



**POTENSI EKSTRAK KULIT BUAH PEPAYA (*Carica papaya* L.)
UNTUK ISOLASI KOLAGEN CUMI-CUMI (*Loligo* sp.)
SEBAGAI PENYEMBUHAN LUKA KULIT MENCIT (*Mus musculus*)**

**THE POTENTIAL OF PAPAYA PEEL (*Carica papaya* L.) TO SQUID COLLAGEN (*Loligo* sp.)
ISOLATION FOR WOUND HEALING OF MICE SKIN (*Mus musculus*)**

Angelia Astria¹, Aniek Prasetyaningsih^{2*}, Vinsa Cantya Prakasita²

¹Program sarjana Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana 55224 Yogyakarta, Indonesia

²Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana 55224 Yogyakarta, Indonesia

*Corresponding author: aniek@staff.ukdw.ac.id

Naskah Diterima: 10 April 2020; Direvisi: 7 Maret 2021; Disetujui: 3 Maret 2023

Abstrak

Kulit buah pepaya merupakan bagian dari buah pepaya yang tidak dikonsumsi dan mengandung enzim papain yang dapat digunakan sebagai pengganti papain murni untuk mengekstraksi kolagen. Tentakel cumi-cumi merupakan salah satu dari bahan baku *marine collagen*. Ekstraksi kolagen dari tentakel cumi-cumi menggunakan metode maserasi menggunakan CH_3COOH dan penambahan ekstrak kulit buah pepaya pada konsentrasi 5, 10, 15, dan 20%. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi 15% ekstrak kulit buah pepaya memberikan rendemen yang terbaik yaitu 19,2% (w). Kolagen yang dihasilkan memenuhi kriteria Badan Standardisasi Nasional (BSN) (2014) pada jumlah mikrobial dan total *coliform* tetapi belum memenuhi pada kadar protein, pH, dan kadar air. Pada uji preklinis digunakan kolagen hasil ekstraksi dengan penambahan 20% ekstrak kulit buah pepaya yang memenuhi kriteria BSN dengan kadar protein terbanyak. Serum kolagen dibuat menjadi tiga konsentrasi, yaitu 5, 10, dan 20 mg/mL. Hasil pengujian preklinis menunjukkan bahwa kelompok perlakuan kolagen 20 mg/mL memiliki presentase penutupan luka kulit mencit terbaik sebesar 84,61%, dari hasil pengujian statistik menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan dengan kelompok perlakuan kontrol positif.

Kata Kunci: Kolagen; Kulit buah pepaya; Papain; Tentakel Cumi-Cumi

Abstract

The papaya peel, which is a part of papaya not typically consumed, contains the papain enzyme that can be used as a substitute for pure papain to extract the collagen. Squid tentacles are one of the main sources of marine collagen. The extraction of collagen from squid tentacles was conducted using a maceration method with CH_3COOH solvent, and the papaya peel extract was added at concentrations of 5, 10, 15, and 20%, respectively. The extraction process showed that the addition of 15% papaya peel extract provided the best result of 19.2% (w). The collagen produced in this experiment met the BSN criteria for total microbes and total coliforms. However, it did not yet comply with the BSN criteria for protein content, pH, and water levels. The preclinical testing utilized the extracted collagen and the papaya peel extract with a 20% concentration, which met the BSN standards with the highest protein level. The serum collagen was divided into three concentrations: 5 mg/ml, 10 mg/ml, and 20 mg/ml. Preclinical studies showed that the treatment group receiving 20 mg/mL collagen exhibited the highest percentage of skin wound healing at 84.61%, and the statistical test found no significant difference compared to the positive control treatment group.

Keywords: Collagen; Papaya peel; Papain; Squid tentacles

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v16i2.17629>

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang dikenal sebagai megabiodiversitas, terutama memiliki hasil laut yang melimpah termasuk di dalamnya, yaitu cumi-cumi (*Loligo* sp.). Hewan yang termasuk filum *Mollusca* ini telah diekspor sebanyak 2.312,7 ton pada Januari-April 2019 dan meningkat menjadi 3.773,4 ton pada Januari-April 2020 (Badan Pusat Statistik (BPS), 2020a). Peningkatan jumlah ekspor cumi-cumi seiring dengan peningkatan pendapatan negara dari nilai ekspor tersebut. Pada April tahun 2020, nilai ekspor cumi-cumi meningkat mencapai 51.647 USD dari nilai ekspor sebelumnya yang hanya 23.977 USD pada Oktober 2019 (Badan Pusat Statistik (BPS), 2020b).

