

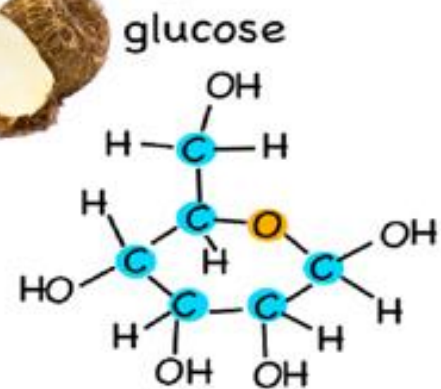
Vol. 3 No. 2 Desember 2016



Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia

E-ISSN 2580-8303

P-ISSN 2406-9388



DITERBITKAN OLEH:
FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA

EDITORIAL TEAM

CHIEF EDITOR

[Elida Zairina, S.Si., MPH., PhD., Apt.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

EDITORIAL BOARDS

[Suciati, S.Si., M.Phil, PhD., Apt.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

[Drs. Mochamad Djunaedi, MPharm., PhD., Apt.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

[Neny Purwitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

[Gesnita Nugraheni, S.Farm., M.S., Apt.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

[Dr.rer.nat Maria Lucia Ardhani D. L., S.Si., M.Pharm, Apt.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

[Tutik Sri Wahyuni, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

[Bambang Subakti Zulkarnain, S.Si., M.Clin.Pharm., Apt.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

[Kholis Amalia Nofianti, S.Farm, M.Sc., Apt.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

[Abhimata Paramanandana, S.Farm., M.Sc., Apt.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

ADMINISTRATIVE EDITOR

[Susmiandri, S.Kom.](#), Universitas Airlangga, Indonesia

VOL 3, NO 2 (2016)

JURNAL FARMASI DAN ILMU KEFARMASIAN INDONESIA

TABLE OF CONTENTS

ARTICLES

- [Anti-Inflammatory And Anti-Oxidant Activities Of Glochidion Daltonii Branch Extract](#)** 39-43
doi [10.20473/jfiki.v3i22016.39-43](https://doi.org/10.20473/jfiki.v3i22016.39-43)
Jintana Junlatat, Bungorn Sripanidkulchai
- [Design and Molecular Docking Studies of Quinazoline Derivatives as Antiproliferation](#)** 44-48
doi [10.20473/jfiki.v3i22016.44-48](https://doi.org/10.20473/jfiki.v3i22016.44-48)
Anita Puspa Widiyana, Galih Satrio Putra, Luthfi Ahmad Muchlashi, Mellany Ika Sulistyowaty, Tutuk Budiati
- [Karakterisasi Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System \(SNEDDS\) Minyak Buah Merah \(Pandanus conoideus Lam.\)](#)** 49-57
doi [10.20473/jfiki.v3i22016.49-57](https://doi.org/10.20473/jfiki.v3i22016.49-57)
Nurul Huda, Iis Wahyuningsih
- [Profil Pelepasan Andrografolid Granul Kombinasi Ekstrak Terpurifikasi Herba Pegagan \(Centella Asiatica\) Dan Sambiloto \(Andrographis Paniculata\)](#)** 58-61
doi [10.20473/jfiki.v3i22016.58-61](https://doi.org/10.20473/jfiki.v3i22016.58-61)
Lina Widyastuti, Akhmad Kharis Nugroho
- [Simultaneous Determination Of Sodium Benzoate And Sodium Cyclamate In Soft Drink Using High Performance Liquid Chromatography](#)** 62-66
doi [10.20473/jfiki.v3i22016.62-66](https://doi.org/10.20473/jfiki.v3i22016.62-66)
Ariya Wijaya Putra, Asri Darmawati, Juniar Mochtar
- [Evaluasi Kandungan Glukosa Dan Indeks Glikemik Beberapa Sumber Karbohidrat Dalam Upaya Penggalian Pangan Ber-Indeks Glikemik Rendah](#)** 67-73
doi [10.20473/jfiki.v3i22016.67-73](https://doi.org/10.20473/jfiki.v3i22016.67-73)
Nuzul Wahyuning Diyah, Aprilia Ambarwati, Gita M. Warsito, Greta Niken, Eriza T. Heriwiyanti, Rany Windysari, Deka Prismawan, Robi'atul F. Hartasari, Purwanto Purwanto
- [Pengaruh Lioprotektant Terhadap Karakteristik Nanopartikel Artesunat-Kitosan Yang Dibuat Dengan Gelasi Ionik-Pengeringan Beku](#)** 74-80
doi [10.20473/jfiki.v3i22016.74-80](https://doi.org/10.20473/jfiki.v3i22016.74-80)
Abhimata Paramanandana, Retno Sari, Pawahid Pawahid, Eryka A. Novarinandha, Widji Soeratri

