



Formulation and Characterization of *Bacillus subtilis* Supernatant loaded Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) Nanoparticle

Alfia N. Farahnida¹, Uyi Sulaeman², Dhadhang W. Kurniawan^{1,3*}

¹Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

²Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

³Sekolah Pascasarjana Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

Submitted 29 April 2023; Revised 12 March 2024; Accepted 15 March 2024; Published 28 October 2024

*Corresponding author: dhadhang.kurniawan@unsoed.ac.id

Abstract

Bacillus subtilis supernatant has now been widely used in the health sector as probiotic because it contains bacteriocin compounds and enzymes. These compounds are able to inhibit other microorganisms and are easily degraded by proteolytic enzymes. Utilization of polymer nanoparticles is quite effective to protect from gastrointestinal conditions. This study aims to prepare nanoparticles of *B. subtilis* supernatant with PLGA variation as carrier and to characterize it. Nanoparticle formulation by solvent evaporation method by using a variation of the PLGA (2.5 mg; 5 mg; dan 7 mg). The results of the characterization of *B. subtilis* supernatant nanoparticle with a PLGA concentration of 2,5 mg had a nanoparticle size of 545.45 ± 90.73 nm with a polydispersity index (PDI) of $0,503 \pm 0,065$ and a zeta potential of -14.57 ± 3.08 mV. The morphology was spherical and fairly uniform. *Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR) analysis showed similar spectral bands to the PLGA nanoparticles and showed some specific peaks of the *B. subtilis* supernatant with slight shifts. *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) analysis on the thermogram did not show any endothermic peak of the *B. subtilis* supernatant. The *B. subtilis* supernatant was loaded into the nanoparticle system by FTIR and DSC analysis.

Keywords: *Bacillus subtilis*, nanoparticle, PLGA, supernatant

Formulasi dan Karakterisasi Nanopartikel Supernatan *Bacillus subtilis* dengan Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA)

Abstrak

Pemanfaatan supernatan *Bacillus subtilis* kini telah banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan sebagai probiotik karena mengandung senyawa bakteriosin serta enzim. Senyawa tersebut mampu menghambat mikroorganisme lain dan mudah terdegradasi oleh enzim proteolitik. Pemanfaatan nanopartikel polimer cukup efektif untuk melindungi probiotik dari kondisi gastrointestinal. Penelitian ini bertujuan untuk membuat dan mengkarakterisasi sediaan nanopartikel supernatan *B. subtilis* dengan pembawa PLGA yang divariasikan. Nanopartikel dibuat dengan metode solvent evaporation menggunakan variasi konsentrasi PLGA (2,5 mg; 5 mg; dan 7 mg). Hasil karakterisasi nanopartikel supernatan *B. subtilis* dengan konsentrasi PLGA 2,5 mg memiliki ukuran nanopartikel $545,45 \pm 90,73$ nm dengan nilai indeks polidispersitas (PDI) kategori monodispersi yaitu $0,503 \pm 0,065$ dan zeta potensial $-14,57 \pm 3,08$ mV. Morfologi yang dihasilkan berbentuk sferis dan cukup seragam. Analisis *Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR) menunjukkan pita-pita spektrum mirip dengan nanopartikel PLGA dan menunjukkan beberapa puncak spesifik supernatan *B. subtilis* dengan sedikit pergeseran. Analisis *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) pada termogram tidak menunjukkan adanya puncak endotermik dari supernatan *B. subtilis*. Formulasi nanopartikel supernatan *B. subtilis* telah termuat ke dalam sistem nanopartikel melalui analisis FTIR dan DSC.

Kata Kunci: *Bacillus subtilis*, nanopartikel, PLGA, supernatan

1. Pendahuluan

Dekade terakhir penggunaan probiotik untuk manfaat kesehatan telah banyak digunakan. Salah satu bakteri probiotik yaitu *Bacillus subtilis*. Bakteri ini merupakan bakteri Gram positif yang bersifat antagonis non-patogen. *B. subtilis* mampu menjaga keseimbangan mikroflora yang menguntungkan di gastrointestinal.¹

