

PENGARUH PENGGUNAAN JENIS PELARUT DALAM UJI SITOTOKSISITAS METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT) PADA *WOUND DRESSING* KOLAGEN-KITOSAN

ARY ANDINI^{1*}, ENDAH PRAYEKTI¹, FADILLAH TRIASMORO¹, DAN NUR ENDAH KAMALIYAH¹

¹Program Studi Analisis Kesehatan, Fakultas Kesehatan, Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya
Jalan Raya Jemursari No. 51-57, Jemur Wonosari, Wonocolo, Surabaya, 60237

*alamat email korespondensi: aryandini@unusa.ac.id

Informasi Artikel	Abstrak/Abstract
Riwayat Naskah : Diterima pada 06 Januari 2021 Diterima setelah direvisi pada 26 Juni 2021 Diterbitkan pada 30 Juni 2021	Kolagen dan kitosan dapat digunakan sebagai bahan pembalut luka karena memiliki karakteristik yang baik. Namun, pembalut luka kolagen-kitosan perlu dilakukan uji sitotoksitas sebelum diaplikasikan secara <i>in vivo</i> , seperti <i>Brine Shrimp Lethally Test</i> (BSLT). Pembalut luka kolagen-kitosan tidak dapat larut dalam Dimetil Sulfoxida (DMSO) dan aquadest dengan mudah, oleh karena itu perlu pertimbangan alternatif pelarut karena kolagen dan kitosan lebih mudah larut dalam pelarut asam seperti asam klorida (HCl) dan asam asetat (CH_3COOH). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui <i>Lethal Concentration 50</i> (LC_{50}) dari pembalut luka kolagen-kitosan yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, HCl, CH_3COOH dengan metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT). Pembalut luka kolagen-kitosan didapatkan dengan mencampurkan larutan kitosan 2% dan kolagen dengan perbandingan 1:1 w/w kemudian dihomogenkan, dicetak, dan dikeringkan. Penelitian ini menggunakan uji sitotoksitas dengan metode BSLT dan LC_{50} dihitung menggunakan Analisis Probit. Pembalut luka dilarutkan dalam pelarut DMSO 1%, CH_3COOH 1%, dan HCl 1% hingga homogen, kemudian diencerkan dengan berbagai konsentrasi yaitu 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm dengan tiga kali ulangan untuk setiap perlakuan. Setelah itu uji BSLT dilakukan dengan menggunakan <i>Artemia salina</i> . Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembalut luka yang dilarutkan dalam DMSO 1% memiliki $\text{LC}_{50} > 1000$ ppm, sedangkan pada pelarut CH_3COOH dan pelarut HCl menunjukkan $\text{LC}_{50} < 30$. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pelarut DMSO bersifat non-toksik ($\text{LC}_{50} > 1000$ ppm), tetapi pelarut CH_3COOH 1% dan HCl 1% bersifat sangat toksik ($\text{LC}_{50} < 30$ ppm) sebagai pelarut alternatif pembalut luka kolagen-kitosan pada uji BSLT.
Kata Kunci: Sitotoksitas; BSLT; Kolagen; Kitosan; Pembalut Luka.	
<i>Keywords:</i> <i>Cytotoxicity;</i> <i>BSLT;</i> <i>Collagen;</i> <i>Chitosan;</i> <i>Wound Dressing.</i>	<i>Collagen and chitosan could be used for wound dressing due to their excellent properties. But, wound dressing collagen-chitosan needs to cytotoxicity test before applying it in vivo, such as Brine Shrimp Lethally Test (BSLT). Collagen-chitosan wound dressing could not be dissolved in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and aquadest easily, therefore an alternative solvent needs to be considered due to collagen and chitosan is prefer to be dissolved in acid solution such as chloride acid (HCl) and acetic acid (CH_3COOH). The aim of the study is to determine Lethal Concentration 50 (LC_{50}) of collagen-chitosan wound dressing which dissolved in DMSO, HCl, CH_3COOH in Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Wound dressing collagen-chitosan was obtained by mixing 2% chitosan solution and collagen in a ratio of 1:1 (w/w), then homogenized, molded, and dried. The research used a cytotoxicity test by BSLT methods and LC_{50} was calculated using Probit Analysis. Wound dressing is dissolved in a solvent DMSO 1%, CH_3COOH 1%, HCl 1% until homogeny, then diluted in various concentrations such as 100 ppm, 250 ppm, 250 ppm, 500 ppm, and 1000 ppm with three times replication for each assessment. Afterward, BSLT was carried out with <i>Artemia salina</i>. The results study showed that wound dressing which was dissolved in DMSO 1% had $\text{LC}_{50} > 1000$ ppm, however, CH_3COOH 1% solvent and HCl 1% solvent were $\text{LC}_{50} < 30$ ppm. As the conclusion of the research explained DMSO was non-toxic ($\text{LC}_{50} > 1000$ ppm), but CH_3COOH 1% and HCl 1% were very toxic ($\text{LC}_{50} < 1000$ ppm) as an alternative solvent for wound dressing collagen-chitosan in BSLT.</i>