Pengaruh Lioprotektant Terhadap Karakteristik Nanopartikel Artesunat-Kitosan Yang Dibuat Dengan Gelasi Ionik-Pengeringan Beku

Abhimata Paramanandana, Retno Sari*, Pawahid, Erika A. Novarinandha & Widji Soeratri
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya

*Corresponding author: retno-s@ff.unair.ac.id

Abstract

Background: Nanoparticles are particles with a diameter range between 1 - 1000 nm. Artesunate-chitosan nanoparticles made using ionic gelation-freeze dry method intended to protect the drug from degradation during the manufacturing process. To obtain an excellent freeze dried product, it is necessary to optimize the use of lioprotectant. Objective: The aim of this study is to learn the physical characterization of freeze dried artesunate-chitosan nanoparticles prepared using three different lioprotectant: sucrose, trehalose and maltodextrin. Methods: Nanoparticles were prepared by ionic gelation method using tripolyphosphate as crosslinker. Dried nanoparticles evaluated for its morphology, physical state, infrared spectra and redispersability. Results: Differential thermal analysis (DTA) thermogram showed that by adding lioprotectants, artesunate remain entrapped in chitosan nanoparticle system, while without lioprotectants no artesunate were entrapped in the chitosan matrix. The morphological observations using scanning electron microscopy (SEM) showed that artesunate-chitosan nanoparticles with 2.5% maltodextrin have smooth surface and spherical structure. In addition, maltodextrin shows better protection during freeze drying, slower particle precipitation and better particle redispersibility compared to particles with sucrose and trehalose. Lioprotectants with large concentration indicates better redispersability of artesunate-chitosan nanoparticles. Conclusions: Based on the results, it can be concluded that the addition of lioprotectant affect the characteristics of artesunate-chitosan nanoparticles.

Keywords: nanoparticles, artesunate, lioprotectant, ionic gelation, freeze dry

Abstrak

Latar belakang: Nanopartikel merupakan partikel dengan rentang ukuran diameter antara 1 - 1000 nm. Nanopartikel Artesunat-Khitosan diformulasikan menjadi nanopartikel menggunakan metode gelasi ionik-pengeringan beku ditujukan untuk melindungi bahan obat dari peruraian selama proses pembuatan. Untuk memperoleh produk dari pengeringan beku yang baik, optimasi lioprotektan sangat diperlukan. Tujuan: Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari karakteristik fisik nanopartikel Artesunat-Khitosan yang diformulasikan dengan tiga lioprotektan yang berbeda: sukrosa, trihalosa dan maltodekstrin menggunakan metode pengeringan beku. Metode: Pembuatan nanopartikel dilakukan menggunakan gelasi ionik dengan tripolifosfat sebagai *crosslinker*. Evaluasi nanopartikel kering meliputi: morfologi, sifat fisik, spektrum inframerah dan redispersabilitas. Hasil: Data *differential thermal analysis* (DTA) menunjukkan, penambahan lioprotektan menjebak artesunat dalam sistem nanopartikel chitosan, dimana formula tanpa penambahan lioprotektan tidak ditemukan artesunat di dalam matriks chitosan. Pemeriksaan morfologi menggunakan *scanning electron microscopy* (SEM) menunjukkan nanopartikel dengan 2,5% maltodextrin memiliki permukaan yang halus dan bentuk yang sferis. Selain itu, maltodextrin menunjukkan efek perlindungan selama pengeringan beku, laju pengendapan yang lebih lambat dan kemampuan untuk redipersi yang lebih baik dibandingkan dengan sukrosa dan trehalosa. Lioprotektan dengan konsentrasi tinggi menunjukkan redispersibilitas nanopartikel artesunat-chitosan yang lebih baik. Kesimpulan: Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa dengan penambahan lioprotectant mempengaruhi karakteristik nanopartikel artesunat-chitosan.

