

POTENSI PENGGUNAAN KITOSAN RANTAI PENDEK SEBAGAI PEMBAWA DALAM PENGHANTARAN GEN; EVALUASI IN VITRO

Lina Winarti ¹⁾, Ronny Marfen ²⁾, Sismindari ²⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Jember

²⁾ Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Gene therapy involves the introduction of DNA or ribonucleic acid (RNA) into the target cell either to express or suppress the biosynthesis of proteins. The success of gene therapy is highly dependent on a suitable carrier system that can efficiently deliver genes in to specific desired cell with minimum cytotoxicity on target cells. Chitosan is interesting to be used as a gene carrier because it has a high positive charge and low toxicity to cells. Positive charge chitosan can form complexes with the plasmid. DNA complexes provide protection against enzymes degradation and promote internalization of plasmids that have been condensed. In this study the complex formation of chitosan-pEFneo-GFP and chitosan / TPP-pEFneo-GFP is by complex coaservation method. The results of complex analysis with a 0.8% agarose gel electrophoresis for 30 minutes 100Volt showed that the complex was stayed in the well and the plasmids did not migrate like plasmids which were dissolved in the water and buffer solvent. Stability evaluation in storage at room temperature for 14 days showed that the complex with chitosan concentration 0.02%-0.04% were the most stable, so that transfection analysis performed for the complex with chitosan concentration of 0.02%-0.04%. Transfection results showed that chitosan is able to protect plasmid and promote the internalization of plasmid into the nucleus and then expressed as a green luminescence. From these results chitosan potentially be developed as a carrier system in gene delivery.

Keywords : chitosan, plasmid EFneo-GFP, T47D cells culture

Korespondensi (Correspondence): lhinna_w@yahoo.com

Terapi gen melibatkan pengenalan DNA atau asam ribonukleat (RNA) ke dalam sel target baik agar mengekspresi atau menekan biosintesis protein¹. Kemampuan untuk memanipulasi ekspresi protein pada manusia dapat memberikan obat atau pengobatan untuk berbagai penyakit yang saat ini belum dapat diobati dengan terapi obat konvensional.

Keberhasilan terapi gen sangat bergantung pada sistem pembawa yang cocok yang secara efisien dapat menghantarkan gen spesifik menuju sel yang diinginkan dengan sitotoksitas minimum pada sel target². Terdapat lima hambatan utama yang harus diatasi untuk keberhasilan penghantaran gen yaitu: (i) stabilitas in vivo, (ii) cell entry, (iii) endosomal escape, (iv) intracellular trafficking dan (v) nuclear entry. Polimer kationik dan lipid keduanya dapat digunakan sebagai agen penghantaran gen yang menjanjikan karena sifat polikationiknya menghasilkan partikel yang dapat mengurangi satu atau lebih hambatan yang telah disebutkan di atas.

Kitosan menarik digunakan sebagai pembawa gen karena memiliki muatan positif yang tinggi dan toksisitas yang rendah pada sel³. Kitosan merupakan polisakarida yang biodegradabel tersusun dari dua subunit D-glukosamin dan N-asetil-D-glukosamin yang terikat bersama oleh ikatan (1,4) glikosidik⁴. Gugus amin pada unit glukosamin dari kitosan merupakan bagian yang penting karena memberikan muatan positif yang tinggi dan sangat reaktif. Muatan positif kitosan dapat membentuk kompleks dengan plasmid. Komplek DNA memberikan proteksi terhadap degradasi enzim dan mempromosi

internalisasi plasmid yang telah terkondensasi. Selain itu turunan kitosan dapat disintesis dengan mudah untuk memodifikasi hidrofobisitas atau mengkonjugasi dengan bahan kimia yang berbeda sehingga menghasilkan nanopartikel kitosan tertarget pada organ atau jaringan spesifik⁵.