PENDAHULUAN

Kolagen merupakan tahapan terpenting dalam penyembuhan sebuah luka [1]. Kemampuan yang dimiliki kolagen antara lain homeostasis, interaksi dengan trombosit, interaksi dengan

fibronektin, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler, meningkatkan faktor pertumbuhan dan mendorong proses fibroplasia dan terkadang pada proliferasi epidermis [2] [3]. Manfaat adanya kolagen untuk

mempercepat pemulihan pada jaringan yang rusak.

Kolagen terdapat dari sisik ikan gabus sebagai kolagen derivat, dan diekstrak [4] [5]. Hal tersebut mengakibatkan suhu denaturasi kolagen sisik ikan relatif rendah dan membuatnya menjadi protein yang mudah dicerna. Kolagen memiliki keunggulan dibandingkan hewan ternak karena halal untuk dikonsumsi, memiliki imunoreaktivitas yang rendah, bebas dari *bovine spongiform encephalopathy* (BSE), *foot and mouth disease* (FMD), *avian and swine influenza* [1] [6]. Selain itu, kolagen kandungan kolagen dari limbah perikanan baik dari kulit, sisik dan tulang ikan cukup tinggi sehingga kegunaan yang lebih beragam dapat digunakan dalam industri makanan, kosmetik dan medis [7] [8].

Ikan Gabus memiliki kandungan tinggi protein dengan tiga asam amino utama yaitu glisin yang berperan penting dalam sintesis kolagen, glutamin yang berperan penting dalam fase inflamasi dan proliferasi penyembuhan luka sekaligus sebagai sumber energi, serta arginin yang berperan dalam sistem imun dan menstimulasi sel-sel endothelial [5] [9]. Berdasarkan keunggulan tersebut, maka kolagen dari sisik dan kulit ikan Gabus dapat dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan *wound dressing*. Perpaduan antara kolagen dan kitosan sebagai *wound dressing* dapat menghasilkan biomaterial unggul dalam penyembuhan luka, karena kitosan memiliki sifat bioaktif, non-toksik, biokompatibel, biodegradabel, anti-mikroba dan anti-jamur [3] [5] [10] [11].

Kitosan mampu berinteraksi dengan senyawa dipermukaan sel bakteri dan menyerap hingga membentuk sebuah lapisan yang dapat menghambat saluran transportasi sel, sehingga sel akan kekurangan substansi untuk berkembang dan mati, namun kitosan memiliki kekurangan yaitu tidak dapat menyerap air dengan baik sehingga dapat menyebabkan sifat antibakterinya tidak dapat bertahan lama dan mengakibatkan mikroba dapat berkembangbiak [12]. Oleh karena itu, harus dilakukan uji sitotoksitas sebelum penelitian diimplementasikan secara *In Vivo*, salah satunya adalah dengan menggunakan uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

Uji sitotoksitas dengan metode BSLT dapat dilakukan dengan cepat, murah, dan mudah, sehingga banyak digunakan sebagai tahap awal (skrining) dalam penapisan ekstrak [13]. Hasil uji BSLT berupa nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50*) yang menunjukkan konsentrasi paparan zat toksik terhadap 50% biota uji mati [14]. Pengetahuan bioaktivitas senyawa salah satunya melakukan uji toksisitas tahap awal *brine shrimp* (udang laut) yang berjenis *Artemia salina*. Larva udang merupakan

organisme sederhana dan paling kecil dari biota laut dan memiliki kepekaan yang cukup tinggi terhadap senyawa toksik [15]. Adapun kategori toksisitas menurut Meyer *et al.* (1982) dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Kategori toksisitas [15].

