



## Nanogel Synthesis Of Chitosan-Alginate-Siam Orange (*Citrus nobilis* Lour) Extract and Its Antibacterial Activity

Eva Yulia Pradita dan Sri Wahyuni✉

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang  
Gedung D6 Kampus Sekaran Gunungpati Telp. (024)8508112 Semarang 50229, Indonesia

### Info Artikel

Diterima : 8 Feb 2023

Disetujui : 8 Maret 2023

Dipublikasikan : Mei 2023

#### Keywords:

jeruk siam  
kitosan-alginat  
nanogel  
antibakteri

### Abstrak

Buah jeruk menghasilkan 44% kulit sebagai limbah. Limbah ini dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk membuat nanogel ekstrak kulit jeruk yang dimodifikasi dengan kitosan-alginat (rasio massa kitosan/alginat adalah 2:1; 2,5:1, 3:1). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh rasio massa kitosan-alginat terhadap nanogel ekstrak kulit jeruk siam. Karakteristik nanogel berupa ukuran, zeta potensial, dan aktivitasnya sebagai antibakteri *S. aureus* dipelajari. Proses ekstraksi kulit jeruk siam dilakukan menggunakan metode distilasi uap. Hasil uji GC-MS menunjukkan limonen menjadi senyawa utama yang dihasilkan (95,48%), dengan rendemen minyak 0,68%. Analisa ukuran nanogel dikonfirmasi dengan PSA dan mendapatkan hasil sesuai urutan rasio massa kitosan/alginat secara berurutan sebesar 601,3 nm; 242,8 nm; 1967,1 nm. Zeta potensial diambil dari nanogel yang ukurannya paling kecil (242,8 nm) dengan hasil -6,6 mV. Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pada sampel minyak atsiri kulit jeruk siam dengan terbentuknya zona hambat di sekitar sampel pengujian dengan rentang diameter berada antara 18 mm–20 mm (dalam kategori kuat), sedangkan hasil pengujian pada ketiga sampel nanogel tidak terbentuk zona hambat yang menandakan bahwa sampel tersebut dalam kategori lemah/tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

### Abstract

Citrus fruits produce 44% of the peel as waste. This waste can be used as a raw material for making orange peel extract nanogel modified with chitosan-alginate (the mass ratio of chitosan/alginate is 2:1; 2.5:1, 3:1). This study aims to study the effect of the mass ratio of chitosan-alginate on siam orange peel extract nanogels. The characteristics of the nanogels in the form of size, zeta potential, and their activity as *S. aureus* antibacterials were studied. Siamese orange peel extraction process is carried out using the steam distillation method. The GC-MS test results showed limonene to be the main compound produced (95.48%), with an oil yield of 0.68%. The nanogel size analysis was confirmed by PSA and obtained results according to the order of the mass ratio of chitosan/alginate sequentially at 601.3 nm; 242.8nm; 1967.1 nm. The zeta potential was taken from the smallest nanogel (242.8 nm) with a yield of -6.6 mV. The results of the antibacterial activity test showed that there was inhibitory activity in the Siamese orange peel essential oil sample with the formation of an inhibition zone around the test sample with a diameter range between 18 mm–20 mm (in the strong category), while the test results on the three nanogel samples did not form an inhibition zone which indicates that the sample is in the weak category/does not have activity as an antibacterial.

## Pendahuluan

Produksi buah jeruk di Indonesia diperkirakan semakin meningkat dari tahun ke tahun, termasuk buah jeruk siam (*Citrus nobilis* L.). Semakin meningkatnya produksi buah jeruk, mengakibatkan limbah kulit jeruk yang dihasilkan semakin banyak. Salah satu pemanfaatan kulit jeruk yaitu dapat menghasilkan minyak atsiri yang didalamnya mengandung berbagai komponen senyawa kimia. Minyak atsiri kulit jeruk dapat diperoleh melalui proses ekstraksi dengan metode distilasi uap. Distilasi uap merupakan metode ekstraksi yang bersih dan ramah lingkungan karena penggunaan uap air sebagai pelarutnya. Ekstraksi distilasi uap biasanya menghasilkan kualitas minyak atsiri yang tinggi dengan waktu ekstraksi yang relatif lama (Machado *et al.*, 2022). Dalam semua sampel minyak atsiri dari kulit jeruk, ditemukan bahwa limonen adalah komponen yang paling melimpah, yang persentasenya berkisar antara 73,9 dan 97,6%. Limonen sendiri diketahui memiliki aktivitas anti-inflamasi, antioksidan, antimikroba, dan antikanker (Vieira *et al.*, 2018).

Kitosan dan alginat menjadi salah satu polisakarida alami yang sering digunakan karena pemanfaatannya yang cukup banyak dalam berbagai bidang. Banyak penelitian dan pengembangan yang intensif pada kitosan karena dianggap sebagai bahan yang berpotensi tinggi sebagai antibakteri yang kemungkinan besar dapat memodifikasi strukturalnya untuk sifat dan fungsi yang diinginkan. Kitosan memiliki sifat polielektrolit yang unik, dimana dapat membentuk gel, biodegradabilitas, biokompatibilitas, tidak beracun untuk jaringan hidup, dan sebagai sistem pengiriman obat (Hubert *et al.*, 2016). Alginat adalah polimer anionik alami yang berasal dari sel alga cokelat, termasuk *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum* dan beberapa strain bakteri (*Azotobacter*, *Pseudomonas*) (Szekalska *et al.*, 2016). Alginat memiliki sifat tidak beracun, mudah didapat dan memiliki biokompatibilitas yang sangat baik dalam tubuh manusia. Alginat juga dapat dengan mudah dibentuk menjadi beragam struktur semipadat atau struktur padat karena kemampuannya dalam transisi sol/gel (Zhang & Zhang, 2002). Sintesis kitosan-alginat ini diyakini dapat mempengaruhi hasil sintesis berupa ukuran partikel dan zeta potensialnya, sehingga diharapkan hasil yang diperoleh dapat berukuran nanometer. Menurut penelitian Lertsutthiwong *et al.* (2009), ukuran partikel hasil sintesis kitosan-alginat bergantung pada berat molekul kitosan, rasio massa kitosan/alginat, dan urutan penambahan kitosan selama formulasi. Ukuran partikel kitosan-alginat secara signifikan lebih besar daripada ukuran partikel alginat tanpa kitosan. Terlepas dari berat molekul kitosan, potensial zeta nanokapsul dengan dan tanpa kitosan dalam formulasi tidak terjadi perbedaan secara signifikan (Lertsutthiwong *et al.*, 2009).