Kata kunci: nanopartikel, artesunat, lioprotektan, gelasi ionik, pengeringan beku

PENDAHULUAN

Nanopartikel merupakan partikel dengan rentang ukuran diameter antara 1 - 1000 nm. Matriks nanopartikel terdiri dari polimer dapat berasal baik dari polimer alam maupun polimer sintesis (Abdelwahed dkk., 2006; Bernard & Stainmesse, 2007). Salah satu polimer yang berasal dari alam, kitosan, memiliki gugus amino bebas yang bermuatan positif. Interaksi elektrostatis dapat terbentuk antara gugus amino kitosan dengan penyambung silang anion multivalent tripolifosfat (TPP) melalui metode gelas ionik (Tiyaboonchai, 2003). Penambahan polivinil alkohol (PVA) sebagai stabilisator dapat meningkatkan stabilitas koloid nanopartikel (Hasan, 2012) dengan cara mencegah agregasi melalui pembentukan lapisan polimer pada permukaan partikel serta meningkatkan ketahanan pembekuan pada saat pengeringan beku (Darwin dkk., 2007; Hirsjärvi, 2008; Date, Samad & Devarajan, 2010).

Pengeringan beku bertujuan dilakukan untuk meningkatkan stabilitas jangka panjang dari koloid nanopartikel. Pengeringan beku dapat menghasilkan beberapa tekanan yang dapat menyebabkan koloid nanopartikel menjadi tidak stabil, khususnya tekanan saat pembekuan (Abdelwahed *et al.*, 2006; Bernard & Stainmesse, 2007). Faktor yang berpengaruh pada karakteristik dan porositas nanopartikel pada proses pengeringan yaitu suhu dan waktu pembekuan, suhu dan waktu pengeringan, jenis dan jumlah lioprotektan, dan volume air yang ditambahkan (Abdelwahed dkk., 2006; Bernard & Stainmesse, 2007; Garg dkk., 2011).

Lioprotektan memiliki kemampuan untuk melindungi nanopartikel dari tekanan saat pembekuan. Kelompok gula seperti sukrosa, trihalosa dan maltodekstrin memiliki mekanisme perlindungan yang berasal dari matriks amorf yang terbentuk oleh gula seiring dengan hilangnya air pada saat pengeringan. Mekanisme perlindungan gula terdiri atas mekanisme vitrifikasi dan mekanisme penggantian air (*water replacement*), yaitu dengan cara membentuk ikatan hidrogen pada nanopartikel untuk menghambat kerusakan nanopartikel oleh kristal es (Corveleyn &

Remon, 1996; Chang dkk., 2005; Abdelwahed dkk., 2006; Bernard & Stainmesse, 2007; Varshosaz & Karimzadeh, 2007; Amorij dkk., 2008; Akhilesh, Faishal & Kamath, 2012).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lioprotektan sukrosa, trehalosa dan maltodekstrin terhadap karakteristik fisik nanopartikel kitosan dengan bahan aktif artesunat. Nanopartikel dibuat dengan metode gelas ionik menggunakan tripolifosfat sebagai penyambung silang, yang kemudian dikeringbekukan dengan penambahan tiga jenis lioprotektan (sukrosa, trehalosa, dan maltodekstrin) dengan berbagai jumlah. Nanopartikel kering dievaluasi meliputi pemeriksaan morfologi, jarak lebur, spektrum inframerah, dan kemampuan pendispersian partikel.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Artesunat (Goldliloo Pharmaceutical, China), maltodekstrin (Sorini Agro Asia Corporindo); sukrosa, trehalose; kitosan *pharmaceutical grade* (Biotech Surindo); sodium trifosfat pentabasic *practical grade* (Nacalai Tesque); asam asetat *pro analisis*; etanol *proanalysis*; aquadest.

Alat

Freeze Dryer (Christ^R Beta 1-8 K); Neraca analitik (Electronic Balance Chyo JP-160); Spektrofotometer inframerah (Jasco FT-IR 5300); Mettler Toledo FP-65 DTA P-900 Thermal; Brookfield Viscosimeter DV-II; Hettich Rotofix 32A Benchtop Centrifuge; mikroskop optik (Olympus IX71 Inverted Fluorescent Microscope); *magnetic stirrer* (DRAGONLAB MS-Pro) *Scanning Electro Microscope* (Inspect S50 tipe TP 2017/12).

