

Formulasi Nanopartikel Losartan dengan Pembawa Kitosan (Formulation of Losartan Nanoparticles with Chitosan as a Carrier)

NURI ARI EFIANA^{1,2}, AKHMAD KHARIS NUGROHO^{1,2*}, RONNY MARTIEN¹

¹Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta.

²Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Janturan, Umbulharjo, Yogyakarta.

Diterima 17 Februari 2012 , Disetujui 13 Maret 2013

Abstrak: Nanopartikel semakin banyak dikembangkan untuk meningkatkan transpor sistemik obat pada berbagai rute penghantaran. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi optimal pada pembentukan nanopartikel kitosan dengan losartan, suatu senyawa antagonis reseptor angiotensin II yang digunakan sebagai anti hipertensi. Metode yang digunakan adalah *ionic gelation*. Formulasi dilakukan dalam 2 tahap. Pertama, penentuan konsentrasi losartan dan kitosan terbaik yang dapat membentuk nanopartikel yang stabil secara fisik (tidak terjadi pengendapan), yang ditunjukkan dengan uji penyimpanan pada suhu kamar selama 25 hari. Kedua, optimasi formula dengan metode desain faktorial dengan dua variabel yaitu pH (4,0 dan 5,0) dan kecepatan pengadukan (350 dan 700 rpm), dengan respon yang diamati yaitu *loading capacity*. Nanopartikel yang terbentuk dievaluasi ukuran partikel dan zeta potensialnya. Hasil uji stabilitas fisik nanopartikel menunjukkan formula dengan kadar losartan-kitosan (14 mg% : 35 mg%) serta losartan-kitosan (21 mg% : 35 mg%) mempunyai stabilitas yang baik. Hasil uji optimasi proses menunjukkan bahwa pH 4,0 dan kecepatan pengadukan 350 rpm merupakan kondisi optimal yang menghasilkan *loading capacity* terbesar (47,7%). Nanopartikel yang stabil mempunyai ukuran 290,3±52,6 nm dengan zeta potensial +50,8±4,8 mV.

Kata kunci: losartan, kitosan, nanopartikel, desain faktorial.

Abstract: Nanoparticle formulation is important for systemic drug delivery via several routes. This research was aimed to establish optimal formation of chitosan nanoparticle formulation with losartan, an antihypertension known as an angiotensin II receptor antagonist. Ionic gelation method was used. Formulation was established in 2 steps. Firstly, determination of the best losartan and chitosan concentrations which can produce physically stable nanoparticles without precipitation, at room temperature within 25 days. Secondly, optimization of the process by factorial design method of two factors, including pH (4.0 and 5.0) and the stirring rate (350 and 700 rpm), with the loading capacity of the nanoparticle as the observed response. The obtained nanoparticles were evaluated further for its particle size and zeta potential. The physichal stability tests indicated that two nanoparticle formulations containing losartan-chitosan of (14 mg% : 35 mg%), and losartan-chitosan of (21 mg% : 35 mg%) were stable. The factorial design studies suggested that pH 4 and the stirring rate of 350 rpm were the optimal conditions which produced the highest loading capacity (47,7%). The particle size and zeta potential of the stable nanoparticle were 290.3±52.6 nm and +50.8 ±4.8 mV respectively.

Key words: losartan, chitosan, nanoparticle, factorial design.

* Penulis korespondensi, Hp. 081802699951
e-mail: a.k.nugroho@ugm.ac.id

PENDAHULUAN

LOSARTAN merupakan antagonis reseptor angiotensin II yang mempunyai selektifitas yang tinggi dan digunakan pada terapi hipertensi. Bioavailabilitas losartan relatif rendah (hanya 33%) karena mengalami metabolisme hepatic yang intensif oleh enzim sitokrom P450 (CYP2C9 dan CYP3A4)⁽¹⁾. Waktu paruh eliminasi losartan juga relatif pendek yaitu $2,1 \pm 0,7$ jam⁽²⁾. Kedua kondisi ini membuat pemberian obat secara oral kurang ideal sehingga pengembangan sistem penghantaran obat alternatif menjadi sangat penting.