Berdasarkan penelitian sebelumnya, supernatan *B. subtilis* mampu menghambat bakteri patogen seperti *E. coli* dan *Salmonella typhi*.^{2,3} Kemampuannya menghambat bakteri disebabkan karena adanya senyawa-senyawa yang dihasilkan berupa zat antimikroba seperti surfaktan, iturin, dan fengisin. Selain itu mengandung senyawa bakteriosin yang terdiri dari basitrasin, subtilin, polymyxin, diffidin, dan mycobacillin.⁴

Senyawa bakteriosin merupakan salah satu senyawa peptida yang tidak bersifat toksik, mampu menghambat mikroorganisme lain dan mudah terdegradasi oleh enzim proteolitik serta tidak berbahaya terhadap mikroflora di usus.⁵ Namun senyawa-senyawa ini dapat terdegradasi oleh enzim proteolitik seperti pepsin, tripsin, dan kimotripsin di lambung atau usus yang dapat menurunkan bioavailabilitasnya.⁶

Pemanfaatan nanopartikel polimer dilaporkan telah berhasil melindungi probiotik dari kondisi gastrointestinal. Polimer yang paling banyak digunakan salah satunya yaitu *Poly Lactic-co-Glycolic Acid* (PLGA). PLGA telah disetujui oleh FDA sebagai polimer *biodegradable* yang bersifat fisik kuat dan *biokompatibel* serta telah dipelajari secara ekstensif sebagai pembawa protein dan berbagai makromolekul lain seperti DNA, RNA dan peptide.⁷

Penghantaran senyawa nisin sebagai salah satu bakteriosin melalui sistem nanopartikel PLGA memberikan aktivitas bakteri yang lebih efektif dibandingkan tanpa sistem nanopartikel.⁸ Belum ada penelitian sebelumnya terkait dengan sistem nanopartikel menggunakan PLGA pada supernatan *B. subtilis*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuat dan mengkarakterisasi nanopartikel

supernatan *B. subtilis* dengan pembawa PLGA yang divariasikan

2. Metode

2.1. Alat

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, *Eppendorf tube*, *vortex*, *magnetic stirrer*, sentrifugasi (*Benchtop Highspeed Centrifuge TG16-WS*), timbangan analitik (Ohaus), pipet tetes, pipet mikroliter, spatula, pengaduk, stopwatch, yellow dan blue tip, *Particle Size Analyzer* (PSA) (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), *Differential Scanning Calorimetry* (DSC-60 Plus Shimadzu), *Scanning Electron Microscope* (SEM-EDX Phenom Desktop ProXL), *Fourier transform infrared spectroscopy* (Thermo Scientific Nicolet iS10) dan *spektrofotometer UV-Vis* (Drawell Artist of Science).

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu supernatan *B. subtilis*, PLGA (Carbion Purac, Gorinchem, Belanda), etil asetat (Merck), polivinil alkohol (PVA) (Aldrich), KCl, aquades, dan *aquadeionisasi* (PT. Jayamas Medica Industri).

2.3. Prosedur

2.3.1. Pembuatan Nanopartikel

Nanopartikel supernatan *B. subtilis* dilakukan menggunakan metode *solvent evaporation*. Metode ini melibatkan 2 fase yaitu, fase organik dan fase air.

Fase organik terdiri dari PLGA, pelarut organik dan supernatan *B. subtilis*. Larutan PLGA dibuat sebanyak 3 seri konsentrasi, yaitu 2,5 mg; 5 mg; dan 7,5 mg yang dilarutkan menggunakan etil asetat 100 µL. Setelah itu dilakukan pencampuran dengan supernatan *B. subtilis* sebanyak 100 µL menggunakan *vortex* selama 2 menit dengan kecepatan maksimum.⁹

Fase air terdiri dari pelarut dan PVA sebagai surfaktan. Larutan PVA dibuat dengan seri konsentrasi 5% dan 0,3% (b/v). PVA dilarutkan menggunakan aquades dan dihomogenkan pada *magnetic stirrer* dengan kecepatan 600 rpm pada suhu 70°C hingga PVA larut sempurna.⁹

2.3.2. Optimasi Nanopartikel

Fase organik diteteskan ke dalam fase air 100 μL PVA 5% secara dropwise menggunakan vortex selama 2 menit. Lalu ditambahkan ke dalam 15 mL PVA 0,3% menggunakan magnetic stirrer pada kecepatan 360 rpm pada suhu kamar dan didiamkan selama semalam. Setelah itu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 11000 rpm. Endapan yang dihasilkan lalu dilarutkan dengan 1 mL aquadeionisasi.^{9,10}

