

SINTESIS NANO PARTIKEL KITOSAN DAN PENGARUHNYA TERHADAP INHIBISI BAKTERI PEMBUSUK JUS NENAS

SYNTHESIZED OF CHITOSAN NANOPARTICLES AND EFFECT TO BACTERIAL-DECAY INHIBITION OF PINEAPPLE JUICE

Husniati dan Eva Oktarina

Balai Riset dan Standardisasi Industri Bandar Lampung

e-mail: husniati@kemenperin.go.id

Diterima: 17 Juli 2013; Direvisi: 29 Juli 2013 – 7 Maret 2014; Disetujui: 17 Oktober 2014

Abstrak

Nano partikel kitosan berhasil disintesis dari reaksi ikatan silang secara gelasi ion antara kitosan dengan TPP (tri polifosfat) menggunakan surfaktan Tween 80. Reaksi berlangsung melalui pengadukan kontinu dengan *magnetic stirring* pada suhu ruang selama 2 jam. Berdasarkan PSA diperoleh ukuran nano partikel berkisar antara 215,9 dan 272,9 nm dengan komposisi kimia mengandung unsur C, H, O, N, dan beberapa mineral yang diamati melalui SEM-EDS. Hasil uji bioaktivitas menunjukkan pada konsentrasi 0,01% b/v memiliki spektrum resistensi maksimum. Uji toksisitas pada mencit putih memberikan nilai LD₅₀ senyawa nano partikel kitosan tidak mengandung racun toksik.

Kata kunci: anti bakteri, uji bioaktivitas, gelasi ion, LD₅₀, nano partikel kitosan.

Abstract

Chitosan nano particles synthesized by crosslinking reaction between the ionic gelation of chitosan with TPP (tri-polyphosphate) using Tween 80 surfactant. The reaction takes place through continuous stirring with a magnetic stirring at room temperature for 2 hours. Based on the obtained nano size particles PSA ranged between 215.9 and 272.9 nm with a chemical composition containing the elements C, H, O, N, and some minerals were observed by SEM-EDS. Bioactivity test results showed the concentration of 0.01% b/v has a maximum resistance spectrum. Toxicity tests on white mice with LD₅₀ value compound chitosan nano particles contain no toxic poison.

Keywords: antibacterial, bioassay, chitosan nanoparticles, ionic gelation, LD₅₀.

PENDAHULUAN

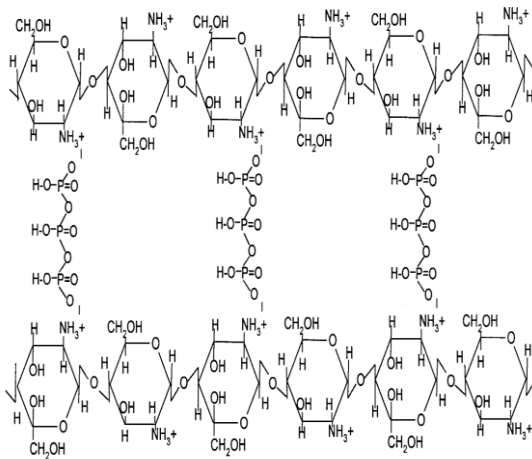
Pengembangan potensi kitosan terkait oleh adanya gugus amina dari struktur kitosan yang dapat meningkatkan biokompatibilitas dan afinitas pengikatan dengan muatan negatif seperti yang terdapat pada protein, obat, dan DNA (Park *et al.*, 2009). Menurut Choi *et al.* (2001) kitosan mempunyai karakteristik berat molekul hingga 1 MDa dan bermuatan kation pada pH rendah. Jang dan Lee (2008) menyatakan bahwa protonasi gugus amino pada pH asam membuat kitosan larut dalam air. Berdasarkan karakteristik tersebut maka pengembangan potensi kitosan sebagai tujuan untuk aktivitas anti bakteri dipengaruhi oleh sejumlah faktor diantaranya derajat depolimerisasi, kemanjuran terhadap spesies mikroba

tertentu (Sano *et al.*, 2003), serta derajat deasetilasi (Sano *et al.*, 2002).