Kategori	LC_{50} (ppm)
Sangat toksik	< 30
Toksik	30 – 1000
Tidak toksik	> 1000

Sebelum dilakukan uji BSLT, komposit kolagen-kitosan perlu dilakukan pengenceran pada berbagai konsentrasi mulai dari rendah hingga ke tinggi untuk mengetahui reaksi senyawa aktif komposit terhadap mortalitas larva udang *artemia salina* Leach. Uji BSLT pada *wound dressing* kolagen-kitosan telah dilakukan oleh Andini *et al.* (2020), namun proses pelarutan komposit kolagen-kolagen tidak larut dalam aquades, sedangkan dalam pelarut standar DMSO 1% membutuhkan waktu lama untuk larut. Hal ini dikarenakan karakteristik dari kolagen-kitosan yang lebih larut dalam larutan asam. Pelarut kolagen dan kitosan yang seringkali digunakan adalah asam asetat (CH_3COOH) dan asam klorida (HCl). Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui pelarut alternatif komposit kolagen-kitosan yang dapat digunakan untuk uji BSLT dengan mengetahui nilai LC_{50} pada pelarut asam asetat dan asam klorida.

EKSPERIMEN

Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL). Uji sitotoksitas yang digunakan pada komposit kolagen-kitosan menggunakan *metode Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan biota uji adalah *Artemia salina* Leach. Terdapat 3 kelompok yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, kelompok kontrol dengan menggunakan pelarut standar DMSO 1%, dan kelompok perlakuan dengan menggunakan pelarut CH_3COOH 1% dan HCl 1%. Pengenceran komposit kolagen-kitosan pada masing-masing pelarut dilakukan pada konsentrasi 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 1000 ppm.

Material

Bahan yang diperlukan untuk penelitian ini berdasarkan tahap ekstraksi kolagen meliputi kulit dan sisik Ikan gabus yang didapatkan dari penjual ikan di desa Banjar Asri, Kecamatan Tanggulangin, Kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur, HCl glasial SAP yang diencerkan menjadi HCl 2%, NaOH Merck,

Jerman 1 M, kitosan serbuk dari cangkang *Black Tiger* dengan *medical grade* yang dibeli dari Monodon. Sedangkan bahan yang digunakan untuk uji sitotoksitas metode BSLT adalah asam asetat glasial SAP yang diencerkan menjadi CH₃COOH 1%, telur *Artemia salina* Leach, Medika alkohol 70%, garam laut, akuades, dimetil sulfoksida Merck 1%, asam klorida 1%.

Instrumentasi

Alat yang akan digunakan dalam proses ekstraksi adalah beaker glass Pyrex, gelas corong Pyrex, kain saring, aluminium foil merk Best Fresh, spatula, gelas ukur Pyrex, spatula, pipet volume dan pipet tetes. Sedangkan untuk uji BSLT menggunakan alat yaitu cawan petri, aluminium foil, aerator, baskom, pipet tetes, spatula, gelas ukur, dan pipet volume.

Prosedur

Ekstraksi kolagen Ikan gabus

Ekstraksi kolagen dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan menyiapkan kulit dan sisik Ikan gabus yang telah dibersihkan sebelumnya. Pada tahap selanjutnya, dilakukan perendaman sisik dan kulit Ikan gabus dalam larutan HCl 2% dengan perbandingan 1:8 w/v selama 48 jam didalam lemari es (suhu 4°C), kemudian pisahkan filtrat dengan residu. Penambahan NaOH 1 M diberikan pada filtrat secara perlahan hingga terbentuk serabut putih kolagen (pH netral). Selanjutnya, dilakukan pemisahan serabut kolagen dan kolagen basah yang didapatkan selanjutnya dikemas dalam wadah steril dan disimpan dalam lemari es [4] [16].

Pembuatan komposit kolagen-kitosan

Komposit yang digunakan sebagai sampel berasal dari kolagen basah dan kitosan. Proses pembuatan kitosan 2% dilakukan dengan menimbang serbuk kitosan 2 g dan dilarutkan dalam asam asetat 1%, kemudian dihomogenkan dengan *stirrer* hingga kitosan larut sempurna [4] [17] [18].

Sampel yang digunakan dalam penelitian merupakan komposit kolagen-kitosan dengan konsentrasi perbandingan 1:1 (w/w) dengan mencampurkan kitosan 10 g dan kolagen 10 g hingga homogen, selanjutnya komposit dicetak dalam cetakan steril yang telah disediakan dan mendinginkan hingga komposit kolagen-kitosan mengering [4].