Penggunaan kitosan sebagai vektor non viral untuk penghantaran gen terhadap berbagai tipe sel telah banyak dilakukan. Efisiensi sistem penghantaran menggunakan kitosan sebagai pembawa sangat tergantung pada cell line yang digunakan, pH, derajat deasetilasi, berat molekul kitosan, rasio muatan kitosan terhadap DNA (rasio N/P), ukuran partikel, interaksi dengan protein, dan interaksi dengan sel. Metode pembuatan juga berpengaruh terhadap kemampuan proteksi terhadap DNA maupun efektifitas transfeksinya. Untuk itu akan dilakukan evaluasi potensi kitosan rantai pendek dan kitosan rantai pendek termodifikasi dengan cross-linker Na TPP untuk penghantaran gen menggunakan model plasmid EFneo-GFP pada kultur sel kanker payudara T47D.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Kitosan rantai pendek (C₆H₁₁NO₄)_n (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), plasmid EFneo-GFP (Innsbruck, Austria), Sel kanker payudara T47D (Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada), Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (Gibco), Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v) (FBS Qualified, Gibco® 26140, Invitrogen™ USA), penisilin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco® 15140, Invitrogen corporation, Grand island, NY, 14072, USA). Sel dipanen dari culture dish

dengan tripsin-EDTA 0,25% (Gibco® 25200, Invitrogen, Canada), LB Agar (Invitrogen), Agarose gel (Invitrogen), TAE bufer elektroforesis (Invitrogen), Na-TPP (Sigma Aldrich), EDTA (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), Sodium Sulfat (Sigma-Aldrich), TrisBase (Sigma-Aldrich), SDS (Sigma-Aldrich). Sodium Asetat, Fenol, Glukosa, NaOH, Asam asetat glasial, *DNA loading dye*, Etidium Bromide yang diperoleh dari laboratorium Bioteknologi Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada.

Alat

Autoclave (Hirayama HV-25 020585175, Hirayama Manufacturing co., Japan), *Laminar Air Flow* (LAF) hood (Labconco, Gelman sciences), *Incubator CO₂* (Hevaeus), *Inverted microscope* (Zeiss MC 80), *Cell counter*, Penangas air (Memmert D06805), Neraca analitik (Sartorius), Mikropipet (pipetman® neo Gilson, France), ELISA reader (Bio-Rad microplate reader Benchmark, serial no 11565, Jepang), Mikroskop Fluoresens (Carl Zeiss Axiolab HB50, Germany) dilengkapi canon *power shot A620*, sentrifus (Sorvall, MC12 V 9700869), vortex (Maxi Mix II, Tabung duran 500 ml, Tabung duran 250 ml, Tabung duran 100 ml, *Blue tip*, *Yellow tip*, Eppendorf (Epi), *Conical* 50 ml, Petri dish, *Conical* 15 ml, 25 cm² flasks, *96 wells plate*, *6 well plate*, *Glove*, Masker, Elektroforesis *chamber* (Sigma-Aldrich), spektrofotometer UV-Vis (Genoquant II Amershan Pharmacia Biotech), Ose, Botol semprot, *UV transilluminator*, Inkubator (OSK-Seiwa Riko), Mikropipet (Eppendorf), Filter 0.22µm (Millipore), *coverslip* diameter 12 mm (SPL).

Jalan Penelitian

Preparasi dan Isolasi Plasmid

Plasmid *EFneo-GFP* hasil isolasi akan digunakan untuk pembuatan nanopartikel dan digunakan untuk transfeksi pada kultur sel. Plasmid diperbanyak dalam *Escherichia coli* DH5a dan diisolasi dengan metode *alkaline lysis*⁶ kemudian disimpan pada -20°C dalam aqubides steril sebelum digunakan.

Preparasi Komplek Kitosan-pDNA

Metode kompleks koaservasi digunakan untuk pembentukan kompleks antara kitosan dan pDNA^{7 8}. Dua puluh lima mikrogram plasmid DNA dalam 250 µl larutan natrium sulfat 50 mM dan larutan kitosan (rantai pendek) dalam buffer asetat 5mM pH 4.0.0 dipanaskan pada suhu 50°C selama 10 menit dalam *waterbatch*. Formulasi kompleks dilakukan dengan mencampur kemudian memvortek selama 20 detik 400 µl larutan kitosan dalam 5 mM buffer natrium asetat pH 4.0.0 dengan 250 µl larutan pDNA-natrium sulfat. TPP ditambahkan sebagai *crosslinker* pada kompleks kitosan rantai pendek-pDNA yang telah terbentuk dengan kadar akhir dalam sediaan 0.03% dengan cara memvortek selama 20 detik. Uji stabilitas sediaan nanopartikel dilakukan dengan penyimpanan

pada suhu kamar selama 14 hari. Formula yang paling stabil dipilih untuk digunakan pada percobaan selanjutnya yaitu transfeksi pada kultur sel kanker payudara T47D.