2.3.3. Uji Persen (%) Transmitan

Sebanyak 100 μL sampel nanopartikel diencerkan dengan aquadeionisasi sebanyak ± 5 mL dimasukkan kedalam kuvet dan diukur persen transmitan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm.¹¹

2.3.4. Penentuan Ukuran Partikel dan Distribusi Ukuran Nanopartikel

Sampel yang digunakan sebanyak 10 μL diencerkan dalam 1 mL aquades menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK).¹²

2.3.5. Pengamatan Morfologi Nanopartikel

Morfologi nanopartikel diamati menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM-EDX Phenom Desktop ProXL) dengan tegangan 10 kV. Sampel nanopartikel sebelumnya dikeringkan menggunakan oven. Lalu, sejumlah sampel serbuk disebarkan dan ditempelkan menggunakan selotip karbon pada bagian stub. Setelah itu ditempelkan pada *scanning electron chamber* kemudian dianalisis.^{13,14}

2.3.6. Pengamatan Zeta Potensial

Zeta potensial dilakukan menggunakan alat Nano ZA *Zetasizer* (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). Sebanyak 10 μL sampel diencerkan menggunakan KCl sebanyak 1 mL (10 mM) kemudian dianalisis menggunakan alat Malvern *Zetasizer*.¹²

2.3.7. Analisis *Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR)

Sampel nanopartikel dikeringkan menggunakan *freeze dryer*. Lalu dicampur dengan KBr dan dianalisis menggunakan *Fourier transform infrared spectroscopy* (Thermo Scientific Nicolet iS10). Pengukuran dilakukan pada rentang panjang gelombang 4000-400 cm^{-1} . Rasio perbandingan sampel dengan KBr yaitu 1:50 (w/w).^{15,16}

2.3.8. Analisis *Differential Scanning Calorimetry* (DSC)

Analisis DSC menggunakan alat *Differential Scanning Calorimetry* (DSC-60 Plus Shimadzu). Sebanyak 5 mg sampel dipanaskan menggunakan cawan lebur alumunium dalam rentang suhu 50-350°C, di bawah atmosfer udara dinamis (20mL/menit) dan laju pemanasan 10°C/menit.¹⁷

3. Hasil

3.1. Hasil Uji Persen Transmittan

Pengukuran persen transmitan merupakan uji pendahuluan untuk menganalisis ukuran nanopartikel secara kuantitatif.¹⁸ Selain itu, pengujian ini bertujuan untuk melihat tingkat kekeruhan masing-masing formula.

3.2. Hasil Ukuran Partikel dan Distribusi Ukuran Partikel

Karakterisasi ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel dilakukan pada

Tabel 1. Hasil Uji Persen (%) Transmittan

	Persen Transmittan (%)			Rata-rata
	1	2	3	
FI	97,2	93,4	93,7	94,8 $\pm$ 1,6
FII	91,3	89,6	92,5	91,1 $\pm$ 1,0
FIII	93,9	93,4	92,6	93,3 $\pm$ 0,4

Tabel 2. Hasil Uji Ukuran Partikel dan *Polydispersity Index* (PDI)

Replikasi	Ukuran partikel (nm) $\pm$ SD (n=3)	PDI $\pm$ SD (n=3)
1.	648,2	0,537
2.	511,9	0,427
3.	476,3	0,544
Rata-rata	545,45 $\pm$ 90,73	0,503 $\pm$ 0,065

suhu 25°C. Berdasarkan Tabel 2. menunjukkan bahwa ukuran rata-rata nanopartikel supernatan *B. subtilis* sebesar $545,45 \pm 90,73$ nm dengan distribusi ukuran partikel sebesar $0,503 \pm 0,065$.

3.3. Hasil Zeta Potensial

Analisis pengukuran zeta potensial nanopartikel supernatan *B. subtilis* dilakukan pada suhu 25°C. Hasil pengukuran nilai zeta potensial dapat dilihat pada Tabel 3.

3.4. Hasil Morfologi

Pengamatan morfologi menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM-EDX Phenom Desktop ProXL) dengan perbesaran 3000x dan 5000x.