Beberapa rute penghantaran obat secara sistemik dapat dipertimbangkan, misalnya rute transdermal (melewati kulit secara non invasif), rute nasal (melewati rongga hidung) maupun pulmonar (melewati alveoli pada paru-paru). Pengembangan sediaan alternatif tersebut menjadi lebih menarik dan menjanjikan bila dikombinasi dengan formulasi sediaan dalam bentuk enkapsulasi nanopartikel, sebagaimana dilaporkan dalam beberapa penelitian terdahulu dengan beberapa tipe obat^(3,4,5).

Dalam penghantaran obat transdermal banyak digunakan polimer sebagai pembawa obat. Salah satu biopolimer yang sering digunakan adalah kitosan. Kitosan (poli [β -(1-4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranosil]) sebagai bahan pembawa mempunyai sifat yang menguntungkan yaitu bermuatan positif (kationik), *biodegradable*, biokompatibel dan nontoksik⁽⁶⁾. Kitosan nanopartikel mendapat perhatian penting sebagai sistem penghantaran obat, karena stabilitas yang baik, toksisitas yang rendah dan metode preparasinya yang cukup sederhana. Ukurannya yang kecil (nanometer) tidak hanya cocok untuk pemberian secara parenteral, tetapi juga cocok untuk pemberian secara non parenteral⁽⁷⁾.

Pada penelitian ini dilakukan formulasi nanopartikel losartan dengan bahan pembentuk *cross-link* natrium tripolifosfat dengan metode *ionic gelation*^(8,9). Optimasi formula dilakukan menggunakan desain faktorial dengan dua variabel yaitu pH (4,0 dan 5,0) dan kecepatan pengadukan (350 dan 700 rpm), dengan respon yang diamati adalah *loading capacity*⁽⁹⁾. Nanopartikel yang terbentuk juga dievaluasi ukuran partikel dan zeta potensialnya⁽¹⁰⁾.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalium losartan (derajat farmasi, diperoleh dari PT Kalbe Farma Jakarta), kitosan dan natrium tripolifosfat derajat *pro-analysis* (Sigma Aldrich). Bahan untuk membuat dapar semua berderajat *pro-analysis* (E Merck), yaitu natrium klorida, kalium

klorida, dinatrium hidrogen fosfat, kalium dihidrogen fosfat, asam asetat, natrium asetat. *Aquabidest* steril untuk injeksi (Ikapharmindo) digunakan sebagai pelarut untuk membuat larutan dapar.

Alat. Neraca analitik dengan kepekaan 0,1 mg (AND), *magnetic stirrer* (Cimarec), sonikator (Transsonic 570 Elma Germany), pH meter (HI 8314 HANNA), sentrifuga (Sorvall Biofuge Primo R), *freeze dryer* (Benchtop K Virtis), *particle size analyser* dan *zeta sizer analyser* (Beckman Coulter DelsaTM Nano).

METODE. Pembuatan nanopartikel kitosan losartan (tahap I). Pada percobaan ini (tahap 1) dilakukan optimasi formula dengan variasi kadar kitosan dan kadar losartan dengan model matrik yang disajikan pada Tabel 1. Pembuatan nanopartikel kitosan losartan dilakukan dengan mencampurkan 1,5 mL larutan kitosan (dalam dapar asetat 0,15 M pH 5,0) dengan 0,3 mL larutan losartan (dengan kadar seperti yang tertera pada Tabel 1).

Tabel 1. Formula nanopartikel kitosan-losartan.

		Kadar kalium losartan (mg %)				
		14	21	28	35	42
Kadar kitosan (mg%)	7	F1	F2	F3	F4	F5
	14	F6	F7	F8	F9	F10
	21	F11	F12	F13	F14	F15
	28	F16	F17	F18	F19	F20
	35	F21	F22	F23	F24	F25
	42	F26	F27	F28	F29	F30
	49	F31	F32	F33	F34	F35

Keterangan:

F1: formula 1 dengan kadar kalium losartan 14 mg% dan kadar kitosan 7 mg%; F2: formula 2 dengan kadar kalium losartan 21 mg% dan kadar kitosan 7 mg%, dan seterusnya.