Pengembangan potensi kitosan juga dilatarbelakangi oleh keterbatasan penggunaan kitosan dalam industri karena keterlarutan yang rendah dalam media air pada kondisi netral dan alkali. Salah satu bentuk pengembangan produk kitosan adalah dengan melakukan modifikasi ikatan silang antara kitosan dan ion-ion yang sifatnya larut air seperti fosfat, sulfat, sianat, dan lain-lain. Melalui metode ikatan silang baik secara intramolekul maupun intermolekul, ukuran partikel dapat dikontrol hingga super halus mencapai skala nano (Bodnar *et al.*, 2005). Karakter unik dari skala nano dan ukuran quantum memberikan efek sifat nano partikel kitosan tersebut menunjukkan keunggulan (Qi *et al.*, 2004). Jang dan

Lee melaporkan bahwa ukuran partikel dalam skala nano menjadi penting dalam peningkatan penghantar nutrisi seperti vitamin C (Jang dan Lee, 2008), sementara Qi *et al.* (2004) melaporkan ukuran partikel kitosan pada skala nano mempunyai aktivitas antibakteri terhadap berbagai macam mikroorganisme.

Penelitian Bao *et al.* (2008) melaporkan hasil pembentukan nano partikel kitosan berukuran 320,8 nm yang diperoleh melalui ikatan silang antara kitosan dengan TPP (tri polifosfat) dan CTAB sebagai surfaktan. Reaksi ikatan silang yang terjadi diilustrasikan pada Gambar 1. Larutan natrium tripolifosfat dalam akuades akan mengalami disosiasi melepaskan ion OH^- dan $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$. Kedua ion ada dalam larutan TPP dan secara ionik dapat bereaksi dengan NH_3^+ dari kitosan membentuk struktur intermolekul melalui ikatan silang (Lam *et al.*, 2006). Penambahan surfaktan CTAB memberikan pengaruh terhadap ukuran partikel kitosan, yaitu peningkatan diameter rata-rata seiring dengan peningkatan konsentrasi kitosan (Bao *et al.*, 2008).



Gambar 1. Ikatan silang antara kitosan dan natrium tripolifosfat.

Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis nano partikel kitosan melalui modifikasi metode yang telah dikembangkan oleh Bao *et al.* (2008). Interaksi elektrostatik terbentuk antara rantai kitosan bermuatan positif dengan polianion dari TPP sebagai agen ikatan

silang dari NaTPP. Surfaktan Tween 80 ditambahkan sebagai kontrol ukuran partikel yang kemungkinan cenderung bertambah. Tween 80 atau dikenal sebagai polisorbat 80 adalah surfaktan non ionik dan pengemulsi yang berasal dari asam oleat dan sorbitan terpolietoksilasi, tercatat sebagai merek dagang dalam IC America dan sering digunakan dalam makanan (Anonim, 2013). Nano partikel kitosan yang diperoleh digunakan untuk menguji pengaruh penambahannya terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri pembusuk dari jus nenas yang telah diheramkan selama tujuh hari. Penelitian ini selanjutnya dapat memberikan informasi penggunaan senyawa tersebut dalam proses pengawetan jus nenas.

BAHAN DAN METODE

A. Bahan dan Alat

Bahan baku pembuatan nano partikel kitosan (NT 345) dari kitosan T345 dengan spesifikasi derajat deasetilasi/DD 71%, kadar air 7,39 %, kadar abu 0,10%, dan kadar nitrogen total 74,55% (Husniati, 2012), pentasodium tripolifosfat (NaTPP/ $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), aquades, tween 80 [Merck], dan asam asetat *glacial* [Merck].

Bahan uji bioaktivitas adalah Nutrient Agar (NA) [Difco], akuades, bufer pepton [Prodia], NaCl [Merck], dan campuran isolat bakteri yang didapat dari jus nenas alami yang telah dibusukkan selama 7 hari.

Bahan uji toksisitas menggunakan mencit putih *ddY* berjenis kelamin jantan dan berbobot badan antara 20-25 gram.