Metode

Rancangan formula

Dalam penelitian ini, nanopartikel kitosan dibuat dengan metode gelas ionik dan menggunakan proses pengeringan beku dengan menambahkan sukrosa, trihalosa dan maltodekstrin sebagai lioprotektan.

Tabel 1. Rancangan formula nanopartikel artesunat-kitosan dengan lioprotektan sukrosa (S), trihalosa (T) dan maltodekstrin (M)

Nama bahan	Formula										
	K*	S1	S2	S3	M1	M2	M3	T1	T2	T3	T4
Artesunat (mg)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Kitosan (mg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TPP (mg)	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
PVA (mg)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Sukrosa (%)	-	2,5	5	10	-	-	-	-	-	-	-
Maltodekstrin (%)	-	-	-	-	2,5	5	10	-	-	-	-
Trehalosa (%)								2,5	3,5	7,5	10

*K = Kontrol (tanpa penambahan lioprotektan)

Pembuatan nanopartikel kitosan

Nanopartikel kitosan dibuat dengan metode gelasi ionik dengan perbandingan kitosan:TPP = 10:8 dengan cara:

Sejumlah kitosan didispersikan secara merata ke dalam larutan asam asetat 0,15% sambil diaduk dengan kecepatan 500 rpm menggunakan magnetik stirer sampai larut (larutan kitosan 0,1% b/v). Selanjutnya kedalam larutan kitosan dimasukkan larutan TPP dan diaduk pada 500 rpm selama dua jam. Setelah terbentuk koloid, dilakukan sentrifus untuk memisahkan antara padatan koloid dan filtrat. Setelah proses pemisahan padatan, selanjutnya dilakukan pengeringan beku dengan dan tanpa penambahan lioprotektan pada berbagai kadar sesuai rancangan formula pada Tabel 1 menggunakan *Freeze Dryer* (Christ^R Beta 1 - 8 K) selama 24 jam sehingga didapatkan partikel kering.

Evaluasi karakterisasi partikel kitosan

Morfologi permukaan nanopartikel

Sampel diletakkan diatas holder yang telah dilapisi karbon, selanjutnya holder diletakkan di dalam sputter cooter untuk dilapisi dengan *gold palladium* selama ±120 detik. Morfologi partikel diamati dengan *scanning electron microscopy* (SEM) FEI Inspect S50 pada beberapa perbesaran dan dilakukan pengukuran terhadap beberapa partikel.

Spektrum inframerah dari nanopartikel

Spektrum Inframerah nanopartikel kitosan dibuat dengan metode cakram KBr. Sampel diamati dengan panjang gelombang 4000 - 400 cm⁻¹.

Jarak lebur

Penentuan jarak lebur nanopartikel kitosan menggunakan alat *Differential Thermal Apparatus* (DTA). Diambil ±5 mg nanopartikel kitosan, kemudian dimasukkan ke dalam *crusible pan* tertutup. Pemeriksaan dilakukan pada suhu 50°C - 300°C dengan kecepatan kenaikan suhu 10°C per menit.

Redispersibilitas dan waktu pengendapan

Redispersi partikel dilakukan dengan cara, 20 mg sampel dilarutkan dalam 2 mL aquadest, kemudian dikocok biasa selama 10 detik. Dan selanjutnya, waktu pengendapan kembali dicatat.