Penetasan Artemia Salina Leach

Penetasan telur *Artemia salina* Leach dilakukan didalam air dengan kandungan garam (air laut) sehingga dalam penelitian ini digunakan air yang ditambahkan dengan garam laut. Sebanyak 2 g telur *Artemia salina* Leach dimasukkan dalam air dan ditambahkan aerator sebagai oksigen serta cahaya hingga telur menetas selama 48 jam [5] [19].

Preparasi sampel uji BSLT

Komposit kolagen-kitosan 2,17 g dilarutkan dalam tiga pelarut berbeda yaitu DMSO 1% 100 ml, CH₃COOH 1% 100 ml dan HCl 1% 100 ml sehingga masing-masing didapatkan konsentrasi 1000 ppm (larutan induk). Selanjutnya, larutan induk dari masing-masing pelarut dilakukan pengenceran sehingga didapatkan konsentrasi 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm dalam 100 ml (larutan sampel) [5] [20].

Uji BSLT

Uji BSLT dilakukan dengan cara memipet 5 ml air garam yang diletakkan dalam cawan petri. Kemudian ditambahkan 5 ml larutan sampel. Sebanyak 10 ekor *Artemia salina* Leach dimasukkan dalam larutan tersebut dan diinkubasi selama 24 jam [21]. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang masih hidup dan dihitung LC₅₀ menggunakan excel untuk menentukan nilai probit *Artemia salina*. Uji ini dilakukan replikasi sebanyak tiga kali untuk masing-masing kelompok [5][20].

Analisa hasil

Efek sitotoksitas dapat dilakuakan dengan perhitungan % mortalitas larva *Artemia salina* kematian dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Total jumlah larva awal}} \times 100\% \quad (1)$$

Tingkat kematian atau mortalitas (%) diperoleh dengan membandingkan jumlah larva mati dibagi dengan total larva. Nilai LC₅₀ diperoleh dari penentuan nilai probit, yaitu mengkonversi nilai persen kematian dengan tabel probit. Plotting data antara nilai probit dengan log konsentrasi akan diperoleh persamaan regresi sebagai berikut [15] [20]:

$$y = ax + b \quad (2)$$

Keterangan :

- y = nilai probit
- a = konsentrasi regresi
- x = logaritma₁₀ konsentrasi uji
- b = kemiringan regresi

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental tentang Pengaruh Pelarut Komposit Kolagen-Kitosan pada Uji Sitotoksitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Penelitian dilakukan untuk mengetahui efek yang terjadi pada larva *Artemia salina* Leach akibat pelarut komposit kolagen-kitosan dalam senyawa asam.

Artemia salina sebagai hewan uji yang digunakan harus berusia 48 jam, karena aktif bergerak pada fase larva dan fase paling aktif untuk membelah secara mitosis sehingga identik sebagai sel kanker [22]. Pada penelitian ini, dilakukan uji BSLT dengan menggunakan berbagai jenis pelarut. Variasi pelarut dalam penelitian ini memberikan pengaruh terhadap hasil tingkat kelarutan komposit-kolagen yang selanjutnya digunakan untuk pengujian sitotoksitas dengan menggunakan metode BSLT. Hasil uji BSLT dapat dilihat pada **Tabel 2**, **Tabel 3**, dan **Tabel 4**. Sedangkan untuk klasifikasi hasil penelitian berdasarkan nilai LC_{50} menurut Meyer *et al.* dapat dilihat pada **Tabel 5**.

Tabel 2. Persentase kematian *A. salina* dalam pelarut DMSO.

Konsentrasi (ppm)	Log10 (ppm)	% kematian	Probit
100	2.00	3%	-
250	2.40	3%	3.12
500	2.70	0	0
750	2.88	10%	3.72
1000	3.00	30%	4.48

Tabel 3. Persentase kematian *A. salina* dalam Pelarut HCl 1%.

Konsentrasi (ppm)	Log10 (ppm)	% kematian	Probit
100	2.00	100%	8.09
250	2.40	100%	8.09
500	2.70	100%	8.09
750	2.88	100%	8.09
1000	3.00	100%	8.09

Tabel 4. Persentase kematian *A. salina* CH₃COOH 1%.

