.3 sehingga ketiga formula menunjukkan dispersi ukuran yang relatif homogen.

Potensial Zeta

Potensial zeta diukur untuk mengetahui kestabilan dari koloid. Potensial zeta merupakan ukuran

kekuatan tolak menolak antarpartikel. Nanopartikel dengan nilai zeta potensial lebih dari +/- 30mV telah terbukti stabil dalam suspensi sebagai muatan permukaan yang mencegah agregasi ⁽⁴⁾.

Formula yang diujikan adalah formula 1 dan 2 (formula terpilih). Dari hasil pengujian potensial zeta menunjukkan kedua formula memiliki muatan positif. Masing-masing formula memiliki nilai potensial zeta sebesar +50,5 Mv dan +48,9 mV. Hal ini berhubungan dengan tipe mekanisme pembentukan nanopartikel secara gelasi ionik, dimana muatan positif dari gugus amin kitosan dinetralisasi melalui interaksi dengan muatan negatif dari polianion natrium tripolifosfat. Residual gugus amin dari kitosan yang bermuatan positif menimbulkan nilai potensial zeta yang positif ⁽¹¹⁾. Grafik dapat dilihat pada gambar 1.



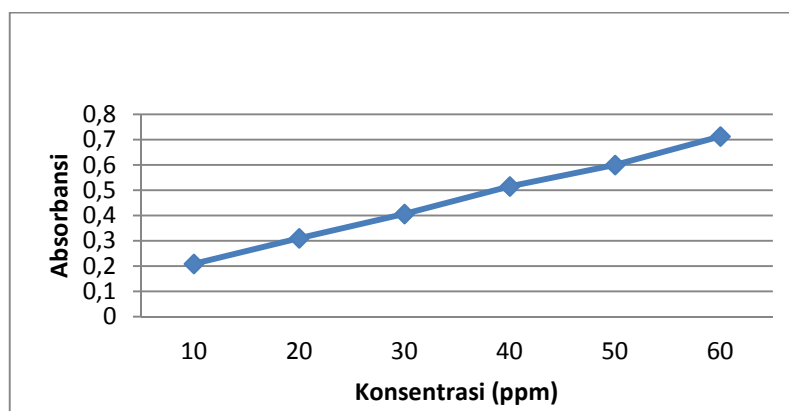
Gambar 1. Grafik Nilai Zeta Potensial

Verifikasi metode dan Efisiensi Penjerapan

1. Verifikasi

a. Linieritas

Penentuan linieritas kurva kalibrasi klindamisin dilakukan dengan seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50, 60 ppm yang dibaca serapannya pada spektrofotometri dengan panjang gelombang 412 nm. Koefisien relasi yang di dapat pada pembacaan kurva kalibrasi klindamisin ini adalah $y = 0,009994286x + 0,109533333$ dan nilai korelasi (r) yang di dapat adalah 0,999647566.



Gambar 6. Kurva Baku Klindamisin

b. Kecermatan (Akurasi)

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Range nilai % *recovery* analit yang dapat diterima adalah 90-100%.

Range tersebut bersifat fleksibel tergantung dari kondisi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan⁽¹²⁾.

Tabel 4. Persen Perolehan Kembali (%*Recovery*)

Konsentrasi (ppm)	% <i>Recovery</i>		
	R1	R2	R3
10	99,523	101,525	98,523
20	100,791	98,289	101,291
30	99,212	99,546	98,545
40	101,425	99,423	100,924
50	98,349	100,351	98,549
60	100,635	100,302	100,969

Keterangan: R1= Recovery replikasi 1, R2= Recovery replikasi 2, R3= Recovery replikasi 3

Keseksamaan (Presisi)

Presisi atau keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen⁽¹²⁾.

Presisi biasanya dinyatakan dalam nilai *relative standard deviation* (RSD). Pada kadar 1% atau lebih, standar deviasi relatif antara laboratorium adalah sekitar 2,5% ada pada satu per seribu adalah 5%. Pada kadar satu per sejuta (ppm) RSDnya adalah 16%, dan pada kadar part per bilion (ppb) adalah 32%⁽¹²⁾.

Tabel 5. Nilai *Relative Standard Deviation* (RSD)

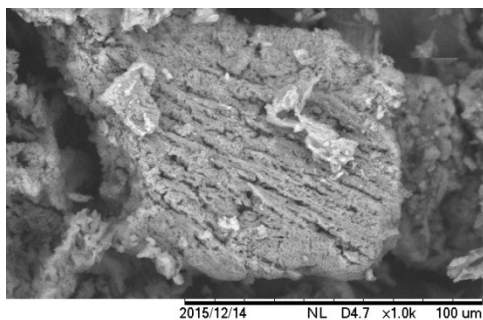
Konsentrasi (ppm)	SD	Recovery Rata2	RSD
10	1,248	99,857	1,250
20	1,313	100,124	1,311
30	0,416	99,101	0,420
40	0,850	100,591	0,845
50	0,899	99,083	0,908
60	0,272	100,635	0,271

2. Efisiensi Penjerapan

Uji efisiensi penjerapan dilakukan pada dua formula (F1 dan F2) dan di replikasi sebanyak 3kali. F1 menghasilkan efisiensi penjerapan rata-rata sebesar 67,702 %, dan F2 rata-rata sebesar 64,4303 %. Dari hasil efisiensi penjerapan tersebut dapat dikatakan kedua formula memiliki penjerapan yang baik, karena semakin besar efisiensi penjerapan maka semakin banyak obat yg terjerap oleh polimer.