Analisis Pembentukan Komplek

Pembentukan kompleks antara kitosan rantai pendek dan *pEFneo-GFP* dievaluasi dengan elektroforesis gel agarosa 0.8%, 100 volt selama 30 menit dan hasilnya diamati di bawah lampu UV *transilluminator*.

Sel dan Kultur Sel

Sel kanker payudara T47D ditumbuhkan pada media kultur yang memiliki komposisi DMEM (Gibco) yang disuplemen dengan FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% (Gibco), fungison 0.5% dan penisilin-streptomisin 1% (Gibco). Sel diinkubasi dengan kelembaban udara 95% dan 5% CO₂ pada suhu 37°C. Sel dicek secara rutin dan harus bebas fungi.

Transfeksi Sel Kanker Payudara T47D

Cellular uptake kompleks plasmid DNA-kitosan diamati menggunakan *pEFneo-GFP*. Sel sebanyak 1 x 10⁵ sel/sumur didistribusikan dalam *microplate* 6 sumuran yang telah dilapisi *coverslip* pada bagian dasarnya dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Pada hari dilakukan transfeksi 200 µl sediaan kompleks kitosan-pDNA ditambahkan pada tiap sumuran setelah media lama dibuang, sebelum dimasukkan inkubator CO₂ ditambahkan media baru sebanyak 800 µl. Sel diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi medium tiap sumur dibuang dan dicuci dengan PBS steril, kemudian difiksasi menggunakan metanol absolut selama 10 menit dan dibuang segera. *Coverslip* yang berisi sel diletakkan pada kaca obyektif kemudian dilakukan pengamatan dengan *inverted fluorescent microscope* (Carl Zeiss Axiolab HB50, Germany) menggunakan perbesaran 10x^{7 9 10 11}.

Analisis Hasil

1. Komplek kitosan-pEFneo-GFP dan kitosan/TPP-pEFneo-GFP diamati menggunakan elektroforesis gel agarose 0,8% dimana kompleks yang terbentuk akan tetap berada pada *well*.
2. Analisis transfeksi dilakukan dengan pengamatan terhadap masuknya plasmid EFneo-GFP ke dalam nukleus yang ditandai dengan pendaran warna hijau plasmid EFneo-GFP di bawah mikroskop fluoresen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Plasmid EGFP

Dalam penelitian ini plasmid EFneo-GFP digunakan sebagai model gen. Plasmid EFneo-GFP yang telah ditransformasi ke dalam *Escherichia coli* DH5a diperbanyak dengan kultur bakteri pada media Luria Bertani (LB) kemudian diisolasi dengan metode lisis alkali Hasil isolasi plasmid EFneo-GFP dielektroforesis dengan gel agarosa 0.8 %

selama 30 menit pada 100 V dengan buffer TAE 1x. Hasil visualisasi gel agarose menunjukkan 3 pita plasmid yaitu dari yang

paling cepat adalah *supercoiled*, *linier* dan *nicked open circular* (Gambar 1).

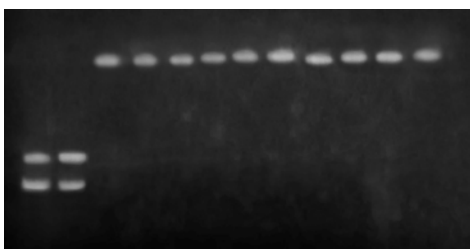


Gambar 1. Elektroforegram hasil isolasi pEFneo-GFP pada gel agarose 0,8 %; Lane 1. pEFneo-GFP 9.83 ug, lane 2. pEFneo-GFP 19,65 ug

Tabel 1. Hasil Pengukuran Konsentrasi Plasmid EFneo-GFP dengan Spektrofotometer (λ_{260nm} dan λ_{280nm})

No	Abs (Au) (λ_{260nm})	Rasio (Abs λ_{260nm} / Abs λ_{280nm})	Kadar Protein (mg/ml)	Konsentrasi EFneo-GFP (ug/ml)
1	1.690	1.796	5.4	4113.0
2	1.830	1.784	5.6	4446.6
3	1.894	1.822	5.6	4580.8
Rata-rata	1.804	1.800	5.53	4380.1