Nanogel merupakan partikel skala nano yang dihasilkan oleh polimer ikatan silang tiga dimensi dengan rantai makromolekul hidrofilik atau amfifilik yang bisa ionik atau non-ionik. Nanogel terdiri dari berbagai bahan polimer alami, polimer sintetik, atau kombinasinya yang berperan pada enkapsulasi partikel molekul kecil, oligonukleotida, dan protein (Yin *et al.*, 2020). Nanogel memiliki banyak aplikasi, diantaranya yaitu dalam sistem penghantaran obat, terapi kanker, anestesi lokal, regenerasi tulang, antibakteri, dan antimikroba (Yadav *et al.*, 2017). Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai sintesis kitosan-alginat-ekstrak kulit jeruk siam (*Citrus nobilis* L.) serta uji aktivitasnya sebagai antibakteri *S. aureus*.

Antibakteri merupakan salah satu senyawa yang digunakan dalam menghambat bakteri. Antibakteri biasanya ditemukan dalam suatu senyawa hasil metabolit sekunder, seperti limonen. Mekanisme limonen sebagai antibakteri secara umum bekerja dengan cara merusak struktur dinding sel mengubah permeabilitas membran, mengganggu sintesis protein, dan menghambat kerja enzim (Pelczar, 2008). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif dan salah satu bakteri penyebab penyakit pada manusia. Sebagian besar bakteri *Staphylococcus aureus* menyerang pada kulit dan jaringan lunak seperti selaput lendir nares anterior, saluran gastro-intestinal, perineum, saluran genitourinari dan faring (den Heijer *et al.*, 2013). Hal ini menyebabkan berbagai infeksi pada manusia dan hewan dengan dampak yang signifikan pada kesehatan masyarakat (Luzzago *et al.*, 2014). Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai sintesis kitosan-alginat dengan variasi perbandingan massa untuk mendapatkan hasil yang berukuran nanometer dan penambahan ekstrak kulit jeruk siam, yang selanjutnya dapat di uji aktivitasnya sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus*.

## Metode

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian yaitu perbandingan massa kitosan-alginat (2:1; 2,5:1; 3:1), sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah karakteristik sediaan nanogel, stabilitas fisik sediaan nanogel, dan aktivitas antibakteri sediaan nanogel terhadap bakteri *S. aureus* dengan metode sumuran. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kulit jeruk siam, proses ekstraksi, sintesis nanopartikel, pembuatan sediaan nanogel, formulasi sediaan nanogel, dan uji aktivitas antibakteri sediaan nanogel terhadap bakteri *S. aureus*.

Alat yang digunakan yaitu pisau/gunting, blender, timbangan, seperangkat alat distilasi uap (skala industri/ukuran sedang), gelas ukur, gelas kimia, neraca analitik, sonikator, *hot plate*, *plastic wrap*, statif dan klem, *ball pipet*, botol vial, plastik bening, kaca arloji, spatula, pengaduk kaca, pipet tetes, pipet ukur, tabung reaksi, slide, cawan petri, jarum ose, pinset, penggaris, piknometer, *magnetit stirrer*, autoklaf (*GEA YX24LDJ*), oven (*Memert*), inkubator (*Memmert*), *Gas Chromatography Mass-Spectrometry* (*Shimadzu GC-MS 2010 Plus*), *Particle Size Analyzer* (*Horiba Scientific Nano Partica SZ-100*).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit jeruk siam (*Citrus nobilis* L.) yang diperoleh dari Restoran Bakso Soto & Es Teler Pak Yanto Payaman, Kecamatan Secang, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah. Selain itu, digunakan alginat ( $C_6H_8O_6$ )<sub>n</sub>, kitosan ( $C_6H_{11}NO_4$ )<sub>n</sub>, aquades, tween 80 ( $C_{64}H_{124}O_{26}$ )<sub>n</sub>, kalsium klorida ( $CaCl_2$ ) teknis, asam asetat ( $CH_3COOH$ ) teknis, karbopol 940, trietanolamin ( $C_6H_{15}NO_3$ )<sub>n</sub>, propilen glikol (57-55-6 rasemat) pa, kertas indikator pH universal, *Nutrient Agar*, antibiotik *amoxicillin*, *cutton swab* steril, bakteri *S. aureus*.

Proses ekstraksi kulit jeruk siam dilakukan menggunakan metode distilasi uap. Proses distilasi dijalankan sampai minyak kulit jeruk terekstrak seluruhnya dengan suhu 100°C selama 5 jam. Minyak atsiri yang dihasilkan kemudian dilakukan analisis persentase *Yield/rendemen* dan dilakukan identifikasi serta karakterisasi menggunakan GC-MS.

Nanopartikel kitosan-alginat dibuat dengan meneteskan secara perlahan 0,6 mL ekstrak ke dalam 20 mL larutan alginat 0,2% yang mengandung 1,1 mL tween 80 lalu dilakukan sonikasi selama 15 menit. Emulsi yang terbentuk kemudian ditambahkan dengan 4 mL larutan  $CaCl_2$  0,67% dan terus diaduk selama 30 menit, selanjutnya ditambahkan 4 mL larutan kitosan dengan variasi konsentrasi 0,4%; 0,5%; 0,6%, diaduk selama 30 menit dan didiamkan selama 24 jam. Hasil sintesis kitosan-alginat yang mengandung ekstrak limonen akan diperoleh dan siap dilakukan pengujian akhir yaitu ukuran partikel dan zeta potensial menggunakan PSA (Lertsutthiwong *et al.*, 2009).

Pembuatan basis gel dilakukan dengan membuat massa gel terlebih dahulu. Mula-mula karbopol dilarutkan dengan air panas kemudian ditambahkan campuran trietanolamin dan propilen glikol, lalu diaduk sampai homogen. Sampel hasil sintesis kemudian ditambahkan ke dalam massa gel dan diaduk sampai homogen.

Uji organoleptik pada sediaan nanogel meliputi aroma, warna, dan tekstur (Agustin & Taihuttu, 2021). Pada uji homogenitas, sediaan nanogel dioleskan pada slide. Jika warna gel merata, dan tidak ada yang menggumpal, nanogel dinyatakan memenuhi persyaratan homogenitas. Pengukuran pH dilakukan menggunakan kertas indikator pH Universal dengan cara diolesi 0,1 gram gel pada kertas indikator pH tersebut. Setelah itu, diamati dan dicocokkan warnanya dengan perbandingan kertas indikator pH. Uji daya sebar sediaan gel dilakukan dengan menimbang sediaan nanogel sebanyak 0,5 gram diletakkan di tengah cawan petri, lalu taruh cawan petri lagi, kemudian dilakukan pengukuran diameternya (Agustin & Taihuttu, 2021).