Campuran kitosan dan losartan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 500 rpm pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian ditambah 0,3 mL larutan natrium tripolifosfat (TPP) 14 mg%. Pengadukan dilanjutkan hingga 30 menit kemudian disonikasi selama 20 menit⁽⁹⁾. Selama proses pengadukan tersebut sediaan dijaga agar terlindung dari cahaya⁽¹¹⁾. Nanopartikel kitosan yang mengandung losartan tersebut disimpan dalam kondisi terlindung dari cahaya untuk diuji stabilitasnya selama penyimpanan dalam waktu tertentu.

Evaluasi terhadap formula yang dihasilkan dilakukan sesaat setelah dibuat dan setelah disimpan yaitu terbentuknya *opalescent* (digambarkan sebagai sediaan cair yang homogen, agak buram, tidak tampak

adanya partikel mengapung atau melayang dalam sediaan tersebut, dan tidak terbentuk endapan).

Optimasi formula dengan desain faktorial (tahap II). Berdasarkan percobaan tahap I di atas, dipilih formula yang dapat membentuk *opalescent* dan yang paling stabil dengan kadar losartan tertinggi, untuk kemudian digunakan dalam percobaan selanjutnya.

Pada percobaan tahap dua ini dilakukan optimasi formula dengan menggunakan desain faktorial dengan dua variabel bebas yaitu pH dan kecepatan pengadukan (rpm), masing-masing pada dua level (rendah dan tinggi). Respon yang diamati (sebagai variabel tergantungnya) yaitu *loading capacity* nanopartikel losartan. Analisis desain tersebut secara statistik dilakukan dengan menggunakan fitur *Design of Experiment* pada perangkat lunak Minitab versi 16. Desain eksperimental tersebut disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Desain faktorial dengan 2 faktor dan 2 aras pada formulasi nanopartikel kitosan-losartan.

Percobaan (run)	Kode		Nilai	
	Kecepatan pengadukan	pH	Kecepatan pengadukan (rpm)	pH
-1	-1	-1	350	4
a	1	-1	700	4
b	-1	1	350	5
ab	1	1	700	5

Keterangan:

Respon yang diamati adalah besarnya *loading capacity* nanopartikel losartan.

Penghitungan *loading capacity* nanopartikel losartan^(12,13). Masing-masing formula terpilih disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 45 menit pada suhu 10°C. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dari endapannya. Kadar losartan bebas (yang tidak terenkapsulasi) dalam supernatan dianalisis menggunakan HPLC dengan detektor UV pada panjang gelombang 223 nm, fase gerak campuran larutan 0,05 M dapar asetat pH 4,0 dan asetonitril (60:40 v/v), kecepatan alir 1 mL/menit dan fase diam Lichrospher RP 18 250-4 (5 µm)⁽¹⁴⁾.

Parameter *loading capacity* (LC) dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$LC (\%) = \frac{(\sum \text{obat total} - \sum \text{obat bebas}) \times 100}{\text{bobot nanopartikel}}$$

Jumlah obat total adalah jumlah losartan yang digunakan dalam formulasi, sedangkan jumlah obat bebas adalah jumlah losartan yang tidak termuat (*unloaded*) dalam nanopartikel. Untuk perhitungan

bobot nanopartikel (dalam mg) diperoleh dengan menimbang endapan hasil sentrifugasi yang sudah di *freeze dried* (di mana endapan tersebut adalah nanopartikel yang terbentuk).

Formula terbaik hasil optimasi di-*scaling up* 10 kali (volume 2,1 mL menjadi 21 mL). Hasil *scaling up* dihitung kembali *loading capacity*-nya. Produk nanopartikel yang dihasilkan dikarakterisasi ukuran partikel serta zeta potensialnya masing-masing dengan menggunakan *particle size analyzer* dan *zeta size analyzer*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi formula nanopartikel kitosan-losartan.