Cumi-cumi termasuk biota laut yang sangat digemari masyarakat karena memiliki kandungan nutrisi yang baik. Komponen nutrisi cumi-cumi yaitu $60,34 \pm 0,09\%$ air, $31,79 \pm 0,50\%$ protein, $1,10 \pm 0,50\%$ lemak, dan $07,26 \pm 0,10\%$ abu (Veeruraj et al., 2015). Kadar protein pada kulit cumi-cumi lebih tinggi dari kadar protein pada kulit hiu (24,75%) (Kittiphattanabawon et al., 2010). Tingginya kadar protein pada cumi-cumi sangat berhubungan dengan kandungan kolagen di dalamnya. Joy et al. (2017) menjelaskan bahwa setiap bagian tubuh cumi-cumi mengandung kolagen. Pada kulit cumi-cumi (*Loligo formosana*) ditemukan $75,3 \pm 1,20\%$ kolagen (Kittiphattanabawon et al., 2015), pada mantel cumi-cumi (*Loligo vulgaris*) ditemukan 24,2% kolagen (Cozza et al., 2016) sedangkan pada tentakel cumi-cumi (*Dosidicus gigas*) ditemukan $61,23 \pm 2,32\%$ (Torres-Arreola et al., 2008). Cumi-cumi dapat menjadi sumber *marine collagen* sebagai alternatif pengganti kolagen yang bersumber dari mamalia. Ditinjau dari segi keamanan produk, *marine collagen* diketahui aman dari kontaminasi biologi, dari segi budaya dan agama dapat diterima oleh semua lapisan masyarakat. Kolagen dari biota laut juga memiliki keunggulan karena bersifat lebih absorban, yaitu lebih mudah diserap pada penggunaan tropikal dibanding kolagen dari mamalia (Sripriya & Kumar, 2015).

Ekstraksi kolagen dapat dilakukan dengan menggunakan enzim pepsin, dan menghasilkan rendemen kolagen yang lebih baik daripada menggunakan asam (Cozza et al., 2016). Namun enzim pepsin memiliki kelemahan dari segi ekonomi dan nilai halal. Menurut Jamilah et al. (2013) kolagen yang diekstraksi dengan enzim papain, lebih baik dibandingkan dengan enzim pepsin. Pepaya (*Carica papaya*) merupakan bahan baku dari enzim protease yaitu enzim papain, setiap bagian tanaman pepaya memiliki kandungan enzim papain salah satunya adalah kulit buah pepaya. Tanaman pepaya juga termasuk tanaman yang mudah ditemukan di Indonesia, di Yogyakarta sendiri terdapat perkebunan pepaya yaitu perkebunan Pepaya California.

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi kolagen dari tentakel cumi-cumi dengan penambahan ekstrak kulit buah pepaya. Penambahan ekstrak kulit buah pepaya dimaksudkan sebagai alternatif pengganti enzim papain murni mengingat adanya kandungan enzim protease di dalam getah pepaya, sehingga dapat menghasilkan kolagen yang berkualitas lebih baik. Kulit buah pepaya juga merupakan bagian yang tidak dikonsumsi, sehingga dapat diperoleh nilai pengolahan limbah. Hasil ekstraksi kolagen dalam bentuk sediaan serum digunakan untuk penyembuhan luka kulit mencit (*Mus musculus*), karena kolagen merupakan protein yang dapat membantu dalam proses penyembuhan luka dengan pemberian secara tropikal pada area luka (Setyowati & Setyani, 2015). Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi perkembangan dan kemajuan pemanfaatan keanekaragaman hayati laut yang memiliki nilai komersial.

MATERIAL DAN METODE

Bahan yang digunakan adalah cumi-cumi (*Loligo* sp.) segar dari laut selatan, Yogyakarta. Buah Pepaya California (*Carica papaya* L.) yang digunakan adalah buah pepaya muda berumur 2–3 bulan dari perkebunan Pepaya California di Sleman, Yogyakarta. Mencit jantan (*Mus musculus*) dari peternakan tikus lover Yogyakarta. Waktu penelitian dilakukan dari Februari sampai Juni 2020, bertempat di Laboratorium Dasar, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana.

Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Pepaya

Pembuatan ekstrak kulit buah pepaya menggunakan metode Zufahair et al. (2014) yang termodifikasi. Kulit buah pepaya segar sebanyak 800 g dihaluskan menggunakan blender dengan ditambahkan *buffer* fosfat dingin 0,1 M pH 7 sebanyak 800 mL. Ekstrak kulit buah pepaya diambil

dengan cara diperas menggunakan kain mori kemudian filtrat disaring dengan kertas saring Whatman no 42. Ekstrak kulit pepaya kemudian disimpan dalam suhu 4 °C.