**Tabel 1.** Formulasi Sediaan Nanogel Minyak Atsiri Kulit Jeruk

Bahan	A	B	C
Karbopol	0,1019	0,1069	0,1027
Aquades	8,4523	8,4536	8,4520
Trietanolamin	0,2009	0,2085	0,2028
Propilen Glikol	0,5036	0,5176	0,5203
Nanoemulsi Kitosan-Alginat	0,7530	0,7517	0,7522

Pengujian aktivitas antibakteri pada sediaan nanogel menggunakan media yang dibuat dengan menggunakan metode sumuran. Langkah kerjanya adalah dengan menuangkan setiap 10 mL NA ke dalam 4 cawan petri yang sudah disiapkan, kemudian dibiarkan memadat. Setelah pematangan, di permukaan lapisan setiap cawan petri dibuat 4 sumur yang diberi jarak, lalu dengan hati-hati dioleskan secara zigzag bakteri *S. aureus* di cawan petri. Selanjutnya, sediaan sampel nanogel dan sampel minyak atsiri kulit jeruk dimasukkan ke dalam sumur di cawan petri untuk pengujian antibakteri, kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam pada 37°C. Setelah inkubasi 1x24 jam, amati zona hambat yang terbentuk dan ukur zonanya penghambatan dengan menggunakan penggaris/jangka sorong (Ariyanthini *et al.*, 2021).

## Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi kulit jeruk siam dilakukan menggunakan metode distilasi uap dengan kapasitas 5 kg. Metode distilasi uap digunakan karena metodenya yang paling sederhana dan dapat memisahkan zat dengan perbedaan titik didih yang tinggi. Selain itu, metode distilasi uap juga dapat menghasilkan minyak

atsiri dengan kualitas yang tinggi karena produk yang dihasilkan benar-benar murni (tidak bercampur dengan air). Proses ekstraksi dilakukan selama 5 jam dengan hasil minyak atsiri sebanyak 17 mL. Minyak atsiri kulit jeruk siam yang dihasilkan berwarna kuning bening dengan hasil rendemen sebesar 0,68% seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.

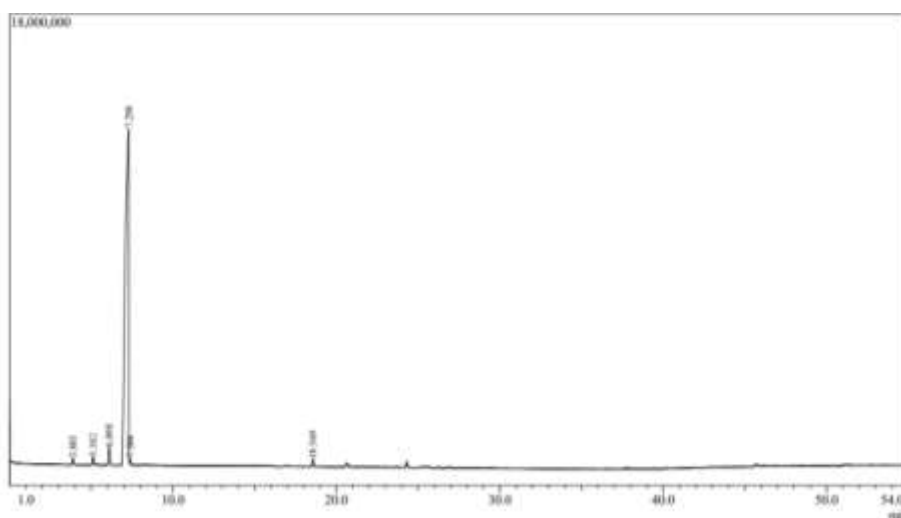


**Gambar 1.** Hasil Minyak Atsiri Kulit Jeruk Siam

Karakterisasi minyak atsiri kulit jeruk siam menggunakan alat *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) dilakukan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terkandung dalam minyak atsiri kulit jeruk siam terutama kadar limonennya. Kromatogram GC minyak atsiri kulit jeruk siam ditampilkan pada Gambar 2. Berdasarkan hasil karakterisasi pada minyak atsiri kulit jeruk siam, diperoleh senyawa-senyawa pada Tabel 2. Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2, dalam minyak atsiri kulit jeruk siam hasil ekstraksi menggunakan metode distilasi uap memiliki 6 senyawa, dengan senyawa utama limonen (95,48%), beta-myrcene (2,08%), dan 1-beta-pinene (0,82%) pada waktu retensi masing-masing 7,298; 6,098; dan 5,102. Berdasarkan hasil analisis GC-MS dapat diketahui bahwa minyak atsiri kulit jeruk siam terdiri dari 6 senyawa, dengan puncak no.4 pada gambar menunjukkan senyawa yang dominan, yaitu limonen sebesar 95,48%.

**Tabel 2.** Hasil Analisis GC-MS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Siam

Puncak	Waktu Retensi	Nama Senyawa	Area Puncak (%)
1	3,883	$\alpha$ -pinen	0,57
2	5,102	1- $\beta$ -pinen	0,82
3	6,098	$\beta$ -mirsen	2,08
4	7,298	1-limonen	95,48
5	7,384	$\beta$ -felandren	0,33
6	18,569	Linalool	0,72



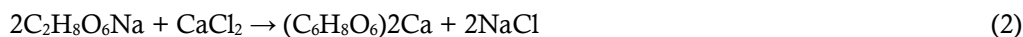
**Gambar 2.** Hasil GC-MS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Siam

**Tabel 3.** Perbandingan Hasil Uji GC-MS Minyak Atsiri Kulit Jeruk Siam

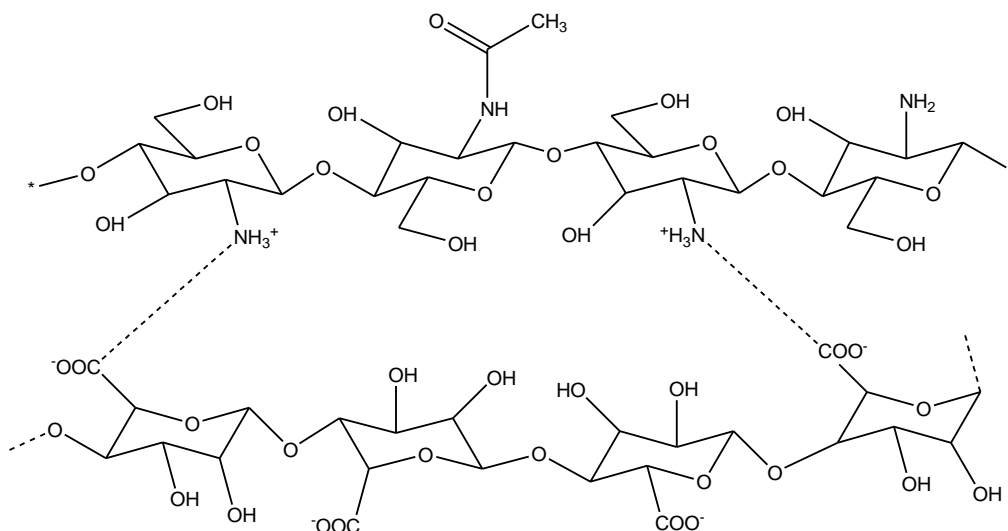
Hasil GC-MS dari Literatur (Ikarini <i>et al.</i> , 2021)		Hasil Uji GC-MS	
Nama Senyawa	Area Puncak (%)	Nama Senyawa	Area Puncak (%)
$\alpha$ -pinen	-	$\alpha$ -pinen	0,57
1- $\beta$ -pinen	2,215	1- $\beta$ -pinen	0,82
$\beta$ -mirsen	-	$\beta$ -mirsen	2,08
1-limonen	91,84	1-limonen	95,48
$\beta$ -felandren	0,84	$\beta$ -felandren	0,33
Linalool	0,81	Linalool	0,72