Pembuatan nanopartikel kitosan-losartan menunjukkan bahwa dispersi losartan yang baik terbentuk pada formula dengan kadar losartan 14, 21 dan 28 mg% dengan kadar kitosan 7, 14, 21, 28 dan 35mg% (Tabel 1). Pada kondisi yang lain, *opalescent* tidak terbentuk dan beberapa formula (dengan kadar losartan dan kitosan yang besar) terjadi pengendapan, yang diduga terjadi karena pembentukan partikel yang lebih besar.

Hasil uji stabilitas fisik nanopartikel (Tabel 3) menunjukkan formula yang paling stabil (tidak terjadi endapan sampai hari ke-25) adalah Formula 21 dan Formula 22 dengan kadar losartan-kadar kitosan (14 mg%:35 mg%) dan (21 mg%:35 mg%). Hal ini menunjukkan bahwa kadar losartan maupun kitosan sangat berperan dalam pembentukan nanopartikel. Semakin besar kadar kalium losartan dan kitosan ternyata dapat menyebabkan pembentukan partikel yang lebih besar, sehingga pembentukan nanopartikel tidak optimum. Penelitian sejenis pernah dilakukan oleh Campos dkk⁽¹⁵⁾ yang membuat nanopartikel kitosan dengan obat siklosporin A yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi kitosan yang digunakan maka ukuran partikel yang terbentuk semakin besar. Selvaraj dkk⁽¹⁶⁾ melakukan penelitian dengan asiklovir, mengamati fenomena yang sama bahwa semakin tinggi konsentrasi kitosan yang digunakan maka ukuran partikel yang terbentuk juga semakin besar. Partikel yang besar dalam ukuran mikrometer dengan cepat akan membentuk endapan, sehingga kondisi *opalescent* tidak terjadi.

Hasil penelitian Tahap I dilanjutkan dengan proses optimasi kondisi pembuatan formula dengan menggunakan metode desain faktorial. Faktor yang dikaji pada 2 aras yaitu kecepatan pengadukan (350 dan 700 rpm) dan nilai pH (4 dan 5). Hasil analisis desain faktorial menunjukkan bahwa respon optimum (tertinggi) untuk *loading capacity* sebesar 47,7% dapat diperoleh pada kondisi pH 4,0 dengan kecepatan pengadukan 350 rpm. Berdasarkan hasil di atas dapat

Tabel 3. Pengamatan stabilitas fisik nanopartikel losartan pada penyimpanan selama 25 hari.

Formula	Pengamatan hari ke-									
	1	2	3	4	5	10	15	20	25	
F1	-	-	+1	+1	+1	+2	+2	+2	+2	+2
F2	-	-	+1	+1	+1	+2	+2	+2	+2	+2
F3	-	-	+1	+1	+1	+2	+2	+2	+2	+2
F6	-	+1	+1	+1	+2	+2	+2	+2	+2	+2
F7	-	+1	+1	+1	+1	+2	+2	+2	+2	+2
F8	-	+1	+1	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
F11	-	+1	+1	+1	+1	+2	+2	+2	+2	+2
F12	-	+1	+1	+1	+1	+2	+2	+2	+2	+2
F13	-	+1	+1	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
F16	-	-	-	-	-	-	+2	+2	+2	+2
F17	-	-	-	-	-	-	+1	+1	+1	+1
F18	-	-	+1	+1	+1	+2	+2	+2	+2	+2
F21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F23	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Keterangan formula:

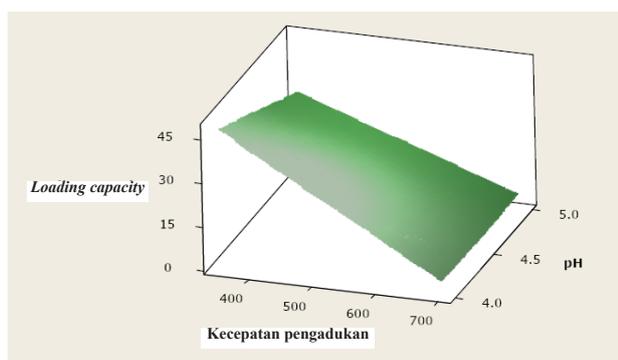
F1, F6, F11, F16 dan F21: formula dengan kadar kalium losartan 14 mg% dan kadar kitosan masing-masing 7,14,21,28 dan 35 mg%.