Pengujian Aktivitas Enzim Protease Ekstrak Kulit Buah Pepaya

Pengujian aktivitas enzim protease ekstrak kulit buah pepaya menggunakan metode Zufahair et al. (2014) dengan modifikasi yaitu berdasarkan pada kemampuan enzim protease menghidrolisis substrat kasein murni. Sebanyak 0,5 mL substrat kasein 1% (b/v) dalam *buffer* Tris-HCl 0,1M pH 5 dilakukan pra-inkubasi pada suhu 35 °C selama 5 menit. Sebanyak 0,5 mL ekstrak kulit buah pepaya ditambahkan untuk memulai reaksi enzim, kemudian campuran tersebut diinkubasi pada suhu 35 °C selama 30 menit. TCA 5% (b/v) sejumlah 0,5 mL dingin ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzim. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 6.000 g, suhu 4°C selama 15 menit. Endapan dipisahkan dari supernatan kemudian supernatan ditambah 2,5 mL Na₂CO₃ 0,5M dan 0,5 mL follin ciocalteau 20% dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 30 menit. Larutan diukur pada spektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm. Larutan kontrol positif dibuat dengan cara yang sama, yaitu dengan penambahan larutan TCA 5% (b/v) setelah pra-inkubasi 5 menit. Larutan tirosin digunakan untuk membuat kurva standar dalam pengukuran aktivitas proteolitik. Aktivitas protease setelah inkubasi 30 menit dihitung menggunakan rumus, yaitu aktivitas protease

$$U/mL = \frac{OD \text{ sampel} - OD \text{ kontrol}}{30 \text{ menit} \times ml \text{ ekstrak}} \times \text{faktor pengencer.}$$

Preparasi Tentakel Cumi-cumi

Preparasi tentakel cumi-cumi menggunakan metode Kittiphattanabawon et al. (2015) dengan modifikasi. Preparasi tentakel dimulai dari mencuci cumi-cumi menggunakan air dingin, dipisahkan tentakel dari tubuh, dicuci dengan air dingin, ditiriskan tentakel, dan dipotong ukuran 0,1 × 0,1 cm² menggunakan pisau. Tentakel dicampur NaOH 0,1 M dengan rasio sampel dan larutan 1:10 (b/v) selama 6 jam, setiap 2 jam sekali NaOH 0,1 M diganti. NaOH 0,1 M berguna untuk menghilangkan protein non-kolagen. Tentakel dicuci dengan air mengalir hingga pH tentakel netral. Kemudian butil alkohol 10% (v/v) dicampurkan untuk menghilangkan lemak dengan perbandingan tentakel: butil alkohol adalah 1:10 (b/v). Inkubasi dilakukan selama 18 jam dan diganti butil alkohol setiap 6 jam. Tentakel yang sudah dihilangkan lemaknya, kemudian dicuci dengan air dingin sebanyak tiga kali.

Ekstraksi Kolagen

Ekstraksi kolagen dari tentakel cumi-cumi menggunakan metode kolagen larut asam atau *Acid Soluble Collagen* (ASC) dengan asam asetat (CH₃COOH) sebagai pelarut protein berdasarkan metode Veeruraj et al. (2015). Tentakel cumi-cumi sebanyak 200 g (berat basah) direndam dalam asam asetat 0,5 M dengan perbandingan tentakel cumi-cumi dan asam asetat yaitu 1:10 (b/v), lalu ditambahkan ekstrak kulit buah pepaya dengan konsentrasi 5, 10, 15, dan 20%, kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu 4 °C. Pengadukan berkala dilakukan setiap 8 jam selama masa inkubasi. Rendemen tentakel cumi-cumi dan ekstrak kulit buah pepaya disaring menggunakan kain mori. Hasil penyaringan yang berupa larutan dikumpulkan dan disimpan di suhu 4 °C.

Purifikasi Kolagen

Purifikasi kolagen yang dilakukan berguna untuk mendapatkan *crude collagen* dengan menggunakan metode Veeruraj et al. (2015) dan Fawzya et al. (2016) dengan modifikasi. Filtrat hasil maserasi yang mengandung kolagen dilakukan pengendapan garam dengan menambahkan NaCl 2,3 M pH 7 selama 12 jam pada suhu 4 °C, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 g suhu 4 °C selama 30 menit. Pelet dilarutkan dalam CH₃COOH (0,5 M; 1:2 b/v). Kolagen didialisis dengan kantong dialisis ukuran 12 kDa menggunakan akuades selama 12 jam untuk menghilangkan sisa-sisa larutan yang digunakan selama proses preparasi dan ekstraksi kolagen. Akuades diganti setiap 4 jam selama proses dialisis.

Perhitungan Rendemen Kolagen (%)

Hasil purifikasi kolagen kemudian dihitung rendemennya menggunakan rumus % rendemen kolagen = $\left(\frac{\text{berat basah kolagen}}{\text{berat basah kulit cumi-cumi}}\right) \times 100\%$ (Fawzya et al., 2016).

Analisa Kadar Protein

Analisis total protein menggunakan metode Bradford dengan mencampurkan 0,1 mL kolagen dan 5 mL reagen Bradford kemudian dihomogenkan. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit kemudian ditera pada panjang gelombang 595 nm (Hadinoto & Syukroni, 2019).

Analisa Kadar Air

Uji kadar air pada kolagen hasil ekstraksi dilakukan menggunakan metode gravimetrik berdasarkan Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) (2019). Sampel ditimbang sebelum dan sesudah dikeringkan kemudian dihitung kadar airnya menggunakan rumus % kadar air = $\left(\frac{\text{berat sampel sebelum dikeringkan} - \text{berat sampel sesudah dikeringkan}}{\text{berat sampel sebelum dikeringkan}}\right) \times 100\%$.

Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan menggunakan metode Badan Standardisasi Nasional (BSN) (1992) dengan modifikasi. Nilai pH didapatkan dengan melarutkan sebanyak 1 g sampel dalam 20 mL akuades kemudian dihomogenkan dan diukur pH menggunakan pH meter.

Uji Jumlah Mikrobial (Koloni/g)

Uji total mikrobial menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) (2019). Medium yang digunakan yaitu medium Nutrient Agar (NA). Sampel ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan pada 10 mL larutan dapar fosfat (LDF) pH 7,2 kemudian dihomogenkan, larutan tersebut sebagai pengenceran 10^{-1} . Larutan dibuat hingga pengenceran 10^{-5} . Larutan pengenceran 10^{-2} sampai pengenceran 10^{-5} dipipet sebanyak 1 mL ke dalam medium NA secara *triplo*. Cawan petri yang sudah berisi medium dan sampel diinkubasi selama 48–72 jam pada suhu 30 °C. Jumlah koloni mikrobial yang dihitung adalah cawan petri dengan koloni bakteri antara 35–350 koloni. Jumlah koloni/mL ditentukan dengan ketentuan sebagai berikut: (1) jika salah satu cawan petri menunjukkan jumlah koloni kurang dari 35 atau lebih dari 350, maka dihitung rata-rata koloni dikali faktor pengencer, (2) jika cawan petri menunjukkan jumlah koloni diantara 35–350 dalam tingkat pengenceran yang berurutan maka jumlah koloni dinyatakan dengan rumus $N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2) \times d}$, dengan N sebagai jumlah koloni dalam sampel, $\sum C$ yaitu jumlah koloni pada cawan petri dari pengenceran yang memenuhi rentang 35–350, V yaitu volume inokulum yang dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri, n_1 yaitu jumlah cawan petri yang digunakan pada pengenceran pertama yang dihitung, n_2 yaitu jumlah cawan petri yang digunakan pada pengenceran kedua yang dihitung, dan d yaitu pengenceran yang berhubungan dengan perhitungan pertama yang dihitung, (3) jika tidak terdapat pertumbuhan koloni dalam cawan petri, maka jumlah koloni dinyatakan nol, (4) jika pertumbuhan koloni dalam cawan petri menunjukkan seperempat atau setengah dari cawan petri, maka jumlah koloni dinyatakan sebagai *spreader*.

Uji Coliform

Uji total *coliform* berdasarkan standard Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) (2019) menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN) dilakukan dengan sembilan tabung reaksi dengan seri pengenceran 3–3–3. Medium yang digunakan yaitu *Lactose Broth* (LB) diisi pada tabung reaksi yang dilengkapi dengan tabung Durham dalam posisi terbalik. Sampel kolagen 4 g dilarutkan dalam 40 mL akuades steril, pada tiga seri tabung pertama diisi dengan 10 mL sampel, tiga seri tabung kedua diisi dengan 1 mL sampel, dan tiga seri tabung ketiga diisi dengan 0,1 mL sampel dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Sampel dinyatakan positif terdapat bakteri

coliform apabila terbentuk gas dalam tabung Durham. Jika hasil positif, maka dilanjutkan dengan uji penegasan menggunakan medium *Briliant Green Lactose Bile Broth* (BGLBB).

Pembuatan Serum Kolagen

Pembuatan serum kolagen mengacu pada *Cosmetic Ingredient Review Expert Panel* (2017), dimana konsentrasi kolagen maksimal yang dapat digunakan sebesar 2% (20 mg/mL) dengan cara pemberian secara topikal. *Serum base* dan kolagen dicampurkan sesuai dengan perbandingan variasi konsentrasi, lalu dihomogenkan dengan *homogenizer*. Serum dibuat dari kolagen kasar yang diperoleh dari penambahan 20% ekstrak kulit buah pepaya. Pemilihan konsentrasi tersebut berdasarkan pada hasil pengukuran kadar protein dan kriteria kolagen menurut SNI dengan protein tertinggi dan kriteria terbaik yaitu pada konsentrasi 20% ekstrak kulit buah pepaya. Konsentrasi dan komposisi yang digunakan tersedia di Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi pembuatan serum kolagen

Komposisi	Konsentrasi		
	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL
Kolagen	50 mg	100 mg	200 mg
<i>Serum base</i>	10 g	10 g	10 g
Berat total	10 g		