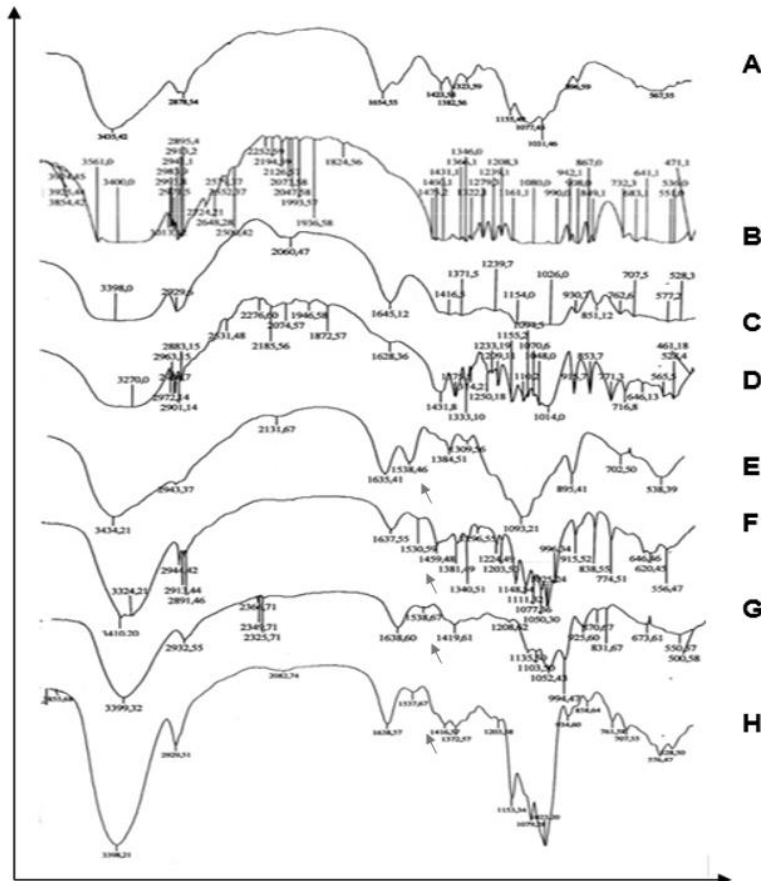
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan spektrum inframerah nanopartikel dilakukan untuk melihat interaksi antara kitosan dengan lioprotektan (maltosa, trehalosa dan sukrosa). Kitosan memiliki ikatan amida pada panjang gelombang 1655 cm⁻¹. Dengan penambahan lioprotektant, ikatan amida pada bilangan gelombang 1655 cm⁻¹ hilang (Bhumkar & Pokharkar, 2006). Hal ini disebabkan oleh tergantungnya ikatan amida dengan ikatan hidrogen antara kitosan dengan lioprotektan (Gambar 1. F, G dan H; Panah biru) yang tidak terlihat pada campuran fisik (Gambar 1. E; Panah biru). Pada Gambar 2 menunjukkan hasil pemeriksaan jarak lebur nanopartikel. Pola termogram dengan satu puncak endotermik pada semua formula menunjukkan bahwa artesunat terjerap dalam sistem nanopartikel kitosan, kecuali pada formula kontrol tanpa penambahan lioprotektan. Pada formula menunjukkan pola termogram yang berbeda disebabkan sistem nanopartikel tidak stabil pada proses pengeringan beku sehingga artesunat terlepas dari sistem nanopartikel. Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa sistem nanopartikel dengan penambahan lioprotektan dapat melindungi sistem nanopartikel selama pengeringan beku.

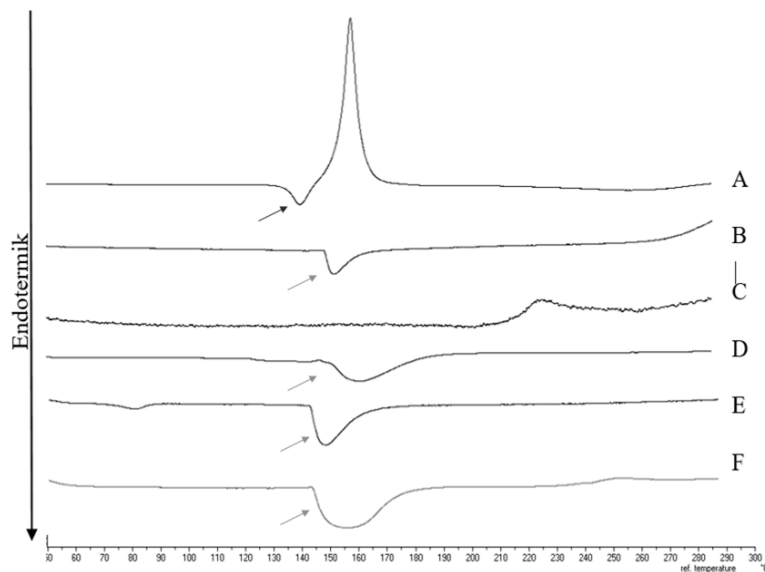
Dari hasil pengamatan jarak lebur menggunakan DTA pada nanopartikel artesunat-kitosan tanpa penambahan lioprotektan dan nanopartikel artesunat-kitosan dengan penambahan lioprotektan dapat dilihat peran lioprotektan yang dapat menstabilkan koloid nanopartikel pada proses pengeringan beku. Hal ini terlihat dari hilangnya termogram kristalin artesunat

yang seharusnya suhu lebur $\pm 130^{\circ}\text{C}$ (Gambar 2. Panah merah) membentuk termogram amorf. Sedangkan pada

nanopartikel dengan lioprotektan hanya tampak suhu lebur kitosan pada $\pm 150^{\circ}\text{C}$ (Gambar 2. panah biru).