Berdasarkan Tabel 3, hasil uji GC-MS minyak atsiri kulit jeruk siam sesuai dengan literatur yang menunjukkan bahwa senyawa limonen menjadi komponen utama/senyawa yang mendominasi dalam minyak atsiri kulit jeruk siam. Sintesis nanopartikel kitosan-alginat dilakukan pada 3 variasi sampel yaitu sampel A (0,4%), sampel B (0,5%), dan sampel C (0,6). Penambahan tween 80 berfungsi sebagai surfaktan, dimana dapat membentuk misel dan emulsi yang dapat membungkus zat hidrofobik dan untuk mengurangi terjadinya aglomerasi (Nielsen *et al.*, 2016).

Penambahan  $\text{CaCl}_2$  sebagai agen *crosslinker* berfungsi sebagai pengikat silang antara rantai polimer. Penggunaan  $\text{CaCl}_2$  dengan konsentrasi yang rendah bertujuan agar tidak terjadi ikatan yang terlalu banyak antara ion  $\text{Ca}^{2+}$  dengan gugus karboksil ( $\text{COO}^-$ ) dari alginat. Jika ikatan yang terjadi terlalu banyak antara ion  $\text{Ca}^{2+}$  dengan gugus karboksil dari alginat, dapat mengakibatkan terjadinya repulsi (Annisa *et al.*, 2021). Natrium alginat yang direaksikan dengan  $\text{CaCl}_2$  akan terjadi pertukaran ion  $\text{Na}^+$  dari natrium alginat dengan  $\text{Ca}^{2+}$  dari larutan kalsium klorida sehingga akan membentuk hidrogel dengan model *egg box*. Reaksi antara natrium alginat dengan  $\text{CaCl}_2$  ditunjukkan pada reaksi 2.



Ketika kalsium alginat yang terbentuk direaksikan dengan kitosan maka gugus karboksil ( $\text{COO}^-$ ) pada alginat akan berikatan dengan  $\text{NH}_3^+$  pada kitosan (Umawiranda, 2014). Reaksi pembentukan kompleks polielektrolit antara kitosan dengan alginat disajikan pada Gambar 3.

**Gambar 3.** Reaksi Pembentukan Kompleks Polielektrolit Kitosan-Alginat

Reaksi yang terjadi pada saat pembentukan kompleks alginat dan kitosan interaksi elektrostatis dapat terbentuk melalui interaksi antara gugus amin yang meng-ion ( $\text{NH}_3^+$ ) bermuatan positif dengan ion karboksilat ( $\text{COO}^-$ ) yang bermuatan negatif. Selain itu, ikatan hidrogen juga dapat terbentuk antar gugus polar dalam kitosan seperti amin ( $\text{NH}_2$ ) dan karboksilat ( $\text{COOH}$ ) pada alginat. Ikatan yang terjadi meliputi ikatan kovalen, hidrogen atau elektrostatis. Besarnya ikatan kovalen, hidrogen atau elektrostatis ini berpengaruh pada sifat fisik dari kompleks kitosan-alginat (Uranga, *et al.*, 2019).

Menurut penelitian Ayuni *et al.*, (2018) membran kitosan-alginat berpotensi sebagai membran hemodialisa karena sifatnya yang dapat mengembang dalam air dan cukup elastis. Hal ini disebabkan karena ketika suatu biopolimer kontak dengan cairan, maka akan terjadi pengembangan akibat adanya termodinamika yang bersesuaian dan adanya gaya tarik yang disebabkan efek silang yang terjadi pada rantai polimer. Pengembangan membran kitosan-alginat kemungkinan disebabkan oleh masih adanya interaksi ionik antara gugus  $\text{NH}^{3+}$  dari kitosan dan ion  $\text{COO}^-$  dari alginat.



**Gambar 4.** Hasil Sintesis Kitosan-Alginat

**Tabel 4.** Hasil Uji PSA Ukuran Partikel

Nama Sampel	Ukuran partikel (Z-Average)	Indeks Polidispersitas
A	601,3	0,869
B	242,8	0,448
C	1967,1	0,614

Perlakuan sonikasi pada saat sintesis mengacu pada proses untuk mengaduk partikel dalam cairan dan mempercepat proses pelarutan suatu sampel dengan menggunakan prinsip pemecahan reaksi intermolekuler sehingga akan terbentuk partikel yang berukuran nano. Sonikasi biasanya menggunakan frekuensi ultrasonik (>20 kHz) yang prosesnya disebut juga dengan ultrasonikasi. Penggunaan hot plate magnetit stirrer berfungsi sebagai pengadukan dan pemanasan sampel ketika proses sintesis berlangsung. Hal ini bertujuan agar sampel menjadi homogen. Hasil sintesis nanopartikel berupa emulsi yang menghasikan warna putih keruh, seperti ditunjukkan pada Gambar 4.