Pengujian Pre-Klinis Serum Kolagen

Pengujian preklinis pada penelitian ini telah mendapat surat pernyataan kelayakan (*Ethical Clearance*) dengan nomor: 1191/C.16/FK/2020 dari Komite Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Duta Wacana. Pengujian preklinis menggunakan hewan coba mencit jantan (*Mus musculus*) yang berusia 2–3 bulan dengan berat badan 25–30 g. Penggunaan mencit jantan dimaksudkan untuk menghindari pengaruh faktor hormonal (estrogen dan progesteron) yang biasanya muncul pada mencit betina selama pemberian perlakuan. Hewan coba diaklimatisasi selama seminggu di Laboratorium Dasar Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana. Hewan coba diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Jumlah hewan coba yang digunakan (n), dihitung dengan menggunakan rumus Federer. Setiap kelompok perlakuan akan dilakukan dengan pengulangan empat ekor hewan coba, sehingga dengan enam kelompok perlakuan, jumlah keseluruhan hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor. Variabel terikat yang terdapat dalam penelitian adalah ukuran luka hewan coba, sedangkan variabel bebas adalah perlakuan konsentrasi dan waktu pengamatan hewan coba.

Prosedur Penanganan Hewan Coba

Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari dengan pemberian makan dan minum secara *ad libitum*, setelah aklimatisasi mencit dibius dengan menggunakan eter. Masing-masing hewan coba dicukur rambutnya pada bagian punggung dengan alat pencukur, kemudian disterilkan dengan alkohol 70%. Pada bagian punggung (dekat *vertebrae thoracalis*) dibuat luka berdiameter 0,4 cm menggunakan *punch biopsy*. Luka kelompok K(-) dioleskan *serum base*, luka kelompok K(+)₁ dioleskan obat luka bioplacenton, luka kelompok K(+)₂ dioleskan serum kolagen 2% (kolagen yang diekstraksi tanpa penambahan ekstrak kulit buah pepaya), luka kelompok P1 dioleskan dengan serum kolagen konsentrasi 5 mg/mL, luka kelompok P2 dioleskan dengan serum kolagen konsentrasi 10 mg/mL dan luka kelompok P3 dioleskan dengan serum kolagen konsentrasi 20 mg/mL. Pengolesan dilakukan pada semua luka setiap dua kali sehari di pagi hari pukul 08.00 WIB dan siang hari pukul 14.00 WIB. Perlakuan diberikan selama 10 hari, dengan pengamatan luka meliputi ukuran luka dan perubahan bentuk luka. Pada hari ke-10, hewan coba dieuthanasia menggunakan klorofom.

Pengamatan Kesembuhan Luka Kulit Mencit

Pengamatan kesembuhan luka kulit mencit dilakukan secara makroskopis, pengamatan makroskopis dilakukan dengan pengukuran diameter luka setiap dua hari sekali.

Analisa Data

Data hasil ekstraksi kolagen dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui pengaruh dari penambahan konsentrasi ekstrak kulit buah pepaya yang berbeda terhadap rendemen dan kualitas kolagen. Data hasil preklinis dianalisis statistik menggunakan *Two Way ANOVA-post hoc Tukey test* dengan tingkat kepercayaan 95% dan regresi linear berganda program SPSS 21.0. Uji *Two Way ANOVA* untuk mengetahui pengaruh pemberian konsentrasi serum kolagen yang berbeda terhadap kecepatan penyembuhan luka kulit mencit. Uji regresi linear berganda untuk mengetahui hubungan antara variabel dependent yaitu diameter luka dengan variabel independen yaitu hari pengamatan serta dosis perlakuan. *Post hoc Tukey test* merupakan uji lanjut *Two Way ANOVA* untuk mengetahui kelompok perlakuan yang paling baik dalam kesembuhan luka.

HASIL

Aktivitas Protease Ekstrak Kulit Buah Pepaya dan Kualitas Kolagen

Hasil ekstraksi kulit buah pepaya pada penelitian ini memiliki rendemen 91,99% dengan aktivitas protease yaitu 0,652 U/mL. Kolagen hasil ekstraksi dilakukan pengujian kualitas kolagen yang dapat dilihat pada Tabel 2. Rendemen kolagen kasar tertinggi pada penambahan 15% ekstrak kulit buah pepaya, kadar protein tertinggi, dan kadar air terendah pada penambahan 20% ekstrak kulit buah pepaya.

Tabel 2. Kualitas kolagen hasil ekstraksi

Jenis uji	Konsentrasi					Standar BSN (2014)
	0%	5%	10%	15%	20%	
Berat basah kolagen kasar (g)	33,6	34,9	37,3	38,4	31,9	-
Rendemen kolagen kasar (% bb)	16,8	17,4	18,5	19,2	15,9	-
Protein kolagen kasar (%)	23,9	43,5	48,5	52,5	62,7	Belum memenuhi standar
pH	4,8	4,9	5	5,1	5,1	Belum memenuhi standar
Air (%)	24	23,3	25,1	25,1	20,8	Belum memenuhi standar
Angka Lempeng Total (ALT)	0	0	0	0	0	Memenuhi standar
Total <i>coliform</i>	-	-	-	-	-	Memenuhi standar