Konsentrasi (ppm)	Log10 (ppm)	% kematian	Probit
100	2.00	100%	8.09
250	2.40	100%	6.13
500	2.70	100%	8.09
750	2.88	87%	8.09
1000	3.00	100%	8.09

Tabel 5. Hasil LC_{50} pada Uji BSLT.

NO	Grup	LC_{50}	Keterangan
1	DMSO 1%	>1000	Tidak Toksik
2	CH ₃ COOH 1%	<30	Sangat Toksik
3	HCl 1%	<30	Sangat Toksik

Berdasarkan klasifikasi kondisi toksisitas menurut Meyer *et al.* (1982), maka hasil uji menunjukkan bahwa komposit kolagen kitosan yang dilarutkan dalam DMSO 1% menunjukkan tidak toksik dengan hasil $LC_{50} > 1000$ ppm. Hasil uji BSLT pada komposit kolagen-kitosan yang dilarutkan menunjukkan nilai $LC_{50} < 30$ sehingga bersifat sangat toksik [15].

Pelarut pertama yang digunakan dalam penelitian adalah DMSO 1%. Dimetil sulfoksida (DMSO) merupakan suatu cairan jernih, tidak berbau, bersifat menyerap molekul air dengan baik (higroskopis), larut dalam air, larut dalam alkohol, aseton, kloroform, eter, dan dalam benzena. Berdasarkan hasil penelitian, didalam pelarut dimetyl sulfoksida (DMSO) tidak banyak terjadi kematian larva *Artemia salina* Leach dalam pelarut karena DMSO 1% memiliki sifat *universal* tidak bersifat toksik, berdasarkan dari hasil yang didapatkan pada LC_{50} sebesar 3890,45145 [15]. Secara farmologis pelarut DMSO juga sangat aman digunakan karena memiliki kandungan toksisitas yang rendah pada manusia dan tidak membahayakan lingkungan [23]. Oleh karena itu, selain aquades, DMSO 1% digunakan sebagai pelarut senyawa utama dalam uji BSLT.

Pelarut kedua yang digunakan adalah HCl 1%. Asam Klorida (HCl) merupakan larutan akuatik dari gas hidrogen klorida merupakan asam kuat sebagai komponen utama pada asam lambung. HCl merupakan asam monoprotic yang mampu berdisosiasi melepaskan satu H^+ , termasuk dalam larutan asam kuat karena mampu untuk berdisosiasi secara penuh dalam air [24]. Asam klorida merupakan cairan yang bersifat korosif dan sangat berbahaya bagi manusia, sehingga perlu digunakan sebagai uji pembandingan pada komponen yang menunjukkan ada atau tidaknya kandungan toksisitas pada komposit kolagen-kitosan. Pengujian pelarut HCl sebagai pelarut perlu dipertimbangkan karena sifat HCl yang mampu untuk melarutkan kolagen dan kitosan secara cepat dan menyeluruh. Namun, berdasarkan hasil penelitian menunjukkan jika tingkat % kematian *Artemia salina* pada hampir setiap konsentrasi tinggi yang mempengaruhi nilai LC_{50} . Berdasarkan hasil penelitian, pelarut HCl 1% menunjukkan nilai LC_{50} sebesar 61,66 ppm yang menunjukkan jika pelarut yang digunakan bersifat toksik. Efek toksisitas tersebut membunuh seluruh larva *artemia salina* mulai dari pengulangan pertama hingga

pengulangan ketiga. Hal tersebut dapat terjadi karena HCl memiliki kandungan pengasam paling efektif, dan dapat mendenaturasi membran sel [15] [25] yang berdampak pada tingginya kematian *Artemia salina*. Oleh karena itu, pelarut HCl 1% belum layak digunakan untuk pelarut kolagen-kitosan pada uji BSLT.