Morfologi nanopartikel supernatan *B. subtilis* memiliki bentuk yang sferis atau bulat yang cukup seragam. Hasil morfologi dapat dilihat pada Gambar 1.

3.5. Hasil *Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR)

Hasil spektrum FTIR nanopartikel supernatan *B. subtilis* (Gambar 2.) menunjukkan puncak gugus fungsi –OH dan C=O dengan intensitas kuat pada bilangan gelombang $3396,35 \text{ cm}^{-1}$ dan $1758,10 \text{ cm}^{-1}$. Selain itu terdapat gugus fungsi –CH ulur pada bilangan gelombang $2997,96 \text{ cm}^{-1}$ dengan intensitas lemah, gugus fungsi C-H pada bilangan gelombang $1385,79 \text{ cm}^{-1}$ serta gugus fungsi C-O pada bilangan gelombang $1184,07 \text{ cm}^{-1}$.

3.6. Hasil *Differential Scanning Calorimetry* (DSC)

Hasil analisa DSC nanopartikel supernatan *B. subtilis* (Gambar 3.) dilakukan pada rentang pemanasan 30-350°C dengan pengaturan kenaikan suhu 10°C/menit.

Puncak endotermik didapatkan pada suhu 318,26°C. Sedangkan, puncak endotermik supernatan *B. subtilis* pada suhu 132,96°C.

4. Pembahasan

Formulasi 1 (F1) memiliki nilai rata-rata persen transmitan tertinggi. Formula 1 (F1) dipilih untuk dilakukan uji karakterisasi karena memiliki rata-rata persen transmitan tertinggi. Nilai persen transmitan yang mendekati 100% menunjukkan sistem dispersi yang jernih dan transparan.¹⁹

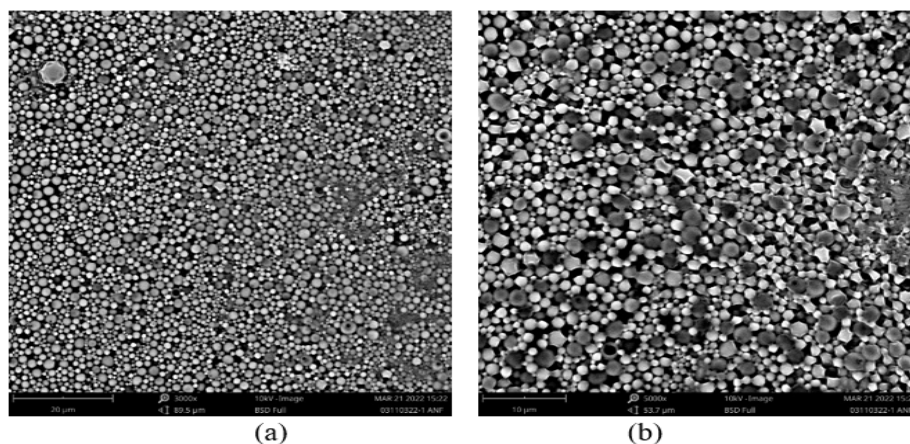
Ukuran nanopartikel supernatan *B. subtilis* memenuhi kriteria dalam rentang ukuran nanopartikel yaitu antara 10 – 1000 nm.²⁰ Ukuran nanopartikel ini dapat dipengaruhi oleh konsentrasi PLGA. Peningkatan konsentrasi polimer menyebabkan ukuran nanopartikel lebih besar. Hal ini karena peningkatan konsentrasi PLGA akan menyebabkan peningkatan viskositas fase anionik sehingga mendorong pembentukan tetesan dengan ukuran yang lebih besar. Selain itu, peningkatan viskositas dapat menghambat anionik larutan PLGA ke dalam fase air.²¹

Selain itu ukuran nanopartikel dipengaruhi juga oleh surfaktan. Peningkatan konsentrasi PVA mampu menurunkan ukuran nanopartikel.²² Hal ini karena konsentrasi PVA mampu meningkatkan stabilitas ketika terbentuknya tetesan selama proses emulsifikasi sehingga mencegah terjadinya koalesensi. Dalam proses pembuatan nanopartikel, kecepatan vortex juga mempengaruhi ukuran nanopartikel. Ukuran nanopartikel menurun ketika kecepatan vortex ditingkatkan selama proses pembuatan nanopartikel. Hal ini karena mampu mempercepat terbentuknya partikel kecil.²³