Potensi Serum Kolagen Terhadap Kecepatan Waktu Penyembuhan Luka Kulit Mencit

Hasil pengujian pre-klinis dapat dilihat pada Tabel 3, pengurangan diameter luka kulit mencit hari ke-2 terdapat beda signifikan dengan tingkat kepercayaan 95% pada kelompok kolagen 5 mg/ml (P1) dan kolagen 10 mg/ml (P2) dengan kelompok kontrol kolagen hasil ASC (K+2), sedangkan pada kelompok kolagen 20 mg/ml (P3) menunjukkan perbedaan tidak signifikan dengan kontrol. Pada hari ke-4 terjadi perbedaan signifikan kelompok P1 dengan kelompok K+2 dan P2 memiliki beda signifikan dengan kedua kelompok kontrol positif. Kelompok P3 menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan kedua kontrol positif. Kelompok P1 dan P2 menunjukkan beda signifikan dengan kelompok kontrol positif dari hari ke-6 hingga hari ke-10, namun memiliki perbedaan tidak signifikan dengan kontrol negatif, pada kelompok P3 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan kontrol positif selama pengamatan dan memiliki perbedaan signifikan dengan kontrol negatif hari ke-0 dan hari ke-10. Penutupan luka terbaik ditemukan pada perlakuan P3 dengan penutupan luka sebesar 84,61%.

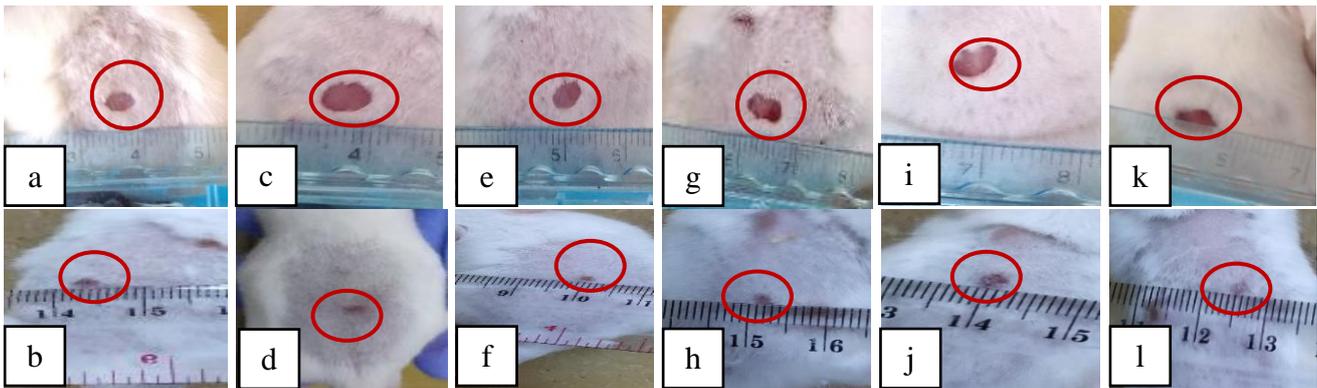
Tabel 3. Rata-rata ukuran luka mencit selama 10 hari pengamatan

Hari	Perlakuan					
	P1	P2	P3	K-	K+1	K+2
0	0,75 ± 0,100 ^{abc}	0,60 ± 0,082 ^a	0,65 ± 0,100 ^a	0,45 ± 0,058	0,63 ± 0,096	0,63 ± 0,050
2	0,49 ± 0,103 ^c	0,50 ± 0,082 ^c	0,40 ± 0,110	0,45 ± 0,058	0,41 ± 0,063	0,35 ± 0,080
4	0,39 ± 0,075 ^c	0,43 ± 0,096 ^{bc}	0,30 ± 0,070	0,35 ± 0,058	0,29 ± 0,025	0,28 ± 0,060
6	0,34 ± 0,075 ^{bc}	0,36 ± 0,075 ^{bc}	0,29 ± 0,060	0,35 ± 0,058	0,25 ± 0,058	0,23 ± 0,040
8	0,33 ± 0,050 ^{bc}	0,30 ± 0,115 ^{bc}	0,21 ± 0,020	0,30 ± 0,058	0,18 ± 0,065	0,18 ± 0,050
10	0,24 ± 0,075 ^{bc}	0,19 ± 0,085 ^{bc}	0,10 ± 0,000 ^a	0,20 ± 0,058	0,06 ± 0,048	0,09 ± 0,030

Hari	Perlakuan					
	P1	P2	P3	K-	K+1	K+2
%	68	68,3	84,61	55,55	90,47	85,71

Keterangan: K- (serum base), K+ (Bioplacenton), K+2 (Kolagen hasil ASC 0% ekstrak kulit buah pepaya), P1 (kolagen 5 mg/mL), P2 (kolagen 10 mg/mL), dan P3 (kolagen 20 mg/mL).^aBeda signifikan antara perlakuan dengan kontrol negatif (K-), ^bbeda signifikan antara perlakuan dengan kontrol bioplacenton (K+1), ^cbeda signifikan antara perlakuan dengan kontrol kolagen hasil ASC (K+2)

Perubahan diameter luka kulit mencit hari ke-0 dan hari ke-10 dapat dilihat pada Gambar 1. Gambar hari ke-0 merupakan luka kulit mencit sebelum diberikan terapi serum kolagen dan gambar hari ke-10 menunjukkan kesembuhan luka kulit mencit setelah diberikan terapi serum kolagen ditandai dengan luka sudah tertutup oleh jaringan yang baru. Gambar (i) memiliki penutupan luka terbaik dibandingkan dengan kelompok kolagen 5 mg/ml dan kolagen 10 mg/ml.