Morfologi Partikel

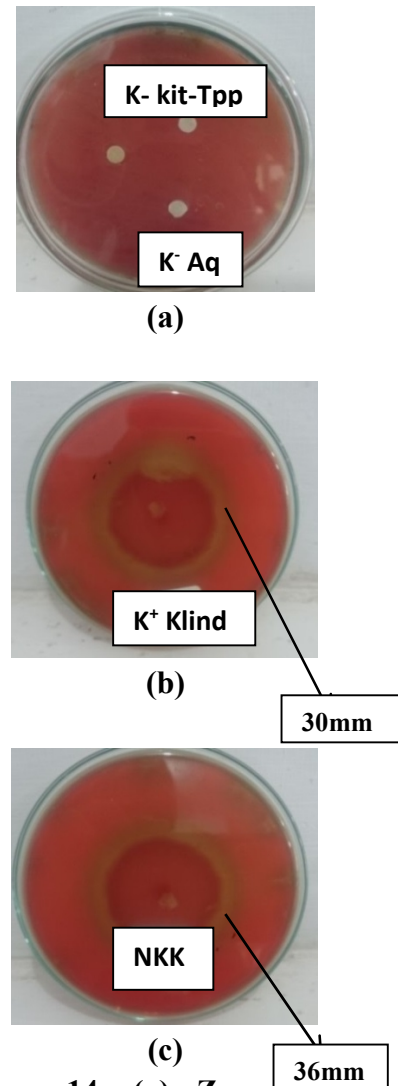
Scanning Electron Microscopy (SEM) untuk melihat morfologi dari nanopartikel. Hasil yang didapat dari uji ini yaitu morfologi nanopartikel yang didapat tidak beraturan.



Gambar 7. Hasil Analisis SEM Nanopartikel Klindamisin-Kitosan Uji Aktivitas Antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*

Formula yang dipilih untuk diujikan ke bakteri *P.acnes* adalah formula 1. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik Klindamisin Hcl murni, kontrol negatif yang digunakan adalah Aquadest (pelarut) dan larutan Kitosan-NaTPP. Sedangkan sampel yang di uji adalah nanopartikel klindamisin-kitosan (F1). Hasil yang

didapat adalah nanopartikel klindamisin memiliki zona hambat yang lebih besar dibandingkan klindamisin murni. Sehingga dapat disimpulkan semakin kecil ukuran partikel maka semakin besar daya hambat zat aktif tersebut.



Gambar 14. (a) Zona Kontrol Negatif Aquadest dan Kitosan-TPP (K⁻ Aq dan K-kit-Tpp) terhadap *Propionibacterium acnes* pada media MHA, (b) Zona Hambat Kontrol Positif Klindamisin (K⁺ Klind), (c) Zona Hambat Nanopartikel Klindamisin HCl-Kitosan (NKK)

KESIMPULAN

Hasil distribusi ukuran partikel nanopartikel klindamisin-kitosan pada formula 1 = 205,9 nm, formula 2 = 231nm, dan formula 3 = 406,5 nm. Formula 3 di eliminasi karena elewati rentang ukuran yang baik untuk sediaan farmasi. Indeks polidispersnya berturut-turut 0,271, 0,337, dan 0,209. Indeks polidispers yang dihasilkan menyatakan partikel homogen. Hasil zeta potensial formula 1 adalah +50,5 dan formula 2 adalah +48,9. Morfologi nanopartikel klindamisin-kitosan menggunakan SEM menggambarkan partikel yang kurang sferis. Efisiensi Penjerapan yang dihasilkan 64,213% (formula 1) dan 68,088% (formula 2).

Nanopartikel klindamisin-kitosan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*. Zona hambat yang didapat adalah rata-rata

DAFTAR PUSTAKA

- Irianto, K. Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganisme Jilid 2, CV. Yrama Widya. Bandung. 2006.
- Tjay, Tan Hoan dan Kirana Rahardja. Obat-obat Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya Edisi Keenam. Jakarta: Elex Media Komputindo. 2007
- European Standard prEN 1500. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika, Hygienische Händedesinfektion und Händewaschung, Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2) .(1997).
- Mohanraj VJ dan Chen Y. Nanoparticles-a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* .2006.
- Mardiyati E, Muttaqien SE, Setiyawati DR, Rosidah I, Sriningsih. Preparasi dan aplikasi nanopartikel kitosan sebagai sistem penghantaran insulin secara oral. Prosiding InSINas. 2012: 25-30.
- Dounighi M, Eskandari R, Avadi, M, Zolfagharian H, Sadeghi M, Rezayat M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2012; 18(1): 44-52.
- Kurniawan E. Preparasi dan karakterisasi nanopartikel sambung silang kitosan-natrium tripolifosfat dalam gel verapamil hidroklorida [skripsi]. Jakarta: universitas Indonesia. 2012.
- Iswandana Raditya, Anwar Effionora, dan Jufri Mahdi. Formulasi Nanopartikel Verapamil Hidroklorida dari Kitosan dan Natrium Tripolifosfat dengan Metode Gelasi Ionik. *Jurnal Farmasi Indonesia* Vol. 6 No. 4; 2013.
- Ditjen POM. Farmakope Indonesia, Edisi Keempat.

- Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.(1995).
10. Gupta, R.B., Kompella, U.B. Nanoparticle Technology for Drug Delivery, Vol 159, Taylor and Francis Group, New York.2006.
 11. Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., Tehrani, R, M., (2009). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chiosan and arabic gum with ionic gelation method. *Nanomeicine*: 6. 58-63
 12. Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metoda dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol.1. Hal. 119, 122berdiameter 37mm.