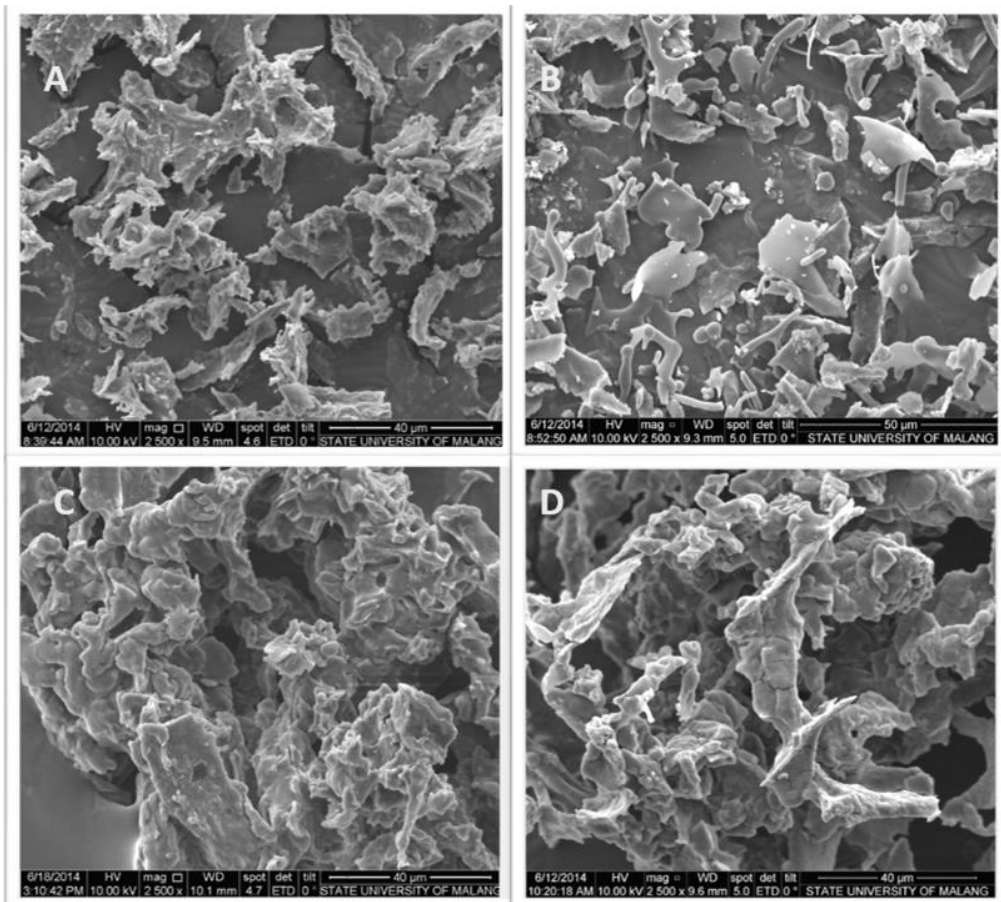
Gambar 1. Hasil pemeriksaan spektrum inframerah, kitosan(A), sukrosa (B), maltosa (C), trehalosa (D), partikel kitosan tanpa lioprotektan (kontrol) (E), partikel kitosan + trehalosa 2,5% (F), partikel kitosan + sukrosa 2,5% (G), dan partikel kitosan + maltosa 2,5%(H)



Gambar 2. Termogram DTA dari artesunat (A), kitosan (B), partikel artesunat-kitosan tanpa lioprotektan (C), partikel artesunat-kitosan dengan lioprotektan sukrosa 2,5% (D), trehalosa 2,5% (E) dan maltodektrin 2,5% (F)

Berdasarkan pemeriksaan ukuran dan morfologi nanopartikel artesunat-kitosan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) antara formula dengan penambahan sukrosa dan maltodekstrin tampak beberapa perbedaan antara keduanya. Pada formula dengan menggunakan lioprotektan sukrosa terlihat bentukan partikel yang beragregasi. Sedangkan nanopartikel formula (T1) dilakukan pengamatan dengan menggunakan SEM, dan diperoleh bentukan nanopartikel yang beragregasi dan belum didapatkan gambaran partikel berbentuk sferis.