Dalam karakterisasi *Particle Size Analyzer* (PSA) dilakukan analisis ukuran partikel untuk mengetahui ukuran partikel dan zeta potensial dalam sampel. Hasil karakterisasi sintesis nanopartikel dapat ditunjukkan pada Tabel 4. Tabel 4 menunjukkan bahwa terjadi perbedaan ukuran partikel yang disebabkan karena adanya pengaruh variasi konsentrasi kitosan pada masing-masing sampel. Ukuran partikel yang paling besar terdapat pada sampel C (rasio kitosan-alginat 0,6%:0,2%). Ukuran nanopartikel tersebut sangat signifikan lebih besar dari sampel B (rasio kitosan-alginat 0,5%:0,2%) dengan ukuran partikel 242,8 nm. Hal itu disebabkan karena adanya dugaan terjadi aglomerasi atau penggumpalan kembali saat proses sintesis (Liu *et al.*, 2011). Aglomerasi dapat terjadi jika penambahan tween 80 diatas kondisi optimum (>3%). Hal ini sesuai dengan penelitian Zhao *et al.*, (2010) dalam sintesis nanopartikel perak dengan variasi konsentrasi stabilisator bahwa penggunaan stabilisator dapat mengontrol ukuran nanopartikel perak jika berada dalam kondisi konsentrasi optimum. Apabila konsentrasi stabilisator diatas kondisi maksimum, justru menyebabkan stabilitas nanopartikel perak dapat terganggu. Selain itu, konsentrasi kitosan yang lebih tinggi juga dapat menyebabkan jumlah kitosan berlebih sehingga mengakibatkan ikatan pada kitosan cenderung tidak beraturan satu dengan yang lainnya (Katas *et al.*, 2012). Dalam penelitian Prego *et al.*, (2006) peningkatan ukuran partikel juga mengindikasikan bahwa adanya keterikatan antara polimer ke permukaan inti minyak. Peningkatan ini disebabkan karena kitosan terletak di permukaan polimer alginat yang menyebabkan adanya interaksi elektrostatik dan memungkinkan dapat meningkatkan stabilisasi dari inti minyak tersebut (Prego *et al.*, 2006).

Penentuan nilai indeks polidispersitas (PI) digunakan untuk mengukur heterogenitas atau lebar distribusi sampel berdasarkan ukuran. Nilai PI yang dihasilkan terbilang tinggi dikarenakan rentang nilai PI berada antara 0 sampai dengan 1, dimana nilai PI 0 menunjukkan dispersi yang homogen dan nilai PI lebih dari 0,5 menunjukkan heterogenitas yang tinggi (Avadi *et al.*, 2010). Dari data tersebut menggambarkan bahwa variasi kitosan yang dihasilkan masih memiliki sifat polidispersi dan memiliki distribusi ukuran partikel yang luas terutama pada sampel A dengan nilai PI sebesar 0,8.

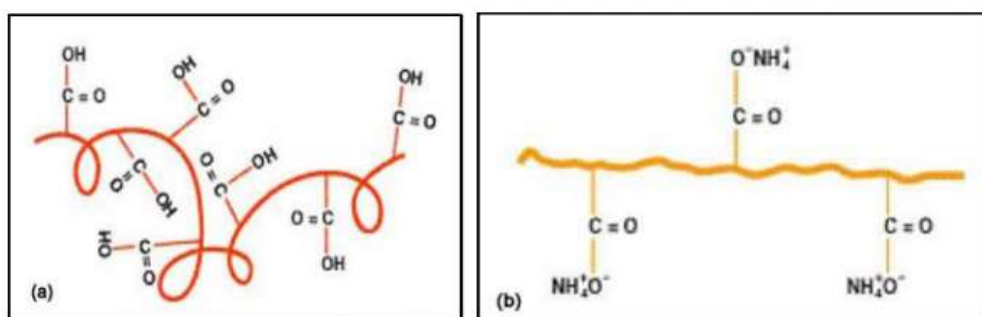
Zeta potensial merupakan perbedaan ukuran potensial antara sebagian besar cairan, dimana partikel terdispersi dan lapisan cairan yang mengandung muatan ion terikat secara berlawanan dengan permukaan partikel nano. Semakin tinggi besarnya zeta potensial menunjukkan peningkatan tolakan elektrostatik dan karenanya meningkatkan stabilitas. Partikel dengan zeta potensial positif akan berikatan dengan permukaan yang bermuatan negatif dan sebaliknya (Selvamani, 2019).

Tabel 5 menunjukkan bahwa nilai zeta potensial pada sampel memiliki nilai tidak lebih negatif dari -30 mV, sehingga nilai zeta potensial tersebut dinilai tidak stabil. Batas nilai stabil dan tidak stabilnya suatu suspensi umumnya berada pada nilai -30 atau +30 mV (Souto *et al.*, 2013). Partikel dengan zeta potensial lebih positif dari +30 mV atau lebih negatif dari -30 mV dianggap stabil (Moayedi & Kazemian, 2013). Nilai zeta potensial yang negatif disebabkan karena adanya ekstrak yang tidak terjerap oleh alginat dan kalsium klorida, serta alginat bebas yang tidak berikatan yang menyebabkan tidak terbentuknya sistem nanopartikel. Oleh karena itu, partikel dari ekstrak dan alginat menjadi bermuatan negatif yang menyebabkan zeta potensialnya juga bernilai negatif (Hasna, 2019). Menurut Selvamani (2019), nilai zeta potensial dari nanopartikel yang berukuran lebih rendah atau kurang dari -28 mV menunjukkan jika partikel-partikel tersebut mengalami aglomerasi. Hal itu diperkuat oleh penelitian Müller *et al* (2000) yang mengatakan bahwa nilai zeta potensial yang lebih tinggi (negatif atau positif), kemungkinan terjadinya agregasi partikel akan lebih kecil karena adanya tolakan listrik. Namun, jika partikel memiliki nilai zeta potensial yang lebih rendah (negatif atau positif), maka partikel tidak akan memiliki kekuatan untuk mencegah partikel itu datang secara bersama-sama dan akan terjadi flokulasi (Dhont, 1996).

**Tabel 5.** Hasil Pengukuran Zeta Potensial

Nama Sampel	Zeta Potensial	Mobilitas Elektroforesis	Viskositas Medium Dispersi	Konduktivitas	Tegangan Elektroda
B	-6,6 mV	-0,000405 cm <sup>2</sup> /Vs	0.895 mPa.s	0.098 mS/cm	3.8 V

Basis gel yang dipilih dalam penelitian ini adalah karbopol. Karbopol sebagai basis gel bersifat hidrofil yang dengan mudah terdispersi dalam air. Selain itu, karbopol juga memiliki viskositas yang tinggi pada konsentrasi rendah sehingga dapat menghasilkan gel dengan karakteristik organoleptik yang baik. Ketika karbopol dicampurkan dengan air, karbopol akan terdispersi dalam air melalui proses hidrasi molekul air dengan membentuk ikatan hidrogen (Anggraeni *et al.*, 2012). Karbopol mempunyai struktur senyawa kimia yang mana setiap ujung pada rantai mempunyai gugus RCOOH yang bersifat asam. Sebagian dari gugus karboksil pada struktur molekul karbopol akan membentuk gulungan yang tidak terionisasi, sehingga apabila pH pada dispersi karbopol ditingkatkan dengan penambahan suatu basa, maka secara progresif gugus karboksil akan terionisasi. Hal itu dapat mengakibatkan adanya gaya tolak-menolak antara gugus yang terionkan yang menyebabkan terjadinya ikatan hidrogen pada gugus karboksil (Florence & Atwood, 2006). Reaksi karbopol dengan penambahan basa disajikan pada Gambar 5.