Ket : Au = Absorbansi Unit

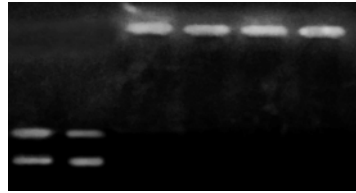


Gambar 2. Elektroforesis gel agarose untuk hasil pembentukan kompleks antara pDNA dan kitosan konsentrasi 0.02%-0.1%. Lane 1: pEFneo-GFP dalam H₂O; 2: pEFneo-GFP dalam buffer asetat pH 4.0; 3: Kitosan- pEFneo-GFP 0.02% pH 4.0; 4: Kitosan-pEFneo-GFP 0.04% pH 4.0; 5: Kitosan-pEFneo-GFP 0.06% pH 4.0; 6: Kitosan-pEFneo-GFP 0.08% pH 4.0; 7: Kitosan-pEFneo-GFP 0.1% pH 4.0; 8: Kitosan/TPP- pEFneo-GFP 0.02% pH 4.0; 9: Kitosan/TPP- pEFneo-GFP 0.04% pH 4.0; 10: Kitosan/TPP- pEFneo-GFP 0.06% pH 4.0; 11: Kitosan/TPP- pEFneo-GFP 0.08% pH 4.0; 12: Kitosan/TPP- pEFneo-GFP 0.1% pH 4.0

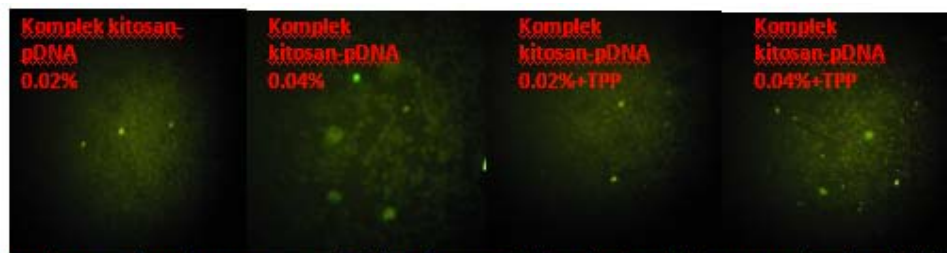
Tabel 2. Stabilitas Komplek Kitosan-pEFneo-GFP Dalam Penyimpanan Selama 14 Hari

No	Formulasi nanopartikel kitosan-pEFneo-GFP pH 4,0	Hari ke-									
		1	2	3	4	5	6	7	8	14	
1.	0.02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	0.04%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	0.06%	-	-	+	+	+	++	++	++	++	++
4.	0.08%	-	+	+	+	+	++	++	++	++	++
5.	0.10%	-	+	+	+	+	++	++	++	++	++
6.	0.02%+ TPP	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
7.	0.04%+ TPP	-	-	-	+	+	+	++	++	++	++
8.	0.06%+ TPP	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++
9.	0.08%+ TPP	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++
10.	0.10%+ TPP	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++

Ket (-) = jernih
(+) = agregat/keruh
(++) = endapan



Gambar 3. Elektroforesis gel agarose untuk hasil pembentukan kompleks antara pDNA dan kitosan konsentrasi 0.02%-0.04%. Lane 1: pEFneo-GFP dalam H₂O; **2:** pEFneo-GFP dalam buffer asetat pH 4.0; **3:** Kitosan- pEFneo-GFP 0.02% pH 4.0; **4:** Kitosan- pEFneo-GFP 0.04% pH 4.0; **5:** Kitosan/TPP- pEFneo-GFP 0.02% pH 4.0; **6:** Kitosan/TPP- pEFneo-GFP 0.04% pH 4.0



Gambar 4. Ekspresi pEFneo-GFP pada kultur sel T47D setelah 24 jam transfeksi menggunakan kompleks kitosan-pEFneo-GFP. Foto diambil setelah 48 jam transfeksi di bawah mikroskop fluoresensi.