Pelarut ketiga yang digunakan dalam penelitian yaitu CH₃COOH 1%. Asam asetat (CH₃COOH) merupakan bahan kimia yang cair, tidak berwarna dan memiliki aroma yang sangat tajam. Asam asetat dikenal sebagai asam cuka yang merupakan asam karboksilat yang paling sederhana setelah asam format [24]. Asam asetat termasuk asam lemah yang tercampur dengan air akan berdisosiasi menjadi H⁺ dan CH₃COOH⁻ [24] [26]. Konstanta dielektrik asam asetat yaitu 6,2 sehingga mudah bercampur dengan senyawa polar atau nonpolar lainnya seperti air, kloroform dan n-heksana, sehingga pelarut asam asetat seringkali digunakan untuk industry. Meskipun asam asetat bersifat asam lemah dengan pKa 10⁻⁵, namun mampu untuk melarutkan suatu protein [27]. Berdasarkan hasil uji BSLT menunjukkan jika komposit kolagen-kitosan yang dilarutkan dalam asam asetat bersifat sangat toksik dengan nilai LC₅₀ < 30. Namun, prosentase kematian *Artemia salina* tidak terjadi pada setiap konsentrasi pengenceran sampel. Hal ini dapat disebabkan karena sifat dari asam asetat yang bersifat asam lemah dibandingkan asam klorida yang bersifat asam kuat.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan jika pelarut asam tidak dapat digunakan sebagai pertimbangan pelarut pengganti DMSO 1% pada uji BSLT karena bersifat sangat toksik bagi kelangsungan hidup *Artemia salina*. Namun, penelitian ini masih bisa dikembangkan dengan menggunakan asam asetat sebagai pelarut senyawa larut asam dengan konsentrasi yang sangat rendah (<1%) sebagai pertimbangan alternatif pelarut untuk uji BSLT.

SIMPULAN

DMSO dan CH₃COOH merupakan larutan non toksik untuk melarutkan komposit kolagen-kitosan pembalut luka dalam metode BLST karena LC₅₀ > 1000, tetapi larutan CH₃COOH dan HCl merupakan larutan yang sangat toksik karena LC₅₀ < 30.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya (UNUSA) yang telah mendukung dalam terselenggaranya penelitian dan

Laboratorium Kimia Kesehatan UNUSA yang memfasilitasi pelaksanaan kegiatan penelitian ini.

REFERENSI

- [1] A. Andini, R. Handajani, S. Koesnowidagdo, M.Z. Ichsan, and L. Phiginelli, "In vivo effectivity of collagen extract from clarias gariepinus (Burchell, 1822) ' Sangkuriang ' on formation of malondialdehyde and macrophages in burn healing", *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences*, vol. 57, no. 3, pp. 35–40, 2020.
- [2] B. Triyono, "Perbedaan Tampilan Kolagen di Sekitar Luka Insisi Pada Tikus Wistar Yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang tidak Diberi Levobupivakain", *Thesis*, Pascasarjana Universitas Diponegoro, 2005.
- [3] A. Mohandas, S. Deepthi, R. Biswas, and R. Jayakumar, "Chitosan based metallic nanocomposite scaffolds as antimicrobial wound dressings", *Bioactive Materials*, vol. 3, no. 3, pp. 267–277, 2018
- [4] A. Andini and E. Prayekti, "Chitosan as antifungal in channa striata collagen chitosan for wound healing", *Medical and Health Science Journal*, vol. 3, no. 2, 2019
- [5] A. Andini, E. Nidianti, and E. Prayekti, "Cytotoxicity assay of chitosan-collagen wound dressing using brine shrimp lethality test methods", *Jurnal Biomedika*, vol. 13, no. 1, pp. 9–14, 2020
- [6] A. Andini, R. Handajani, and Soetjipto, "Sangkuriang catfish (clarias gariepinus var) skin activity on fibroblast and collagen synthesis for skin burn healing", *Proceeding of Surabaya International Health Conference*, pp. 347–351, 2017
- [7] L.M. Leong, A.Z. Sahalan, L.H. Tan, N.H. Mustafa, and N.F. Rajab, "Clarias batrachus collagen extract increases fibroblast cell adhesion, migration and proliferation", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 5, no. 3, pp. 19–23, 2015
- [8] W.K. Song, D. Liu, L.L. Sun, B.F. Li, and H. Hou, "Physicochemical and biocompatibility properties of type I Collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for biomedical applications", *Marine Drugs*, vol. 17, no. 3, pp. 137, 2019
- [9] P. Rahayu, F. Marcelline, E. Sulistyaningrum, M.T. Suhartono, and R.R. Tjandrawinata, "Potential effect of striatin (DLBS0333), a bioactive protein fraction isolated from channa striata for wound treatment", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol.