Gambar 1. Penyembuhan luka kulit mencit. Keterangan: kelompok perlakuan kontrol negatif (K-) hari ke-0(a) hari ke-10 (b), kelompok perlakuan kontrol positif 1 (K+1) hari ke-0 (c), hari ke-10 (d), kelompok perlakuan kontrol positif 2 (K+2) hari ke-0 (e) hari ke-10 (f), kelompok perlakuan kolagen 5 mg/mL (P1) hari ke-0 (g) hari ke-10 (h), kelompok perlakuan kolagen 10 mg/mL (P2) hari ke-0 (i) hari ke-10 (j), dan kelompok perlakuan kolagen 20 mg/mL (P3) hari ke-0 (k) hari ke-10 (l)

PEMBAHASAN

Aktivitas Protease Ekstrak Kulit Buah Pepaya

Uji aktivitas enzim protease kasar ekstrak kulit buah pepaya dilakukan dengan menghitung jumlah asam amino tirosin yang dihasilkan dengan penambahan substrat ekstrak kulit buah pepaya sebagai sumber tirosin saat menghidrolisis substrat kasein. Aktivitas protease kulit buah pepaya diperoleh sebesar 0,652 U/mL. Jika dibandingkan dengan bagian pepaya yang lain, aktivitas protease kulit buah pepaya yang diperoleh lebih rendah dengan aktivitas protease getah pepaya, Ratnayani (2014) mengatakan aktivitas protease getah pepaya sebesar 0,919 U/mL. Dari hasil penelitian (Tabel 2), kolagen yang diperoleh sesuai dengan kriteria baku mutu Badan Standardisasi Nasional (BSN) (2014) pada uji ALT dan uji total *coliform* dengan total koloni mikroba <30 dan total *coliform* yaitu negatif sedangkan pada uji kadar protein (minimal 75%), kadar air (maksimal 12%) dan pH (kisaran 6,5-8) belum sesuai dengan kriteria baku mutu (Badan Standardisasi Nasional (BSN), 2014). Dengan diketahuinya aktivitas protease kulit buah pepaya diharapkan penambahan ekstrak kulit buah pepaya dalam mengekstraksi kolagen dapat memberikan rendemen kolagen yang lebih baik.

Rendemen Kolagen

Rendemen kolagen merupakan jumlah kolagen (presentase) yang dihasilkan dari berat awal bahan baku. Rendemen kolagen dapat digunakan untuk mengetahui efektivitas proses ekstraksi yang digunakan. Variabel yang digunakan untuk menghitung rendemen yaitu berat basah substrat dan berat basah kolagen. Penambahan ekstrak kulit buah pepaya dapat meningkatkan

rendemen kolagen, namun pada konsentrasi yang tinggi penambahan ekstrak dapat menurunkan rendemen yang dihasilkan (Tabel 2). Rendemen kolagen yang dihasilkan tanpa penambahan ekstrak kulit buah pepaya lebih rendah dibandingkan dengan rendemen kolagen yang dihasilkan dengan penambahan ekstrak kulit buah pepaya. Rendemen kolagen tertinggi yaitu pada perlakuan ASC dengan penambahan 15% ekstrak kulit buah pepaya dengan nilai 19,2%, diikuti dengan penambahan ekstrak 10% dan 5%, sedangkan pada perlakuan 20% ekstrak rendemen yang dihasilkan mengalami penurunan. Hasil serupa dengan penelitian Minggu (2018) yang menunjukkan bahwa penambahan 20% ekstrak daun pepaya dapat menurunkan rendemen kolagen.

Penurunan rendemen kolagen pada penambahan ekstrak yang tinggi terjadi, karena adanya kandungan enzim papain. Jamilah et al. (2013) mengatakan bahwa enzim papain merupakan golongan enzim yang kuat namun bersifat non spesifik, sehingga pada penambahan ekstrak yang terlalu banyak memungkinkan enzim protease pada ekstrak memutus bagian tropokolagen. Pemutusan bagian tropokolagen menyebabkan rusaknya struktur molekul kolagen sehingga jumlah kolagen terlarut menjadi berkurang.