F2, F7, F12, F17 dan F22: formula dengan kadar kalium losartan 21 mg% dan kadar kitosan masing-masing 7,14,21,28 dan 35 mg%.

F3, F8, F13, F18 dan F23: formula dengan kadar kalium losartan 28 mg% dan kadar kitosan masing-masing 7,14,21,28 dan 35 mg%.

Keterangan hasil:

Negatif (-): tidak terbentuk endapan, kondisi *opalescent*; +1: terbentuk endapan sedikit, masih dapat didispersikan kembali; +2: terbentuk endapan yang sulit untuk didispersikan kembali, membentuk *cake*.



Gambar 1. *Surface plot* 3 dimensi parameter *loading capacity* pada desain faktorial nanopartikel kitosan-losartan.

dilihat bahwa pH mempunyai pengaruh yang penting dalam menghasilkan formula nanopartikel dengan *loading capacity* yang besar. Dengan demikian pH 4,0 adalah pH optimum yang memberikan respon maksimum. Pada pH 4,0 tersebut, dengan pKa kitosan 6,5 maka jumlah gugus $-NH_3^+$ pada kitosan mencapai hampir 99% terion, sehingga berpeluang lebih besar untuk berikatan dengan losartan maupun TPP⁽¹⁷⁾.

Losartan pada pH 4,0 dengan pKa 3,15, mempunyai

jumlah ion sekitar 80% dan TPP mempunyai jumlah ion lebih dari 90%, berhubungan dengan banyaknya molekul yang dapat terion pada pH tersebut. Interaksi yang terjadi di sini adalah interaksi ionik⁽¹⁸⁾ sehingga jumlah ion akan mempengaruhi kompleks yang terbentuk.

Kecepatan pengadukan saat pembuatan nanopartikel juga mempengaruhi ukuran partikel yang dihasilkan. Pada pembuatan nanopartikel dengan metode *ionic gelation* biasanya menggunakan *mild stirring* yaitu pengadukan dengan kecepatan yang konstan dan pelan dengan pengaduk magnetik selama waktu tertentu^(9,19).

Hasil analisis optimasi dengan metode desain faktorial menggunakan perangkat lunak Minitab 16 memberikan korelasi antara parameter *loading capacity* (LC) losartan dalam nanopartikel kitosan dengan kecepatan pengadukan (KP) dan pH, yang dapat dinyatakan secara matematis dengan persamaan berikut:

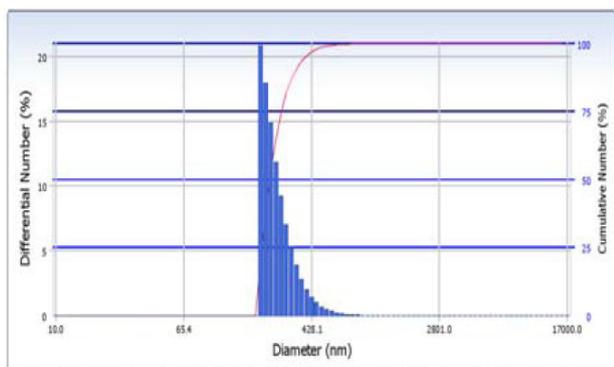
$$LC = 230.06 - 0.32.KP - 34.74.pH + 0.05.KP.pH$$

Persamaan tersebut mengindikasikan bahwa kecepatan pengadukan dan pH masing-masing berkontribusi negatif terhadap *loading capacity*. Semakin besar nilai masing-masing faktor berakibat menurunkan *loading capacity*. Meskipun interaksi antara kecepatan pengadukan dan pH berkontribusi positif namun karena nilai koefisiennya yang jauh lebih rendah menjadikan pengaruhnya tidak sebesar pengaruh individual kedua faktor tersebut.

Selanjutnya proses *scaling up* dilakukan sesuai dengan kondisi tersebut di atas. Hasil yang diperoleh ternyata menunjukkan penurunan *loading capacity* menjadi 35,9% (n=3) dengan CV yang rendah yaitu 2,94%.