Alat yang diperlukan untuk pembuatan nano partikel kitosan adalah *hot plate magnetic stirrer* [Fisher Scientific], syring ukuran 3 ml, *micropipet* [BIOHTIP Oyj], *timer*, *spray dryer* [BUCHI 190], pH meter [HACH], *Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* (SEM-EDS) [JEOL JSM 6390 A], zetasizer dan *Particle Size Analyzer* (PSA) [Delsa Nano C Becman Coulter].

Peralatan mikrobiologi yang umum digunakan seperti cawan petri [CSM], penangas air (*water bath*) [Stuart

Scientific], autoklaf [Sturdy], *laminar air flow* [ESCO], dan inkubator [Mammert].

B. Metode Penelitian

Pembuatan Nano Partikel Kitosan (Modifikasi Bao *et al.* 2008).

Kitosan 0,2% b/v dilarutkan dalam asam asetat 0,2 M dan larutan ini difiltrasi menggunakan kertas filter whatman 42. Selanjutnya ke dalam filtrat kitosan ditambahkan NaTPP 0,1% b/v dan tween 80 0,1% v/v dengan perbandingan 5:1:0,05. Proses gelasi berlangsung selama 2 jam dengan pengadukan konstan pada suhu ruang menggunakan *magnetic stirrer*, kemudian larutan dikeringkan menggunakan *spray dryer* untuk memperoleh serbuk nano partikel kitosan yang disebut NT 345. Proses pembuatan dilakukan dalam dua kali ulangan.

Karakterisasi Nano Partikel Kitosan

Nano partikel kitosan (NT 345) yang terbentuk diamati ukuran dan stabilitas zeta potensial menggunakan peralatan PSA dan zetasizer. Untuk bentuk partikel dan komposisi kimianya diamati menggunakan SEM-EDS.

Uji Bioaktivitas (Lay *et al.*, 1994)

Biakan bakteri dari jus nenas yang telah berusia 7 hari diusapkan dalam medium NA (Husnati dan Oktarina, 2011) kemudian *disc* cakram dicelupkan pada berbagai macam konsentrasi nano partikel kitosan dari kisaran 0,0001 - 0,1% b/v sebanyak dua kali ulangan. *Disc* cakram diletakkan di atas medium NA dan diamati selama 16-24 jam pada suhu 35° C untuk diukur diameter zona bening yang dihasilkan.

Penentuan LD₅₀ (Weil, 1952; Lu, 1991)

Dosis nano partikel kitosan yang diberikan adalah 2,5; 5; 10 dan 20 gram per kilogram berat badan. Tiap tingkat dosis diberikan masing-masing pada 5 ekor mencit. Nano partikel kitosan (NT 345) diberikan dalam bentuk suspensi 20% dalam aquades dengan cara peroral (intragastrik) menggunakan sonde lambung. Sebelum perlakuan,

mencit dipuaskan selama 24 jam sedangkan air minum tetap diberikan *ad libitum*. Pengamatan dilakukan pada 1 x 24 jam sampai dengan 7 x 24 jam paska pemberian sediaan. Parameter yang diamati adalah banyaknya mencit yang mati selama jangka waktu tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Sintesis Nano Partikel Kitosan

Metode ikatan silang yang dikembangkan dalam pembuatan nano partikel kitosan pada penelitian ini, mengacu dari penelitian Bao *et al.* (2008). Bao *et al.* (2008) membuat nanopartikel kitosan dari kitosan Sigma Aldrich DD 75–85% dengan TPP sebagai agen ikatan silang menggunakan surfaktan CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*). Pengembangan pada penelitian ini adalah menggunakan Tween 80 sebagai surfaktan bersifat netral dan kitosan dengan derajat deasetilasi (DD) 71%. Sementara beberapa alasan NaTPP menjadi agen ikatan silang diantaranya merupakan bahan tambahan yang telah disetujui oleh *Food and Drug Administration*, US Amerika (Kafshgari *et al.*, 2011), senyawa ini memiliki sifat tidak toksik dan penambahan senyawa ini cepat menjadi gel.