- 6, no. 12, pp. 1001–1007, 2016
- [10] S. Ahmed and S. Ikram, “Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing”, *Achievements in the Life Sciences*, vol. 10, no. 1, pp. 27–37, 2016
- [11] F.R. Putri and S. Tasminatun, “Efektivitas Salep kitosan terhadap penyembuhan luka bakar kimia pada rattus norvegicus”, *Mutiara Medika Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, vol. 12, no. 1, pp. 24–30, 2012
- [12] A. Octavian, “Kajian Sifat Fisik-Mekanik dan Antibakteri Plastik Kitosan Termodifikasi Kolagen Limbah Sisik Ikan Kakap Merah”, *Thesis*, Universitas Negeri Semarang, 2015.
- [13] W.T. Fajarningsih N.D., Januar H.I., Nursid M, “Potensi antitumor ekstrak spons crella papilata asal taman nasional seribu”, *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi. Kelautan dan Perikanan*, vol. 1, no. 1, pp. 35–42, 2006.
- [14] J. Soemirat, *Toksikologi Lingkungan*. 2005.
- [15] M.J. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols Dj, “Brine Shrimp lethality test: a convenient general bioassay for active plant constituents”, *Planta Medica*, vol. 45, no. 5, pp. 31–34 1982.
- [16] D.A.P. Puspitasari, V.P. Bintoro, and B.E. Setiani, “The Soaking effect on different hydrochloride acid level and soaking time on Ph, Swelling percentage and collagen yield of chicken shank bone”, *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, vol. 38, no. 2, pp. 98–102, 2013
- [17] N. Istiqomah, D.I. Rudyardjo, and S. Sumarsih, “Pembuatan hidrogel kitosan – glutaraldehid untuk aplikasi penutup luka secara in vivo,” *Jurnal Fisika dan Terapannya.*, vol. 1, no. 1, pp. 30–49, 2015.
- [18] A.A.R. Putra, “Pengaruh pemberian gel chitosan terhadap penyembuhan luka insisi pada tikus putih (Rattus norvegicus)”, *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, vol. 2, no. 4, pp. 442–449, 2018.
- [19] A.D. Muaja, H.S.J. Koleangan, and M.R.J. Runtuwene, “Uji Toksisitas dengan metode bslt dan analisis kandungan fitokimia ekstrak daun soyogik (saurauia bracteosa DC) dengan metode soxhletasi”, *Jurnal MIPA*, vol. 2, no. 2, p. 115, 2013.
- [20] A. Andini, E. Prayekti, D. Dyah Wulandari, and E. Nidianti, “Cytotoxicity assay using brine shrimp lethality test on collagen-chitosan wound dressing sterilized by ultraviolet light”, *Indonesia Journal of Medical Laboratory Science and Technology*, vol. 2, no. 1, pp. 21–26, 2020
- [21] Z. Zuraida, “Analisis toksisitas beberapa tumbuhan hutan dengan metode brine shrimp lethality test (BSLT) (Toxicity analysis of forestry plants using brine shrimp lethality test (BSLT) method)”, *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, vol. 36, no. 3, pp. 239–246, 2018.
- [22] N.K. Subekti, “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Daun Laban Abang terhadap Larva Udang dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)”, *Skripsi*, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta, 2014.
- [23] A.S. Afandi, “Penggunaan Dimetil Sulfoksida (DMSO) Sebagai Pelarut Untuk Analisis Uji Batas ‘Cemaran Organik Mudah Menguap’ Menggunakan Kromatografi Gas”, *Skripsi*, Universitas Airlangga, 2007.
- [24] E.N. Setyaningrum, “Efektivitas penggunaan jenis asam dalam proses ekstraksi pigmen antosianin kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan penambahan aseton 60%”, *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*, vol. 1, pp. 1–36, 2010.
- [25] G. Gao, L. and Mazza, “Ekstraksi Antosianin Pewarna Merah Alami dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.): Kajian HCl dan Aplikasinya Pada Yoghurt”, 1996.
- [26] C. Samuel B.S. and F. Malau, “Pra Rencana Pembuatan Asam Asetat dengan Kapasitas 86.000 Ton/Tahun”, *Skripsi*, Universitas Sriwijaya, 2019.
- [27] N. Yuliasari, H. Herlina, and W. Aprianto, “Pengaruh Asam asetat terhadap konsentrasi Fe, Cu dan Protein daun eceng gondok (*Eichornia crassipes*)”, *Jurnal Penelitian Sains*, vol. 14, no. 2, pp. 28–32, 2011.