Konsentrasi DNA plasmid ditentukan dengan menggunakan $(OD_{260})_1 = 50 \text{ ug/ml}$ DNA (Sambrook dkk., 1989). Rasio OD_{260}/OD_{280} dinyatakan untuk menunjukkan kemurnian DNA. Rasio yang ideal sebesar 1.8 - 2.0¹² Hasil isolasi menunjukkan rasio 1.8 sehingga kemurnian plasmid yang diperoleh relatif tinggi dan kadar plasmid yang diperoleh adalah 4380.1 ug/ml (table 1). DNA plasmid hasil isolasi kemudian disimpan pada -20 °C sebelum digunakan untuk tahap penelitian selanjutnya.

Formulasi Kompleks Kitosan-pEGFP

Kompleks kitosan rantai pendek-pDNA dalam penelitian ini dibentuk melalui pendekatan *bottom-up* sebagai hasil proses *self-assembly*¹³. Untuk mengevaluasi terbentuknya kompleks kitosan-pDNA dan kitosan/TPP-pDNA dilakukan evaluasi menggunakan elektroforesis gel agarose 0.8% selama 30 menit 100V. Hasil elektroforesis kompleks yang terbentuk terlihat sesuai gambar 2.

Dari hasil elektroforesis terlihat bahwa *free DNA* (DNA dalam H₂O dan buffer asetat) bermigrasi dari *well* dan terpisah sebagai 2 pita karena adanya perbedaan konformasi/bentuk, sedangkan kompleks kitosan-pDNA dan kompleks kitosan/TPP-pDNA tetap berada dalam *well* karena ukuran yang besar sehingga sulit menembus pori-pori gel. Hal tersebut menunjukkan bahwa kompleksasi benar-benar tercapai melalui formulasi

menggunakan kadar kitosan dari 0.02% hingga 0.1% baik menggunakan TPP maupun tidak dengan proses preparasi kompleks yang dilakukan dalam prosedur penelitian ini. Selain itu adanya kompleks yang tetap berada dalam *well* dan tidak adanya DNA yang bermigrasi menunjukkan bahwa efisiensi enkapsulasi kitosan rantai pendek terhadap pDNA adalah tinggi.

Dari hasil pengamatan pada suhu ruang selama 14 hari (Tabel 2.) kompleks kitosan-pEFneo-GFP dengan kadar 0.02% dan 0.04% relatif stabil dalam penyimpanan yang ditunjukkan oleh suspensi kompleks yang tetap jernih. Begitu pula kitosan rantai pendek/TPP-pEFneo-GFP dengan kadar kitosan 0.02% juga masih stabil selama 7 hari. Pada kadar kitosan $\geq 0.06\%$ terjadi kekeruhan/terbentuk agregat dan endapan hal ini disebabkan ukuran partikel meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi kitosan sehingga stabilitasnya lebih rendah¹⁴. Pengamatan terhadap stabilitas kompleks kitosan-pDNA maupun kompleks kitosan/TPP-pDNA mulai kadar kitosan 0.02% hingga 0.1% ditabulasikan dalam tabel 2.

Evaluasi selanjutnya dilakukan terhadap formula kompleks yang stabilitasnya paling baik yaitu kitosan-pEFneo-GFP dan kompleks kitosan rantai pendek/TPP-pEFneo-GFP dengan kadar kitosan 0.02% dan 0.04%. Formula tersebut dipilih karena menunjukkan stabilitas dalam penyimpanan yang lebih baik

dibanding kadar kitosan lainnya yang lebih tinggi.

Transfeksi pada Sel Kanker Payudara T47D

Selain transfeksi menggunakan kompleks kitosan-pEFneo-GFP dalam penelitian ini juga dilakukan transfeksi menggunakan kompleks kitosan/TPP-pEFneo-GFP. Hasil transfeksi menggunakan kompleks kitosan-pEFneo-GFP terlihat pada gambar 4. Plasmid *EFneo-GFP* menggunakan promoter *Elongation Factor-1* yang juga merupakan promoter konstitutif yang memberikan ekspresi yang stabil dari target gen¹⁵. Hasil transfeksi menggunakan kompleks kitosan-pEFneo-GFP dan kompleks kitosan/TPP-pEFneo-GFP menunjukkan bahwa kitosan sebagai pembawa gen dapat menghantarkan gen yang dibawa hingga ke nukleus dan akhirnya terekspresi.