Mekanisme pembentukan nano partikel kitosan berdasarkan interaksi antara muatan positif kitosan dengan muatan negatif tri poli fosfat/TPP. Polikationik kitosan terbentuk pada pH asam dengan penambahan asam asetat. Sedang polianionik TPP terbentuk akibat terdisosiasinya dalam air melepaskan ion OH⁻ dan P₃O₁₀⁵⁻ yang selanjutnya akan bereaksi dengan NH₃⁺ dari kitosan (Lam *et al.*, 2006). Penggabungan partikel satu dengan yang lain memberikan efek aglomerasi oleh sebab itu penambahan NaTPP berlebihan dapat mengurangi kelarutan yang cenderung meningkatkan ukuran partikel dan penambahan surfaktan memberikan efek mencegah penggabungan antar partikel atau aglomerasi (Jang dan Lee, 2008). Berdasarkan penelitian Silva *et al.* (2006) diketahui bahwa penambahan surfaktan dapat memperkecil ukuran partikel

kitosan. Surfaktan yang banyak dipakai adalah surfaktan nonionik (Tween 80 dan Span 80). Tween 80 dan Span 80 bersifat nontoksik yang umumnya digunakan sebagai emulsifier dan penstabil pada bidang pangan dan farmasi. Tween 80 merupakan molekul yang diserap oleh permukaan partikel untuk mencegah terjadinya gumpalan.


B. Karakterisasi Nano Partikel Kitosan

Hasil pengamatan nano partikel kitosan tercantum pada Tabel 1. NT 345 yang dibuat dengan metode ion gelasi kitosan dengan Na-TPP sebagai agen ikatan silang dan Tween 80 sebagai surfaktan, diperoleh ukuran partikel berskala nano yaitu 215,9 dan 272,9 nm, dengan karakteristik tidak larut sempurna dalam air dan larut dalam asam lemah organik. Cakupan skala nano bagi partikel berukuran nano berkisar antara 0,2-100nm (Thassu *et al.*, 2007), namun Bodnar *et al.* (2005) dalam penelitiannya menghasilkan nano partikel kitosan dengan ukuran 290 nm dan 340 nm dengan index polidispersi atau P.I 0,429 (atau kurang dari 1) yang dihasilkan dari kitosan DD 88% (Sigma Aldrich, Mv 320.000) dengan asam karboksilat sebagai agen ikatan silang, dan reaksi kondensasi dilakukan oleh karbodimida. Ocheke *et al.* (2009) dalam *reviewnya* menyatakan bahwa polimerik nano partikel adalah partikel padat koloid dengan ukuran berkisar antara 10-1000 nm. Dengan kata lain bahwa, NT 345 berhasil dibuat dan berskala nano (nano partikel kitosan). Hasil penelitian menunjukkan bahwa Na-TPP sebagai agen ikatan silang dan Tween 80 sebagai surfaktan dapat digunakan dalam pembuatan nano partikel kitosan, dengan ukuran yang hampir sebanding dengan asam karboksilat sebagai agen ikatan silang yang dikondensasi dengan karbodimida (Bodnar *et al.*, 2005).

Penggunaan surfaktan nonionik Tween 80 pembuatan mikrosfer kitosan untuk sistem pengantaran haemoglobin ke dalam tubuh telah dilaporkan oleh Silva *et al.* (2006). Hasilnya, Tween 80 dapat menurunkan diameter rata-rata

mikrosfer kitosan, yaitu dari 198 μm menjadi 181,3 μm . Berdasarkan penelitian Silva *et al.* (2006) inilah diketahui bahwa penambahan surfaktan dapat memperkecil ukuran partikel kitosan.

Tabel 1. Hasil pengamatan nano partikel kitosan yang dihasilkan.

Kode sampel	Ukuran partikel (nm) sesuai PSA	Zeta potensial (mV)	Pengamatan Mikrostruktur dengan SEM
NT 345	255,2-272,9	25	

Hasil Zeta potensial yang diperoleh dari sampel NT 345 dalam media air adalah 25 mV dan bermuatan positif. Zeta potensial menunjukkan muatan permukaan yang dapat mempengaruhi kestabilan partikel dalam suspensi melalui tolakan elektrostatis antar partikel (Qi *et al.*, 2004).