(Gambar 3B, panah merah). Pada nanopartikel artesunat-kitosan pada formula K didapatkan gambaran partikel yang beragregasi dengan permukaan yang kasar dibandingkan dengan nanopartikel artesunat-kitosan dengan penambahan lioprotektan (Gambar 3A). Hal ini disebabkan oleh proses pembekuan pada pengeringan beku dapat menyebabkan kerusakan pada produk karena proses pengeringan beku menghasilkan berbagai tekanan selama pembekuan dan pengeringan.



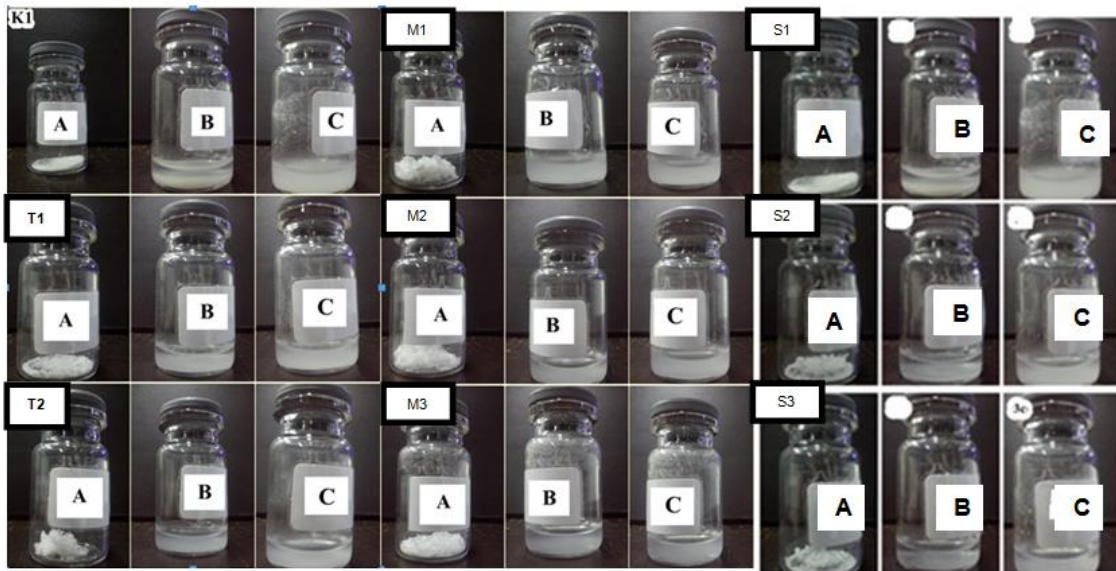
Gambar 3. Foto mikrograf *Scanning Electron Microscope* dari partikel artesunat-kitosan tanpa lioprotektan (A), partikel artesunat-kitosan dengan lioprotektan maltodekstrin 2,5% (B), trehalosa 2,5% (C) dan sukrosa 2,5% (D) (pembesaran 2500 x)

Pendispersian partikel dalam media air dan selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap waktu partikel untuk mengendap, hasil pengamatan disajikan dalam Tabel 2. Pengamatan pada semua formula menunjukkan bahwa formula dengan jumlah lioprotektan lebih besar menunjukkan pendispersian

yang lebih mudah dibandingkan dengan formula lainnya. Setelah redispersi, partikel dengan lioprotektan maltodekstrin lebih stabil dibandingkan partikel dengan lioprotektan sukrosa dan trehalosa. Gambar hasil dispersi dari evaluasi redispersibilitas dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel 2. Hasil evaluasi redispersibilitas dan waktu pengendapan nanopartikel artesunat-kitosan dengan dan tanpa penambahan lioprotektan pada berbagai kadar