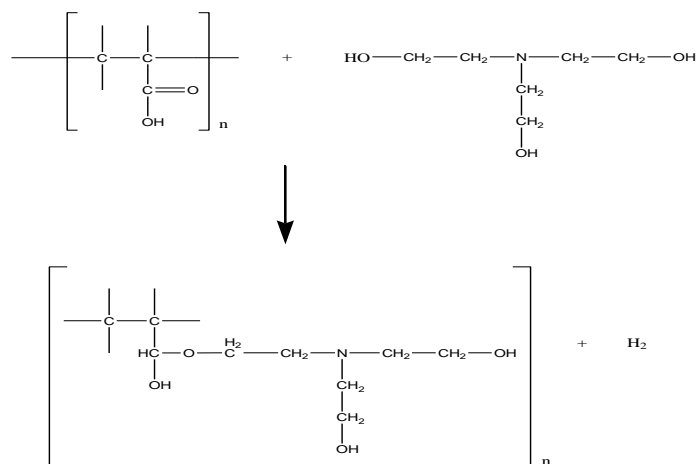


**Gambar 5.** Reaksi Karbopol dengan Penambahan Basa (a) Struktur Sebelum Ditambahkan Basa (b) Struktur Setelah Ditambahkan Basa (Jeon, 2007)

Dalam pembentukan massa gel, dibutuhkan agen penetralisasi karbopol agar karbopol tidak terlarut dalam air secara menyeluruh. Pemilihan trietanolamin sebagai agen penetralisasi disebabkan karena trietanolamin dapat memberi suasana basa pada karbopol sehingga dapat menghasilkan gel menjadi kental dan jernih (Septiawan, 2012). Reaksi pembentukan ikatan hidrogen antara karbopol dengan trietanolamin diduga disebabkan oleh gugus hidroksil (-OH) dan gugus karbonil (C=O) dari karbopol (Rowe *et al.*, 2009).



Semakin banyak ikatan hidrogen yang terbentuk, maka semakin kuat ikatan yang menyebabkan viskositasnya menjadi tinggi. Hal itu disebabkan karena pembentukan gel karbopol sangat dipengaruhi oleh proses ionisasi dari gugus karbonil, yang diduga berada pada pH asam sehingga menyebabkan gugus karbonil pada struktur molekul karbopol tidak terionisasi. Penambahan agen penetral trietanolamin dapat menghasilkan muatan negatif yang ditandai adanya tolakan elektrostatik. Akibat adanya tolakan elektrostatik tersebut terbentuklah struktur tiga dimensi yang membentuk massa gel yang padat. Oleh karena itu, banyaknya karbopol yang digunakan menentukan viskositas sediaan gel yang akan dibuat (Tsabitah *et al.*, 2020). Reaksi karbopol dengan trietanolamin disajikan pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Reaksi Karbopol dengan Trietanolamin

Propilen glikol merupakan bahan yang berfungsi sebagai humektan, dimana humektan dapat berperan untuk menjaga agar gel tetap stabil (Rowe *et al.*, 2009). Pengujian stabilitas fisik sediaan nanogel dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui sifat fisik dari suatu sediaan (nanogel). Uji stabilitas fisik sediaan nanogel ini meliputi uji organoleptik, uji pH, dan uji daya sebar.

Hasil uji organoleptik sediaan nanogel menunjukkan bahwa ketiga sampel memiliki aroma minyak kulit jeruk siam dari hasil sintesis yang ditambahkan pada saat pembuatan sediaan nanogel, berwarna bening, dan teksturnya yang berupa gel. Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa warna gel merata, dan tidak ada yang menggumpal. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Agustin & Taihuttu (2011) yang menyatakan bahwa nanogel memenuhi persyaratan homogenitas jika warna gel yang dioleskan pada slide merata dan tidak ada yang menggumpal.



**Gambar 7.** Sediaan Nanogel

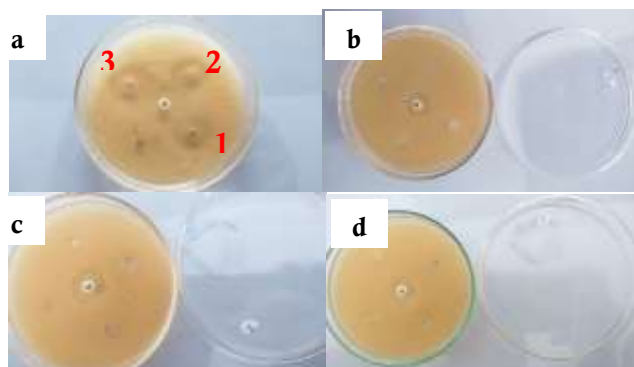
Pengukuran pH dilakukan menggunakan kertas indikator pH Universal dengan tujuan untuk mengetahui tingkat keasaman/kebasahan pada sampel yang dihasilkan. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa kertas indikator pH Universal berada pada pH 7, dimana pH yang tepat untuk kulit yaitu pada pH 5-10 (Sihombing, Christina Noventy, Nasrul Wathoni, 2006).

Pengujian daya sebar sediaan nanogel ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan sampel sediaan nanogel ketika diaplikasikan pada tempat penggunaannya. Hasil uji daya sebar sediaan nanogel menunjukkan bahwa sediaan nanogel tersebut memiliki luas sebaran awal sebesar 5,2 cm dan setelah 1



menit dilakukan pengukuran kembali dengan hasil luas sebaran sebesar 5,7 cm. Kisaran luas sebaran dari daya sebar sediaan gel yang baik berada pada rentang 5-7 cm (Garg *et al.*, 2002).

Pengujian aktivitas antibakteri dari sampel nanogel hasil sintesis kitosan-alginat dengan ekstrak kulit jeruk siam terhadap bakteri *S.aureus* menggunakan metode difusi sumuran dengan melakukan replikasi sebanyak tiga kali (triplo) selama 24 jam. Menurut Junanto, T., Sutarno, (2008), penggunaan metode sumuran dinilai lebih sensitif sehingga dapat dengan mudah dalam pengukuran zona hambat yang terbentuk. Hal itu disebabkan karena sampel tidak hanya beraktivitas diatas media saja, namun juga sampai di bawah (Junanto, T., Sutarno, 2008). Hasil uji aktivitas antibakteri *S. aureus* pada sampel nanogel dapat dilihat pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *S. aureus* (a) Minyak atsiri Kulit Jeruk Siam, (b) Sampel A, (c) Sampel B, (d) Sampel C

Gambar 8 menunjukkan bahwa ekstrak minyak atsiri kulit jeruk siam mempunyai daya hambat terhadap *S. aureus* yang ditunjukkan pada zona hambat yang terbentuk. Zona hambat minyak atsiri kulit jeruk siam yang terbentuk sebesar 19 mm, 18 mm, dan 20 mm, sedangkan zona hambat untuk sampel A, B, dan C tidak terbentuk atau tidak memiliki daya hambat terhadap bakteri *S. aureus*. Terbentuknya zona hambat pada minyak atsiri kulit jeruk siam sesuai dengan hipotesis bahwa ekstrak minyak atsiri kulit jeruk siam (*Citrus nobilis* L.) memiliki kemampuan daya hambat terhadap pertumbuhan *S. aureus* karena adanya senyawa aktif yang terdapat dalam minyak atsiri, yaitu limonen (Febrianti *et al.*, 2019). Menurut Febrianti *et al* (2019), limonen dapat menghambat pertumbuhan sel kanker, antioksidan, dan antibakteri.