Nanopartikel supernatan *B. subtilis* memiliki indeks polidispersitas pada kategori

Tabel 3. Hasil Pengukuran Zeta Potensial

Replikasi	Zeta Potensial (mV) $\pm$ SD (n=3)
1.	-12,4
2.	-13,2
3.	-18,1
Rata-rata	-14,57 $\pm$ 3,08



Gambar 1. Hasil Pengamatan SEM (a) Perbesaran 3000x (b) Perbesaran 5000x

monodisperse yakni $0,503 \pm 0,065$.^{24,25} Peran PVA sebagai *stabilizer* mampu menurunkan nilai PDI dengan cara *crosslink* antara fase air dengan fase anionik sehingga terbentuk lapisan yang seragam atau homogen pada partikel.²⁶

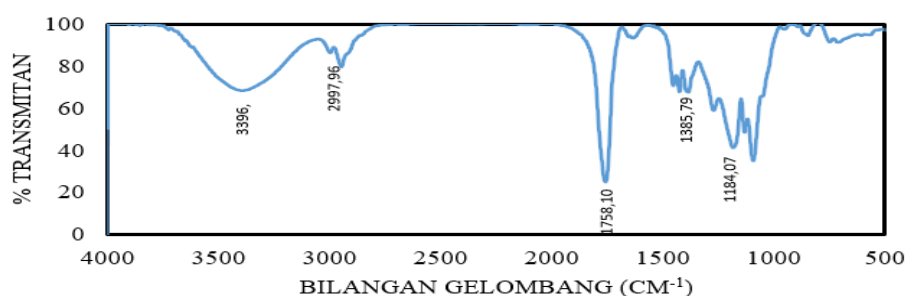
Nilai zeta potensial sedikit negatif yaitu sebesar $-14,57 \pm 3,08$. Hal ini disebabkan oleh gugus hidroksil pada permukaan nanopartikel dari PVA ketika dipreparasikan. Sifat ampifilik dari PVA menyebabkan Interaksi kuat antara fase anionik dengan gugus kepala kutubnya untuk keluar dari permukaan.²⁷ Nilai zeta potensial dipengaruhi oleh konsentrasi polimer PLGA yang memberikan sifat anionik pada sistem nanopartikel.²³

Berdasarkan penelitian sebelumnya nilai zeta potensial menunjukkan stabilitas yang besar apabila nilai zeta potensial lebih rendah dari -30 mV dan lebih tinggi dari $+30$ mV. Sehingga zeta potensial nanopartikel supernatan *B. subtilis* memiliki kecenderungan untuk mengalami agregasi.²⁸ Berdasarkan hasil nilai zeta potensial nanopartikel supernatan *B. subtilis* menunjukkan muatan yang negatif. Hal ini disebabkan karena adanya gugus karboksil ($-\text{COOH}$) polimer

PLGA yang terionisasi pada permukaan partikel.²³

Gugus fungsi spesifik nanopartikel PLGA yaitu gugus fungsi O-H dan C=O pada bilangan gelombang $3432,77 \text{ cm}^{-1}$ dan $1758,10 \text{ cm}^{-1}$ dengan intensitas kuat, gugus fungsi $-\text{CH}$ ulur pada bilangan gelombang $2999,02 \text{ cm}^{-1}$, gugus fungsi $-\text{CH}$ pada bilangan gelombang $1392,44 \text{ cm}^{-1}$ dan gugus fungsi C-O pada bilangan gelombang $1172,20 \text{ cm}^{-1}$.²⁹ Sementara gugus fungsi spesifik supernatan *B. subtilis* menunjukkan adanya gugus fungsi alkana (C-H) pada bilangan gelombang $2981,18 \text{ cm}^{-1}$ dan $1373,70 \text{ cm}^{-1}$, gugus C=O ($1736,30 \text{ cm}^{-1}$), serta gugus C-O ($1235,28 \text{ cm}^{-1}$).³⁰