Hasil penelitian terdahulu yang dilakukan Indrawati (2010); Mutaminah (2010); dan Martien dkk (2006) menunjukkan bahwa kitosan dapat digunakan sebagai vektor gen dengan toksisitas rendah, mampu melindungi gen dari degradasi nuklease, dan mampu mentransfeksi baik sel SPC-1 maupun Caco-2. Demikian juga dari hasil penelitian ini kitosan menunjukkan dapat digunakan sebagai vektor gen yang aman, stabil dan mampu mentransfeksi kultur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*. Penelitian sebelumnya¹⁶ dengan model gen EGFP-C1 nanopartikel kitosan-plasmid DNA juga berhasil memberikan ekspresi pada sel kanker T47D.

KESIMPULAN

Berdasarkan data-data yang diperoleh dalam penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Formulasi menggunakan kitosan-pEFneo-GFP dengan kompleks koaservasi menghasilkan kompleks kitosan-pEFneo-GFP.
2. Formulasi kompleks kitosan-pEFneo-GFP yang dihasilkan dengan metode kompleks koaservasi mampu menghantarkan gen secara *in vitro* pada sel kanker payudara T47D.

DAFTAR PUSTAKA

1. Durland, R., H., Eastman, E., M., Manufacturing and Quality Control of Plasmid-based Gene Expression Systems, *Adv. Drug Deli. Rev.*, 1998, **30**:33-48
2. Nguyen, L., T., Atobe, K., Barichello, J., M., Ishida, T., Kiwada, H., Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes, *Biol. Pharm. Bull.*, 2007, **30**(4):751-7
3. Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I., dalam Geebelein, C., G.,

Dunn, R., L., *Progress in Biomedical Polymers*, Plenum Press, New York, 1990, 283

4. LeHoux, J., G., Grondin, F., Some Effects of Chitosan on Liver Function in The Rat, *Endocrinology*, 1993, **132**:1078-1084
5. Chandy, T., Sharma, C., P., Chitosan as a Biomaterial, *Biomat. Art. Org.*, 1990, 181
6. Sambrook, J., Fritsch, E., F., Maniatis, T., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Jilid 1.
7. Martien, R., Loretz, B., Oral Gene Delivery: Design of Polymeric Carrier systems shielding toward Intestinal Enzymatic Attack, *Biopolymers*, 2006, **83**(4):327-36
8. Martien, R., Loretz, B., Chitosan Thioglycolic Acid Conjugate:an Alternative Carrier for Oral Nonviral Gene Delivery?, *J. Biomed. Mater Res. A*, 2007, **82**(1):1-9
9. Supriatno, K., Harada, Basic Investigation on The Development of Molecular Targetting Therapy Against Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 in Head and Neck Cancer Cells, *Int. J. Oncol.*, 2005, **27**:627-635
10. Indrawati, M., I., M., Formulasi Nanopartikel Menggunakan Chitosan Rantai Pendek dan Transfeksinya pada Sel Kanker SP-C1, *Tesis*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2010.
11. Mutmainah, N., Formulasi Nanopartikel Menggunakan Chitosan Rantai Sedang dan Transfeksinya pada Sel Kanker SP-C1, *Tesis*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2010.
12. Clark, D., *Molecular Biology*, Elsevier, Inc. London, 2005,
13. Loretz, B., Schnuirch, A., B., In Vitro Evaluation of Chitosan-EDTA Conjugate Polyplexes as a Nanoparticulate Gene Delivery System, *AAPS J.*, 2006, **8**:4
14. Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., McCarron, P., Modulation of Surface Charge, Particle Size and Morphological Properties of Chitosan-TPP Nanoparticles Intended for Gene Delivery, *Colloid Surface*, 2005, **44**:65-73.
15. Qin, J., Y., Zhang, L., Cliff, K., L., Hulan, I., Xiang, A., P., Ren, B., Z., Lahn, B., T.,

Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter, PLoS ONE, 2010, 5(5):e10611

16. Winarti, L., Martien, R., Sismindari, Formulasi Nanopartikel Kitosan Rantai Pendek Dan Kitosan Rantai Pendek-TPP Sebagai Sistem Pengantaran Gen Non Viral Yang Ditransfeksi Pada Sel Kanker Payudara T47D, *Tesis*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta, 2011,