Mekanisme limonen sebagai antibakteri bekerja dengan cara merusak struktur dinding sel yang dapat mengganggu kerja transport aktif dan kekuatan proton pada membran sitoplasma bakteri. Limonen akan mendentrasi dan menginaktifkan protein seperti enzim yang menyebabkan dinding sel bakteri mengalami penurunan permeabilitas dan kerusakan sehingga membuat transport ion organik pada bakteri dan metabolismenya terganggu dan mengakibatkan bakteri menjadi mati (Bota *et al.*, 2015). Hasil analisis uji aktivitas antibakteri *S. aureus* disajikan pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Hasil Analisis Uji Aktivitas Antibakteri *S. aureus*

Nama Sampel	Daya Hambat (mm)			Konsentrasi
	1	2	3	
Minyak atsiri kulit jeruk siam	19	18	20	5 $\mu$ L
A	-	-	-	0,5 g
B	-	-	-	0,5 g
C	-	-	-	0,5 g
Aquades (kontrol -)	-	-	-	5 $\mu$ L
<i>Amoxicillin</i> (kontrol +)	2,4	2,2	2,1	30 $\mu$ g

Tidak adanya zona hambat yang terbentuk pada sampel A, B, dan C, diduga disebabkan karena gugus amina positif pada kitosan yang berinteraksi dengan gugus karboksilat negatif alginat mengurangi jumlah gugus amina positif pada kitosan yang tersedia untuk berinteraksi dengan dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan tidak terbentuknya daya hambat dalam pengujian aktivitas antibakteri *S.aureus*. Pengujian aktivitas antibakteri pada ketiga sampel ini disebabkan karena adanya aktivitas antibakteri pada minyak atsiri kulit jeruk siam sebagai salah satu komponen penyusun nanogel. Oleh karena itu, melihat adanya aktivitas antibakteri pada minyak atsiri kulit jeruk siam tersebut, dilakukan pengujian pada hasil akhir

sediaan nanogel pada sampel A, B, dan C. Namun, hasil ketiga sampel menunjukkan tidak terbentuknya zona hambat. Hal ini diduga karena adanya interaksi elektrostatis antara kitosan dengan alginat sehingga membuat sampel tersebut tidak bisa aktif sebagai antibakteri.

### Simpulan

Pengaruh rasio massa kitosan dan alginat terhadap hasil sintesis nanogel ekstrak kulit jeruk siam (*Citrus nobilis* L.) ditunjukkan dengan adanya perbedaan hasil ukuran partikel pada masing-masing sampel, yaitu pada sampel A 601,3 nm; sampel B 242,8 nm; dan sampel C 1967,1 nm. Karakteristik hasil sintesis nanogel ekstrak kulit jeruk siam (*Citrus nobilis* L.) yang paling optimal terdapat pada variasi rasio massa kitosan-alginat 0.5%:0.2% dengan ukuran partikel sebesar 242,8 nm, indeks polidispersitas 0,448 dan zeta potensialnya sebesar -6,6 mV. Aktivitas antibakteri hasil sintesis nanogel ekstrak kulit jeruk siam (*Citrus nobilis* L.) tidak menunjukkan adanya zona hambat yang terbentuk pada sampel saat dilakukan uji antibakteri *S.aureus*, sehingga dinilai tidak efektif apabila diaplikasikan sebagai antibakteri *S. aureus*.

### Daftar Pustaka

- Agustin, R. D., & Taihutu, Y. M. J. (2021). Formulation And Physical Stability Test Of Hand Sanitizer Based On Nutmeg Oil (*Myristica fragrans* Houtt). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 800(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/800/1/012032>
- Anggraeni, Y., Hendradi, E., & Purwanti, T. (2012). Diklofenak Dalam Sistem Niosom Dengan Basis Gel. 1(1), 1–15.
- Annisa, V., Sulaiman, T. N. S., Nugroho, A. K., & Nugroho, A. E. (2021). Review Sinergisitas Kombinasi Polimer Alami Serta Pemanfaatan dalam Formulasi Obat. *Majalah Farmasetika*, 6(5), 436. <https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v6i5.35935>
- Ariyanthini, K. S., Angelina, E., Nanda, K., & Permana, B. (2021). Antibacterial Activity Testing Of Hand Sanitizer Gel Extract Of Coriander ( *Coriandrum Sativum* L .) Seeds Against *Staphylococcus aureus*. 3(2), 98–107.
- Avadi, M. R., Mir, A., Sadeghi, M., Dinarvand, R., & Rafiee-tehrani, M. (2010). Preparation And Characterization Of Insulin Nanoparticles Using Chitosan And Arabic Gum With Ionic Gelation Method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(1), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.007>
- Ayuni, N. P. S., Yuningrat, N. W., & Citra, N. W. (2018). Kajian Transpor Kreatinin Menggunakan Membran Kitosan-Alginat Tertaut Silang Polivinil Alkohol (PVA). *Jurnal Rekayasa Proses*, 12(2), 56. <https://doi.org/10.22146/jrekpros.38401>
- Bota, W., Martosupono, M., & Rondonuwu, F. S. (2015). Potensi Senyawa Minyak Sereh Wangi (*Citronella* Oil) Dari Tumbuhan *Cymbopogon Nardus* L. Sebagai Agen Antibakteri. *Jurnal FTUMJ*, November, 1–8.
- Den Heijer, C. D. J., van Bijnen, E. M. E., Paget, W. J., Pringle, M., Goossens, H., Bruggeman, C. A., Schellevis, F. G., & Stobberingh, E. E. (2013). Prevalence And Resistance Of Commensal *Staphylococcus Aureus*, Including Meticillin-Resistant *S Aureus*, In Nine European Countries: A Cross-Sectional Study. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(5), 409–415. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70036-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70036-7)
- Dhont, J. K. G. (1996). *An Introduction to Dynamics of Colloids*.
- Febrianti, D. R., Susanto, Y., Niah, R., & Latifah, S. (2019). Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Kulit Jeruk Siam Banjar (*Citrus reticulata*) Terhadap Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Pharmascience*, 6(1), 10. <https://doi.org/10.20527/jps.v6i1.6070>
- Florence, A. T., & Atwood, D. (2006). *Psychochemical Principles of Pharmacy* (4th ed). Pharmaceutical Press.
- Garg, A., Aggarwal, D., Garg, S., & K.Singla, A. (2002). Spreading of Semisolid Formulations An Update.
- Hasna, A. (2019). Preparasi Dan Karakterisasi Ekstrak Kwao Krua (*Pueraria mirifica*) Menggunakan Basis Crosslinked Kalsium Alginat Dengan Teknik Ultrasonikasi. Universitas Islam Indonesia.