Karakterisasi nanopartikel kitosan-losartan.

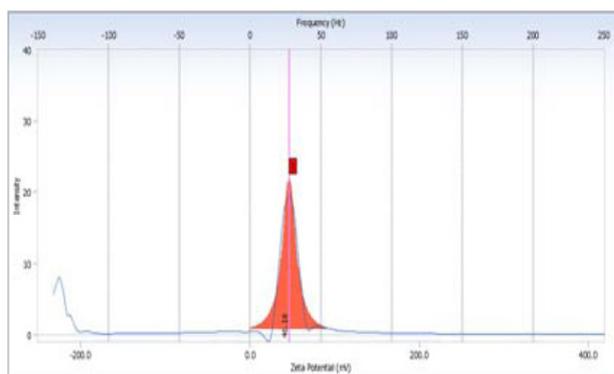
Hasil pengamatan ukuran partikel menggunakan *particle size analyser* disajikan pada Gambar 2. Nanopartikel kitosan-losartan yang diperoleh mempunyai diameter rata-rata $290,3 \pm 52,6$ nm (n=3), dengan *polydispersibility index* sebesar 0,296. Hasil ini mirip dengan beberapa penelitian terdahulu dalam pembuatan kitosan nanopartikel dengan TPP sebagai *crosslinking agent* secara *ionic gelation*, yang menghasilkan nanopartikel kitosan dengan ukuran partikel 200-400 nanometer⁽⁸⁾. Partikel dengan ukuran kurang dari 400 nm mempunyai kemampuan yang baik dalam penghantaran obat⁽²⁰⁾.



Gambar 2. Profil distribusi ukuran partikel nanopartikel kitosan-losartan, dengan diameter rata-rata: $290,3 \pm 52,6$ nm (n=3).

Banyak faktor yang mempengaruhi ukuran partikel yang terbentuk. Selain metode pembuatannya, terdapat faktor lain yaitu perbandingan antara jumlah kitosan dan TPP yang digunakan, perbandingan antara jumlah kitosan dengan obat (yang akan terenkapsulasi di dalamnya) dan faktor pH.

Hasil pengukuran zeta potensial dengan menggunakan *zeta size analyzer* disajikan pada Gambar 3. Hasil pengukuran menunjukkan muatan nanopartikel dengan zeta potensial rata-rata $+50,8 \pm 4,8$ mV. Nilai parameter ini masuk dalam



Gambar 3. Hasil pengukuran zeta potensial nanopartikel kitosan-losartan dengan nilai rata-rata: $+50,8 \pm 4,8$ mV (n = 3).

rentang normal untuk kitosan nanopartikel yang dibuat dengan metode *ionic gelation* dengan TPP sebagai *cross-linking agent*, yaitu antara $+25$ mV sampai dengan $+54$ mV^(8, 9). Stabilitas suatu dispersi cair juga dipengaruhi oleh muatan partikel, yang mempengaruhi gaya tolak-menolak antar partikel. Jika zeta potensial suatu partikel semakin mendekati nol maka suatu sistem semakin stabil^(13, 20).

Stabilitas nanopartikel dapat dievaluasi berdasarkan terbentuk tidaknya endapan. Kecepatan pengendapan dipengaruhi oleh gaya vertikal (gaya gravitasi) dan gaya horizontal (gerak Brown). Semakin kecil ukuran partikel, semakin kecil pula massanya dan semakin kecil pula gaya vertikal/gravitasinya. Semakin kecil ukuran akan memperluas permukaan partikel. Hal ini menyebabkan muatan di permukaan partikel juga semakin besar sehingga akan meningkatkan gaya tolak-menolak antar partikel. Gerakan tidak beraturan yang disebabkan oleh gaya tolak-menolak antar partikel ini disebut gerak Brown. Pada formulasi nanopartikel yang stabil, gerak Brown lebih dominan dibandingkan gaya gravitasinya⁽²⁰⁾. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa suatu sistem akan stabil jika partikelnya mempunyai zeta potensial di atas $+30$, atau di bawah -30 ⁽²⁰⁾.