Berdasarkan SEM, bentuk partikel relatif bulat dengan distribusi merata pada bentuk tersebut yang teramati pada perbesaran 500 kali.

Analisis kimia NT 345 ditunjukkan pada Tabel 2. Komposisi kimia berdasarkan metode EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) adalah senyawa organik yang terdiri dari unsur-unsur penyusun dari unsur karbon (C), nitrogen (N), dan oksigen (O) sebagai komponen utama, dan unsur lain dalam jumlah renik seperti Na, P, Ca, Cu, dan Zn, sedangkan unsur hidrogen (H) tidak terdeteksi kemungkinan besar unsur hidrogen lebih ringan dari unsur yang disebut di atas, yang berada di atas permukaan. Dengan kata lain bahwa keseluruhan unsur tersebut menyatakan suatu polimer glukosamin yang telah mengalami ikatan silang dengan TPP dan kemungkinan masih mengandung mineral Zn, Cu, dan Ca dari kitin. Shahidi *et al.* (1999) dalam *reviewnya*

menyebutkan bahwa kitin adalah komponen utama dalam cangkang kelompok invertebrata dan dinding sel dari fungi. Kitin mengandung pigmen, protein, karotenoprotein dan mineral (Shahidi *et al.*, 1999; Muzarelli, 2001).

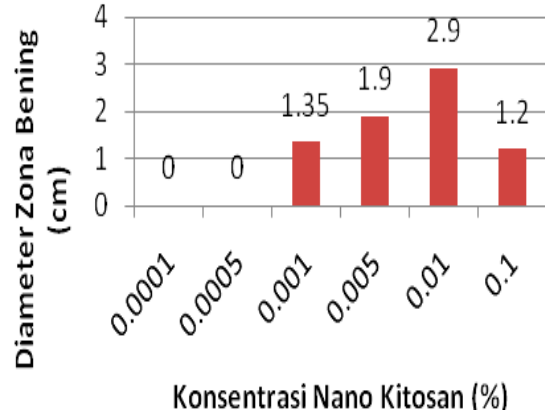
Tabel 2. Komposisi Kimia NT 345 (pada perbesaran 500x).

Unsur	Persentase massa (%)
C	41,13
N	22,61
O	26,05
Na	4,11
P	3,86
Ca	0,64
Cu	0,86
Zn	0,74

C. Hasil Uji Bioaktivitas

Nano partikel kitosan (NT 345) yang didapat dari penelitian ini diuji aktivitas anti mikrobanya terhadap campuran bakteri yang tumbuh pada jus nenas yang telah membusuk. Hasil pengamatan secara *in vitro* yang ditunjukkan dari pengaruh hambatan pertumbuhan sekitar *disc* cakram dengan ragam konsentrasi NT 345 antara 0,0001 - 0,1% b/v. Adanya inhibisi terhadap pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan area zona bening sekitar *disc* cakram. Gambar 2 menunjukkan ukuran diameter zona bening tersebut dan diameter zona bening maksimal terhadap bakteri pembusuk alami dari jus nenas diberikan pada konsentrasi 0,01%.

Pengaruh inhibisi mikroba dari NT 345 berada pada kisaran konsentrasi 0,001-0,1%, namun kecenderungan menghambat mikroba menurun di atas konsentrasi 0,1%. Hal ini kemungkinan disebabkan, pada konsentrasi tersebut, suspensi NT 345 semakin kental (*viscous*) sehingga mempengaruhi laju alir dan difusi, serta menghalangi interaksi muatan positif kitosan dengan muatan negatif dari membran sel mikroorganisme (Shahidi *et al.*, 1999). Makin viskos fluida tersebut maka makin besar gaya yang diperlukan.



Gambar 2. Diameter hambatan pertumbuhan bakteri pembusuk jus nenas terhadap pengaruh penambahan dari konsentrasi NT 345.