- Hubert, Rivera, Spangler, Wu, Mack, Prager, Rich, Couce, McLendon, & Sloan. (2016). A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived From Human Glioblastomas Recapitulates The Hypoxic Gradients And Cancer Stem Cell Heterogeneity Of Tumors Found In Vivo. *Cancer Research*, 76(8), 2465–2477.
- Ikarini, I., Harwanto, & Yunimar. (2021). Karakteristik Fisik dan Identifikasi Senyawa pada Minyak Atsiri dari Limbah Kulit Jeruk. *Agriprima: Journal of Applied Agricultural Sciences*, 5(2), 131–137. <https://doi.org/10.25047/agriprima.v5i2.436>
- Junanto, T., Sutarno, S. (2008). Aktivitas Antimikroba Ekstrak Angsana (*Pterocarpus indicus*) terhadap *Bacillus subtilis* dan *Klebsiella pneumoniae*. ISSN:0216-6887 Vol.5., No.2.
- Katas, H., Hussain, Z., & Ling, T. C. (2012). Chitosan Nanoparticles As A Percutaneous Drug Delivery System For Hydrocortisone. *Journal of Nanomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/372725>
- Lertsutthiwong, P., Rojsitthisak, P., & Nimmannit, U. (2009). Preparation Of Turmeric Oil-Loaded Chitosan-Alginate Biopolymeric Nanocapsules. *Materials Science and Engineering C*, 29(3), 856–860. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.004>
- Liu, L., Duan, Y., Guo, J., Chen, L., & Liu, S. (2011). Influence Of Particle Size On The Electromagnetic And Microwave Absorption Properties Of Fesi / Paraffin Composites. *Physica B: Physics of Condensed Matter*, 406(11), 2261–2265. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2011.03.045>
- Luzzago, C., Locatelli, C., Franco, A., Scaccabarozzi, L., Gualdi, V., Viganò, R., Sironi, G., Besozzi, M., Castiglioni, B., Lanfranchi, P., Cremonesi, P., & Battisti, A. (2014). Clonal Diversity, Virulence-Associated Genes And Antimicrobial Resistance Profile Of *Staphylococcus aureus* Isolates From Nasal Cavities And Soft Tissue Infections In Wild Ruminants In Italian Alps. *Veterinary Microbiology*, 170(1–2), 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.016>
- Machado, C. A., Oliveira, F. O., de Andrade, M. A., Hodel, K. V. S., Lepikson, H., & Machado, B. A. S. (2022). Steam Distillation for Essential Oil Extraction: An Evaluation of Technological Advances Based on an Analysis of Patent Documents. *Sustainability (Switzerland)*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/su14127119>
- MuÈller, R. H., MaÈder, K., & Gohla, S. (2000). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) For Controlled Drug Delivery ± A Review Of The State Of The Art. 50, 161–177.
- Moayedi, H., & Kazemian, S. (2013). Zeta Potentials of Suspended Humus in Multivalent Cationic Saline Solution and Its Effect on Electro-Osmosis Behavior. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 34(2), 283–294. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.646601>
- Nielsen, C. K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., & Meyer, R. L. (2016). Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media Preparation of Bacterial Cultures. 7(November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01878>
- Pelczar, M. J. and C. E. C. S. (2008). Dasar-Dasar Mikrobiologi Terjemahan oleh Hadioetomo, Ratna Sari dkk. Universitas Indonesia.
- Prego, C., Torres, D., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E., & Alonso, M. J. (2006). Chitosan-PEG Nanocapsules As New Carriers For Oral Peptide Delivery: Effect Of Chitosan Pegylation Degree. *Journal of Controlled Release*, 111(3), 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.12.015>
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth Edition* (R. C. Rowe, P. J. Sheskey, & M. E. Quinn (eds.); Sixth Edit). Pharmaceutical Press.
- Selvamani, V. (2019). Chapter 15 - Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00015-5>
- Septiawan, D. (2012). Perbandingan Jumlah Variasi Triethanolamin Terhadap Stabilitas Fisik dan Sifat Kimia Gel Antiseptik Ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa L.*).
- Sihombing, Christina Noventy, Nasrul Wathoni, T. R. (2006). Formulasi Gel Antioksidan Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris L.*) Dengan Menggunakan Basis Aqupec 505 Hv.

- Souto, E. B., Figueiro, J. F. and, & H., M. R. (2013). Solid Lipid Nanoparticles (SLNTM). *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9164-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9164-4_5)
- Szekalska, M., Puciłowska, A., Szymańska, E., Ciosek, P., & Winnicka, K. (2016). Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7697031>
- Tsabitah, A. F., Zulkarnain, A. K., Wahyuningsih, M. S. H., & Nugrahaningsih, D. A. A. (2020). Optimasi Carbomer, Propilen Glikol, dan Trietanolamin Dalam Formulasi Sediaan Gel Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*). *Majalah Farmaseutik*, 16(2), 111. <https://doi.org/10.22146/farmaseutik.v16i2.45666>
- Uranga, J., Puertas, A. I., Etxabide, A., Dueñas, M. T., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2019). Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films. *Food Hydrocolloids*, 86, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.018>.
- Vieira, A. J., Beserra, F. P., Souza, M. C., Totti, B. M., & Rozza, A. L. (2018). Limonene: Aroma Of Innovation In Health And Disease. *Chemico-Biological Interactions*, 283 (February 2020), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007>
- Yadav, H. K. S., Anwar, N., Halabi, A., & Alsalloum, G. A. (2017). Nanogels as Novel Drug Delivery Systems - A Review Properties of Nanogels Keywords : Introduction Advantages of Nanogels. *Insight in Pharma Research*, 1(1), 1–8.
- Yin, Y., Hu, B., Yuan, X., Cai, L., Gao, H., & Yang, Q. (2020). Nanogel: A Versatile Nano-Delivery System For Biomedical Applications. *Pharmaceutics*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030290>
- Zhang, Y., & Zhang, M. (2002). Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 61(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.10176>.
- Zhao, T., Sun, R., Yu, S., Zhang, Z., Zhou, L., Huang, H., & Du, R. (2010). Size-controlled preparation of silver nanoparticles by a modified polyol method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 366(1–3), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.06.005>