SIMPULAN

Nanopartikel losartan yang dibuat dengan metode *ionic gelation* dan menghasilkan stabilitas fisik nanopartikel yang terbaik, dapat diperoleh dengan perbandingan kadar losartan-kitosan (14 mg% : 35 mg%) dan (21 mg% : 35 mg%). Berdasarkan desain faktorial *loading capacity* terbesar ($47,7\%$) nanopartikel kitosan-losartan dapat dibuat dengan kecepatan pengadukan 350 rpm dan pH $4,0$. Nanopartikel yang diperoleh dengan kondisi tersebut mempunyai diameter rata-rata $290,3 \pm 52,6$ nm dan zeta potensial $+50,8 \pm 4,8$ mV, yang menunjukkan nanopartikel yang stabil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dengan Hibah Kompetensi DIKTI tahun 2009 – 2011.

DAFTAR PUSTAKA

1. Diez J. Review of the molecular pharmacology of losartan and its possible to stroke prevention in patients with hypertension. *Clinic Therap.* 2006.28(6):832-48.
2. Vijayan V, Sumanth MH, Suman L, VinayT, Srinivasrao D, Kumar KJ. Development and physiochemical, In vitro evaluation of antihypertensive transdermal patches. *J Pharm Sci & Res.* 2010.2(3):171-7.
3. Hafner A, Lovrić J, Pepić I, Filipović-Grčić J. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J Microencapsul.* 2011.28(8):807-15.
4. Slütter B, Bal S, Keijzer C, Mallants R, Hagenaaers N, Que I, *et al.* Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. *Vaccine.* 2010.28(38):6282-91.
5. Sung JC, Padilla DJ, Garcia-Contreras L, Verberkmoes JL, Durbin D, Peloquin CA, *et al.* Formulation and pharmacokinetics of self-assembled rifampicin nanoparticle systems for pulmonary delivery. *Pharm. Res.* 2009.26(8):1847-55
6. Majeti NV, Kumar R. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000.46:1-27.
7. Tiyaboonchai W. Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan Univ J.* 2003.11(3):51-66.
8. Patel JK, Jivani NP. Chitosan based nanoparticles in drug delivery. *Int Phar Sci Nanotech.* 2009.2(2):517-22.
9. Racovita S, Vasiliu S, Popa M, Luca C. Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their application as drug delivery systems review. *Revue Roumaine de Chimie.* 2009.54(9):709-18.
10. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles – A Review. *Trop. J Pharm Research.* 2006.5(1):561-73.
11. Seburg RA, Ballard, JM, Hwang TL, Sullivan CM. Photosensitized degradation of losartan potassium in an extemporaneous suspension formulation. *J Pharm Biomed Anal.* 2006.42(4):411-22.
12. Jang K and Lee G. Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. *J Agric Food Chem.* 2008.56:1936-41.
13. Saha P, Goyal AK, Rath G. Formulation and evaluation of chitosan-based ampicillin trihydrate nanoparticles. *Trop J Pharm Research.* 2010.9(5):483-8.
14. Binarjo A. Pengaruh kadar obat, kadar propilen glikol dan lama praperlakuan dengan asam oleat terhadap transpor transdermal losartan *in vitro* [tesis]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; 2010.
15. Campos AM, Sanchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles: A new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int J Pharm.* 2001.224:159-68.
16. Selvaraj S, Saravanakumar N, Karthikeyan J, Evangeline D, Rajendran L. Acyclovir loaded chitosan nanoparticles for ocular delivery. *Der Pharmacia Lettre.* 2010.2(3):420-31.
17. Sinko PJ. *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 187-229.
18. Manmode AS, Sakarkar DM, Mahajan NM. Nanoparticles-tremendous therapeutic potential: A review. *Int J PharmTech Res.* 2009.1(4):1020-7.
19. Dustgani A, Farahani EV, Imani M. Preparation of chitosan nanoparticles loaded by dexamethasone sodium phosphate. *Iranian J Pharm Sci.* 2008.4(2):111-14.