Karakter unik dari nano partikel untuk ukurannya yang kecil dan efek ukuran kuantum dapat membuat nano partikel kitosan menunjukkan keunggulan dalam aktivitas (Qi *et al.*, 2004). Ukuran partikel adalah salah satu penentu signifikan dalam mukosa dan jaringan epitel penyerapan, nanopartikel lebih kecil dari ~ 100 nm memiliki serapan lebih besar 3-kali lipat dibandingkan dengan ukuran nanopartikel ~ 275 nm, karena nanopartikel yang lebih kecil mampu menembus seluruh lapisan submukosa, sedangkan yang lebih besar mendominasi lapisan epitel (Jang *et al.*, 2008).

D. Derajat Toksisitas

Hasil penelitian terhadap LD₅₀ bertujuan untuk melakukan evaluasi tingkat keamanan atau toksisitas sediaan uji dari NT 345. Penentuan LD₅₀ dilakukan menggunakan metode yang dikembangkan oleh Weil (1952) dan derajat ketoksikan ditetapkan berdasarkan besarnya dosis yang dapat menimbulkan kematian pada 50% jumlah hewan percobaan. Kategori super toksik bila LD₅₀ < 5 mg/kg BB; sangat toksik bila LD₅₀ 5-50 mg/kg BB; toksik sedang bila LD₅₀ 50-500 mg/kg BB; toksik ringan bila LD₅₀ 5-15 g/kg BB; dan tidak toksik bila LD₅₀ > 15 g/kg BB (BB adalah berat badan mencit) (Lu, 1995 dalam Supriyono, 2007).

Hasil menunjukkan selama jangka waktu 1 x 24 hingga 7 x 24 jam paska pemberian sediaan uji, tidak ditemukan adanya mencit yang mati pada semua kelompok perlakuan (Tabel 3).

Tabel 3. Jumlah kematian mencit paska pemberian NT 345 dalam jangka waktu (1-7) x 24 jam

Dosis (g/kg BB)	Jumlah hewan yang mati (x 24 jam)						
	1	2	3	4	5	6	7
0 (kontrol)	0	0	0	0	0	0	0
2,5	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0

Berdasarkan Tabel 3 bahwa tidak terdapat kematian pada mencit paska pemberian sediaan uji NT 345 dengan dosis 20 g/kg BB. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa sediaan uji tersebut digolongkan ke dalam kelompok sediaan tidak toksik sesuai ketentuan nilai LD₅₀ bila lebih dari 15 g/kg BB tidak terdapat kematian paska pemberian sediaan itu selama jangka waktu 1 x 24 hingga 7 x 24 jam (Lu, 1995 dalam Supriyono, 2007).

KESIMPULAN

Nano partikel kitosan NT 345 telah berhasil disintesis melalui interaksi elektrostatik antara rantai kitosan bermuatan positif dan polianion tri poli fosfat/TPP sebagai agen ikatan silang menggunakan surfaktan tween 80 dan diperoleh ukuran partikel 215,9 dan 272,9 nm. Bioaktivitas dari NT 345 dalam ukuran skala nano mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dari jus nenas. Inhibisi pertumbuhan bakteri terjadi pada kisaran konsentrasi NT 345 sebanyak 0,001 - 0,1 % b/v dan inhibisi maksimal pada konsentrasi 0,01 %b/v. Senyawa NT 345 ini bersifat tidak toksik sehingga dapat digunakan sebagai bahan pengawet dari jus nenas.

SARAN

Nano kitosan dapat digunakan sebagai bahan tambahan pangan yang aman dikonsumsi karena tidak bersifat toksik. Nano kitosan juga meningkatkan *shelf life* karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas dukungan dana penelitian dari Program Kegiatan Insentif PKPP 2011 Kementerian Riset dan Teknologi melalui Kementerian Perindustrian dengan Judul Penelitian Pembuatan Kitosan dan Nano Partikel Kitosan dengan Tripoli Fosfat dari Limbah Cangkang Udang (*Crustaceae*) dan Aplikasinya sebagai Bahan Memperpanjang *Shelf-Life* Produk Buah Segar dan Buah Kaleng dengan No. kontrak 12/SPK/RISTEK/BPKIMI/03/2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. (2013). *Polysorbate 80*. http://en.wikipedia.org/wiki/Polysorbate_80.
- Bao, H., Li, L., Zhang, H. (2008). Influence of Cetyltrimethyl ammonium Bromide on Physicochemical Properties and Microstructures of Chitosan-TPP Nanoparticles in Aqueous Solution. *J. of Coll. and Interface Sci.* 328: 270-277.
- Bodnar, M., Hartmann, J.F., and Borbely, J. (2005). Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules*. 6: 2521-2527.
- Choi, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., Oh, S.J., Choi, J.H., and Kim, C.Y. (2001). In Vitro Antimicrobial Activity Of A Chitooligosaccharide Mixture Against *Actinobacillus*, *Actinomyces cetemcomitans* and *Streptococcus Mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 18: 553-557.
- Husniati. (2012). Kitosan dari Cangkang Udang Black Tiger: Produksi dan