Berdasarkan hasil analisis FTIR (Gambar 2.) menunjukkan adanya interaksi antara PLGA dan nanopartikel supernatan *B. subtilis* yang identik. Hal ini ditandai dengan adanya serapan pada bilangan gelombang yang merupakan karakteristik polimer PLGA berupa gugus hidroksil (O-H) pada rentang $2500 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ yang berkaitan dengan laktida dan glikolida.³¹ Selain itu terdapat serapan gugus karbonil ($-\text{C}=\text{O}$) $1758,10 \text{ cm}^{-1}$ dengan intensitas yang kuat. Gugus karbonil



Gambar 2. Spektrum FTIR Nanopartikel Supernatan *B. subtilis*

tersebut mengalami pergeseran karena adanya getaran regangan gugus karbonil dalam dua monomer nanopartikel PLGA dan supernatan *B. subtilis*.³²

Pita serapan pada bilangan gelombang 3000 – 2850 cm^{-1} merupakan vibrasi ulur ikatan C-H. Gugus C-H ulur mengalami pergeseran sedikit pada bilangan gelombang 2997,96 cm^{-1} . Hal ini dapat terjadi karena adanya interaksi fisik seperti pembentukan ikatan hidrogen atau interaksi dipol-dipol yang mengakibatkan pergeseran kecil dari puncak.²⁹ Spektrum FTIR nanopartikel supernatan *B. subtilis* menunjukkan puncak ringan pada bilangan gelombang 1632,38 cm^{-1} . Hal ini disebabkan oleh adanya vibrasi regangan gugus C=O yang terikat pada gugus hidroksil melalui ikatan hidrogen residu polivinil alkohol yang digunakan.³³

Puncak karakteristik supernatan *B. subtilis* pada bilangan gelombang 1373,70 cm^{-1} (C-H) dan 1235,28 cm^{-1} (C-O) dengan intensitas yang kuat tidak tampak pada nanopartikel supernatan *B. subtilis* melainkan munculnya pita serapan dengan intensitas sedang pada bilangan gelombang 1385,79 cm^{-1} (C-H) dan 1184,07 (C-O). Dari hasil overlay menunjukkan bahwa pita-pita spektrum antara nanopartikel supernatan *B. subtilis* mirip dengan nanopartikel PLGA dan menunjukkan beberapa puncak spesifik supernatan *B. subtilis* dengan sedikit pergeseran. Hal ini menunjukkan supernatan telah termuat ke dalam sistem nanopartikel.³⁴ Selain itu tidak terlihat pergeseran secara signifikan pada pita serapan lain yang menunjukkan tidak ada interaksi kimia spesifik lainnya antara obat dan polimer saat diinkorporasikan.³⁵

Hasil analisis DSC menunjukan adanya puncak endotermik nanopartikel supernatan *B. subtilis* pada suhu 318,26°C. Sedangkan, puncak endotermik supernatan *B. subtilis* pada suhu 132,96°C. Puncak endotermik PLGA dalam rentang 45-55°C, yang merupakan suhu transisi gelas (T_g) polimer.³⁶ Puncak supernatan *B. subtilis* dan polimer tidak tampak dalam termogram nanopartikel supernatan *B. subtilis*. Hal ini menunjukkan adanya supernatan *B. subtilis* tidak teratur dan amorf dalam sistem nanopartikel yang

terdispersi ke dalam PLGA selama preparasi nanopartikel. Hilangnya puncak disebabkan karena supernatan *B. subtilis* terdispersi secara molekuler dalam fusi PLGA selama preparasi nanopartikel.²⁷

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa nanopartikel supernatan *B. subtilis* menggunakan PLGA dengan konsentrasi 2,5 mg memiliki karakteristik dengan ukuran partikel rata-rata $545,45 \pm 90,73$, zeta potensial rata-rata didapatkan hasil sebesar -14.57 ± 3.08 mV. Nanopartikel yang terbentuk memiliki bentuk sferis dengan nilai PDI $0,503 \pm 0,065$. Selain itu, supernatan *B. subtilis* telah termuat ke dalam sistem nanopartikel dengan melalui analisis FTIR dan DSC.