Formula	Pengamatan Visual	Waktu Pengendapan (s)
K	Mudah terdispersi, membentuk cairan berkabut	595
S1	Mudah terdispersi, membentuk larutan berkabut	432
S2	Mudah terdispersi, membentuk cairan berkabut	156
S3	Mudah terdispersi, membentuk cairan berkabut	14
T1	Mudah terdispersi dan membentuk larutan berkabut	164
T2	Mudah terdispersi dan membentuk larutan berkabut	41
M1	Mudah terdispersi, membentuk cairan berkabut	1441
M2	Mudah terdispersi, membentuk cairan berkabut	1415
M3	Mudah terdispersi, membentuk cairan berkabut	785



Gambar 4. Hasil evaluasi redispersibilitas nanopartikel artesunat-kitosan tanpa lioprotektan (K) dan dengan lioprotektan: trehalose (T), maltodekstrin (M) dan sukrosa (S) pada berbagai kadar. Kondisi padatan (A), kondisi setelah ditambah air (B), kondisi setelah dikocok (C).

KESIMPULAN

Nanopartikel dengan penambahan maltodekstrin menunjukkan bentuk partikel sferis dengan permukaan halus. Sedangkan pada nanopartikel artesunat-kitosan dengan trehalosa sudah didapatkan struktur permukaan partikel yang halusakan tetapi tidak memperoleh bentuk yang sferis. Analisa termal menggunakan DTA menunjukkan formula dengan penambahan lioprotektan sukrosa dan maltodekstrin mampu melindungi sistem nanopartikel, dibandingkan dengan formula tanpa penambahan lioprotektan. Penambahan lioprotektan pada nanopartikel artesunat-kitosan mempengaruhi kemampuan redispersi partikel. Dengan penambahan konsentrasi lioprotektan semakin memperbaiki kemampuan redispersi nanopartikel.

DAFTAR PUSTAKA

Abdelwahed, W. Degobert, G., Stainmesse, S. & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 58(15); 1688–1713.

Akhilesh, D., Faishal, G. & Kamath, J. V. (2012). Review Article: Comparative Study of Carriers Used in Proniosomes. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*; 1(1); 164–173.

Amorij, J. P., Huckriede, A., Wilschut, J., Frijlink, H. & Hinrichs, W. (2008). Development of stable influenza vaccine powder formulations: Challenges and possibilities. *Pharmaceutical*

- Research*; 25(6); 1256–1273.
- Bernard, C. & Stainmesse, S. (2007). Freeze-Drying of Nanoparticles: Formulation, Process and Storage Considerations Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process.
- Bhumkar, D. R. & Pokharkar, V. B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS PharmSciTech*; 7(2); E138–E143.
- Chang, L., Shepherd, D., Sun, J., Ouellette, D., Grant, K. L., Tang, X. C. & Pikal, M. J. (2005). Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 94(7); 1427–1444.
- Corveleyn, S. & Remon, J. P. (1996). Maltodextrins as lyoprotectants in the lyophilization of a model protein, LDH. *Pharmaceutical Research*; 146–150.
- Darwin, M. *et al.* (2007). The Science of Cryonics. *History*.
- Date, P. V., Samad, A. & Devarajan, P. V. (2010). Freeze Thaw: A Simple Approach for Prediction of Optimal Cryoprotectant for Freeze Drying. *AAPS PharmSciTech*; 11(1); 304–313.
- Garg, A., Visht, S., Kumar, P., Sharma & Kumar. (2011). Formulation, Characterization and Application on Nanoparticle: A Review. *Pelagia Research Library*; 2(2); 17–26.
- Hasan, M. I. (2012). Modifikasi Nanopartikel Perak dengan Polivinil Alkohol untuk Meningkatkan Selektivitas dan Stabilitas Indikator Logam Tembaga (Cu): Uji Coba pada Makroalga Merah (*Kappaphycus alvarezii*). *Skripsi*; Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok.
- Hirsjärvi, S. (2008). Preparation and Characterization of Poly (Lactic Acid) Nanoparticles.
- Tiyaboonchai, W. (2003). Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery; *11*(3); 51–66.
- Varshosaz, J. & Karimzadeh, S. (2007). Development of cross-linked chitosan films for oral mucosal delivery of lidocaine. *Research in Pharmaceutical Sciences*; 2; 43–52.
- <http://www.rps.mui.ac.ir/index.php/jrps/article/view/26>.