- Karakterisasinya. *Teknologi Agroindustri*. 4(2): 29-35.
- Husniati dan Oktarina, E. (2012). Pengaruh Penambahan Kitosan pada Jus Nenas terhadap Shelf Life. *J. Hasil Penelitian Industri*. 25(1): 11-17.
- Jang, K.I., and Lee, H.G. (2008). Stability of Chitosan Nanoparticles for L-Ascorbic Acid during Heat Treatment in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.* 56(6): 1936-1941.
- Kafshgari, M.H., Khorram, M., Khodadoost, M., and Khavari, S. (2011). Reinforcement of Chitosan Nanoparticles Obtained by An Ionic Cross-linking Process. *Iranian Polymer J.* 20(5): 445-456.
- Lam, T.D., Hoang, V.D., Lien, L.N. (2006). Synthesis and Characterization of Chitosan Nanoparticles Used as Drug Carrier. *Journal of Chemistry*. 4(1): 104-109.
- Lay, B.W. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Lu, F.C. (1991). *Basic Toxicology, Fundamental, Target Organ and Risk Assessment*. New York: Hemisphere Publishing Corporation, CRC Press.
- Muzzarelli, R.A.A. (2001). *The Chitin Handbook*. Oxford: Pergamon Press.
- Ochekpe, N.A., Olorunfemi, P.O., and Ngwuluka, N.C. (2009). Nanotechnology and Drug Delivery Part 2: Nanostructure for Drug Delivery. *Trop. J. Pharm Res.* 8(3): 275-287.
- Park, K.M., Choi, J.H., Bae, J.W., Jung, Y.J., and Park, K.D. (2009). Nano-aggregates using Thermosensitive Chitosan Copolymers as a Nanocarrier for Protein Delivery. *Journal of Experimental Nanoscience*. 4(3): 269-275.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., and Zou, X. (2004). Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles. *Carbohydrate Research*. 399(16): 2693-2700.
- Sano, H., Shibasaki, K.I., Matsukubo, T., and Takaesu, Y. (2002). Effect of Molecular Mass and Degree of Deacetylation of Chitosan on Adsorption of *Streptococcus sobrinus* 6715 to Saliva Treated Hydroxyapatite. *Bull. Tokyo dent. Coll.* 43(2): 75-82.
- Sano, H., Shibasaki, K.I., Matsukubo, T., and Takaesu, Y. (2003). Effect of Chitosan Rising on Reduction of Dental Plaque Formation. *Bull. Tokyo dent. Coll.* 44(1): 9-16.
- Shahidi, F., Janak, K.V.A., and You-jin, J. (1999). Food Applications of Chitin and Chitosans. *Trends in Food Science and technology*. 10: 37-51.
- Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Figueiredo, M., Ferreira, D., and Veiga, F. (2006). Microencapsulation of hemoglobin in chitosan coated alginate microsphere prepared by emulsification/internal gelation. *The AAPS Journal*. 7(4): E903-E913.
- Supriyono. (2007). *Pengujian lethal dosis (LD50) ekstrak etanol biji buah duku (Lansium domesticum Corr) pada mencit (Mus musculus)*. (Skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Thassu, D., Deleers, M., Pathak, Y. (2007). *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. New York: Informa Healthcare.
- Weil, C.S. (1952). Tables for Convenient Calculation of Median-Effective Dose (LD₅₀ or ED₅₀) and Instruction in Their Use. *Biometrics*:. 248-263.