Daftar Pustaka

1. Tavares Batista M, Souza RD, Paccez JD, Luiz WB, Ferreira EL, Cavalcante RCM, et al. Gut adhesive *Bacillus subtilis* spores as a platform for mucosal delivery of antigens. *Infect Immun*. 2014;82(4):1414–23.
2. Ramachandran R, Chalasani AG, Lal R, Roy U. A broad-spectrum antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* RLID 12.1. *Sci world J*. 2014;2014.
3. Tazehabadi MH, Algburi A, Popov I V, Ermakov AM, Chistyakov VA, Prazdnova E V, et al. Probiotic *Bacilli* inhibit *Salmonella* biofilm formation without killing planktonic cells. *Front Microbiol*. 2021;12:242.
4. Awais M, Pervez A, Yaqub A, Shah MM. Production of antimicrobial metabolites by *Bacillus subtilis* immobilized in polyacrylamide gel. *Pak J Zool*. 2010;42(3).
5. Benítez-Chao DF, León-Buitimea A, Lerma-Escalera JA, Morones-Ramírez JR. Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models. *Front Microbiol*. 2021;12:677.
6. Fernandez B, Le Lay C, Jean J, Fliss I.

- Growth, acid production and bacteriocin production by probiotic candidates under simulated colonic conditions. *J Appl Microbiol.* 2013;114(3):877–85.
7. Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel).* 2011;3(3):1377–97.
 8. ÜSTÜN, Ayşe; ÖRTÜCÜ, Serkan. Evaluation of nisin-loaded PLGA nanoparticles prepared with rhamnolipid cosurfactant against *S. aureus* biofilms. *Pharmaceutics*, 2022, 14.12: 2756.
 9. Kurniawan DW, Jajoriya AK, Dhawan G, Mishra D, Argemi J, Bataller R, et al. Therapeutic inhibition of spleen tyrosine kinase in inflammatory macrophages using PLGA nanoparticles for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *J Control release.* 2018;288:227–38.
 10. Crucho CIC, Barros MT. Formulation of functionalized PLGA polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Polymer (Guildf).* 2015;68:41–6.
 11. Sonkambale KG, Katedeshmukh RG, Kumbhar AB, Mane S V, Pawar PA, Kadam JN, et al. Formulation and evaluation of nanosuspension for enhancing the solubility of poorly soluble Antihyperlipidemic Drugs. *Eur J Mol Clin Med.* 2021;8(3).
 12. Kurniawan DW, Booiyink R, Pater L, Wols I, Vrynas A, Storm G, et al. Fibroblast growth factor 2 conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (FGF2-SPIONs) ameliorate hepatic stellate cells activation in vitro and acute liver injury in vivo. *J Control Release.* 2020;328(September):640–52.
 13. Pacho MN, Pugni EN, Díaz Sierra JB, Morell ML, Sepúlveda CS, Damonte EB, et al. Antiviral activity against Zika virus of a new formulation of curcumin in poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles. *J Pharm Pharmacol.* 2021;73(3):357–65.
 14. Wong CY, Martinez J, Zhao J, Al-Salami H, Dass CR. Development of orally administered insulin-loaded polymeric-oligonucleotide nanoparticles: statistical optimization and physicochemical characterization. *Drug Dev Ind Pharm.* 2020;46(8):1238–52.
 15. Majumder S, Das NSS, Pandey N, Srivastava T, Ghosha D. Synthesis, characterization of novel PLGA encapsulated indole nanoparticles and study of its cytotoxic potential against A549 lung cancer cell line. *J Appl Pharm Sci.* 2018;8(08):144–50.
 16. Hu F, Liu W, Yan L, Kong F, Wei K. Optimization and characterization of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles 42.
 17. Anwer MK, Al-Mansoor MA, Jamil S, Al-Shdefat R, Ansari MN, Shakeel F. Development and evaluation of PLGA polymer based nanoparticles of quercetin. *Int J Biol Macromol.* 2016;92:213–9.
 18. Raina D, Madhav S. An Innovative Approach for Delivery of Nanosized Duloxetine Via External Acoustic Meatus (EAM) Platform. *Gazi Med J.* 2017;28(4).
 19. Luhurningtyas FP, Vifta RL, Syarohmawati N, Candra MA. Cholesterol lowering effect of chitosan nanoparticles using parijoto fruits extract. *J Farm Sains dan Komunitas (Journal Pharm Sci Community).* 2020;17(2):102–11.
 20. Koopaei MN, Khoshayand MR, Mostafavi SH, Amini M, Khorramizadeh MR, Tehrani MJ, et al. Docetaxel loaded PEG-PLGA nanoparticles: optimized drug loading, in-vitro cytotoxicity and in-vivo antitumor effect. *Iran J Pharm Res IJPR.* 2014;13(3):819.
 21. Chen X, Wang T. Preparation and characterization of atrazine-loaded biodegradable PLGA nanospheres. *J Integr Agric.* 2019;18(5):1035–41.
 22. Heshmati Aghda N, Lara EJ, Patel P, Betancourt T. High Throughput Preparation of Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles Using Fiber Fluidic Reactor. *Materials (Basel).* 2020;13(14):3075.
 23. Hernández-Giottonini KY, Rodríguez-Córdova RJ, Gutiérrez-Valenzuela CA, Peñuñuri-Miranda O, Zavala-Rivera P, Guerrero-Germán P, et al. PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation

- techniques: Effects of formulation parameters. *RSC Adv.* 2020;10(8):4218–31.
24. Masarudin MJ, Cutts SM, Pietersz GA, Evison BJ, Phillips DR, Pigram PJ. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: Application to the passive encapsulation of [(14)C]-doxorubicin. *Nanotechnol Sci Appl.* 2016;9:47.
 25. Singhal M, Baumgartner A, Turunen E, van Veen B, Hirvonen J, Peltonen L. Nanosuspensions of a poorly soluble investigational molecule ODM-106: Impact of milling bead diameter and stabilizer concentration. *Int J Pharm.* 2020;587:119636.
 26. Mittal P, Vardhan H, Ajmal G, Bonde GV, Kapoor R, Mittal A, et al. Formulation, optimization, hemocompatibility and pharmacokinetic evaluation of PLGA nanoparticles containing paclitaxel. *Drug Dev Ind Pharm.* 2019;45(3):365–78.
 27. Soltani S, Zakeri-Milani P, Barzegar-Jalali M, Jelvehgari M. Fabrication and in-vitro evaluation of ketotifen fumarate-loaded PLGA nanoparticles as a sustained delivery system. *Iran J Pharm Res IJPR.* 2017;16(1):22.
 28. Servat-Medina L, González-Gómez A, Reyes-Ortega F, Sousa IMO, Queiroz N de CA, Zago PMW, et al. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: Synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:3897.
 29. Gaonkar RH, Ganguly S, Dewanjee S, Sinha S, Gupta A, Ganguly S, et al. Garcinol loaded vitamin E TPGS emulsified PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization, in vitro and in vivo studies. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–14.
 30. Prihatiningsih N, Djatmiko HA. Enzim Amilase sebagai komponen antagonis *Bacillus subtilis* B315 terhadap *Ralstonia solanacearum* kentang. *J Hama dan Penyakit Tumbuh Trop.* 2016;16(1):10–6.
 31. Singh G, Kaur T, Kaur R, Kaur A. Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. *Int J Pharmacol Pharm Sci.* 2014;1(2):30–42.
 32. Singh G, Faruk A, Bedi PMS. Spectral analysis of drug loaded nanoparticles for drug-polymer interactions. *J Drug Deliv Ther.* 2018;8(6):111–8.
 33. Alam N, Qayum A, Kumar A, Khare V, Sharma PR, Andotra SS, et al. Improved efficacy of cisplatin in combination with a nano-formulation of pentacyclic triterpenediol. *Mater Sci Eng C.* 2016;68:109–16.
 34. Mohanty S, Konkimalla VB, Pal A, Sharma T, Si SC. Naringin as sustained delivery nanoparticles ameliorates the anti-inflammatory activity in a Freund's complete adjuvant-induced arthritis model. *ACS Omega.* 2021;6(43):28630–41.
 35. Mollaeva MR, Yabbarov N, Sokol M, Chirkina M, Mollaev MD, Zabolotskii A, et al. Optimization, characterization and pharmacokinetic study of meso-tetraphenylporphyrin metal complex-loaded PLGA nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12261.
 36. Ansari MJ, Alshahrani SM. Nano-encapsulation and characterization of baricitinib using poly-lactic-glycolic acid co-polymer. *Saudi Pharm J.* 2019;27(4):491–501.