Kolagen pada penelitian ini menghasilkan rendemen yaitu 19,2% yang lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian serupa lainnya, Cozza et al. (2016) mengekstraksi kolagen dari mantel cumi-cumi (*Loligo vulgaris*) dengan rendemen 5,1% (bk), Veeruraj et al. (2015) mengekstraksi kolagen dari kulit cumi-cumi (*Doryteuthis singhalensis*) menghasilkan rendemen 5,80% (bk), Putra et al. (2013) mengekstraksi kolagen dari substrat lain yaitu kulit ikan nila hitam (*Oreochromis niloticus*) menghasilkan rendemen 5,96% (bk) dan Alhana et al. (2015) mengekstraksi kolagen dari daging teripang gamma (*Stichopus variegatus*) dengan rendemen yang dihasilkan 1,50% (bb).

Kadar Protein

Kadar protein diukur menggunakan metode kolorimetri spektrofotometri UV-VIS dengan reagen Bradford. Metode Bradford dipilih untuk menentukan kadar protein karena metode Bradford lebih sensitif terhadap protein. Selain itu, kandungan *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB G250) dapat mendeteksi secara spesifik asam amino yang merupakan sebagian besar penyusun kolagen seperti lisin, histidin, arginin, triptofan, fenilalanin, dan tirosin (Kittiphattanabawon et al., 2015; Hadinoto & Syukroni, 2019).

Penambahan ekstrak kulit buah pepaya dapat meningkatkan kadar protein. Namun, jika dibandingkan dengan baku mutu Badan Standardisasi Nasional (BSN) (2014), kadar protein pada penelitian ini berada di bawah standar yaitu minimal 75%. Budiarti et al. (2019) mengatakan bahwa kadar protein dapat menentukan jumlah kolagen yang terdapat dalam substrat, namun kadar protein pada penelitian ini tidak linier dengan rendemen kolagen yaitu rendemen kolagen rendah sedangkan kadar protein tinggi, hal tersebut terjadi karena enzim papain yang terdapat pada ekstrak bersifat non spesifik dalam memecah protein, yang artinya protein yang dihasilkan tidak hanya protein kolagen melainkan terdapat jenis protein yang lain sehingga memungkinkan protein yang terukur semakin tinggi seiring dengan pertambahan konsentrasi ekstrak kulit buah pepaya.

Nilai pH

Nilai pH pada kolagen sangat menentukan tingkat kelarutan kolagen di dalam air. Matmaroh et al. (2011) mengatakan bahwa kolagen akan semakin mudah larut pada kisaran pH 2–4. Penelitian yang dilakukan oleh Komala (2015) menunjukkan bahwa pada pH 3 kolagen dapat larut hingga 90,80%. Nilai pH pada penelitian ini cenderung meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak kulit buah pepaya. Peningkatan tersebut disebabkan karena nilai pH ekstrak bersifat netral yaitu 7,4, namun nilai pH kolagen diketahui belum memenuhi ketentuan dari baku mutu Badan Standardisasi Nasional (BSN) (2014) yaitu kisaran 6,5–8. Nilai pH kolagen yang masih cenderung asam dipengaruhi oleh penggunaan pelarut yang bersifat asam. Selain itu, setelah proses ekstraksi tidak dilakukan proses netralisasi sehingga memungkinkan residu asam masih tersisa (Devi et al., 2017). Faktor lain yaitu selama proses dialisis tidak dilakukan pengadukan sehingga laju difusi molekul pelarut menjadi lebih lambat dan bahkan masih terjebak di dalam kantong dialisis (Gadi et al., 2019).

Kadar Air

Kadar air memiliki pengaruh terhadap daya simpan kolagen dan tekstur kolagen. Kadar air yang terlalu tinggi menyebabkan masa penyimpanan kolagen semakin pendek karena adanya aktivitas enzimatis maupun kimia di dalam kolagen sehingga menyebabkan penurunan mutu kolagen. Kadar air pada penelitian ini belum memenuhi ketentuan baku mutu dengan maksimal kadar air yaitu 12% (Badan Standardisasi Nasional (BSN), 2014). Kadar air yang tinggi pada penelitian ini dipengaruhi oleh penggunaan asam dalam konsentrasi yang tinggi. Konsentrasi asam asetat yang tinggi menyebabkan hidrolisis kolagen lebih mudah yang artinya penyerapan air juga tinggi. Tingginya kadar air juga disebabkan karena tidak dilakukannya proses liofilisasi. Penelitian yang dilakukan oleh Devi et al. (2017) menunjukkan bahwa proses liofilisasi kolagen dapat mengurangi kadar air hingga 90%.

Jumlah Mikrobia dan Total Coliform

Pengujian mikrobiologi bertujuan untuk menentukan tingkat keamanan kolagen ketika diaplikasikan. Jenis uji mikrobiologi yang dilakukan yaitu uji total mikrobiologi dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dan uji total coliform dengan menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN) dengan 9 tabung reaksi (seri 3–3–3). Hasil pengujian menunjukkan bahwa dalam kolagen tidak ditemukan adanya cemaran mikrobiologi. Roni et al. (2019) menyatakan bahwa kulit buah pepaya mengandung senyawa alkaloid yang diketahui mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasil pengujian mikrobiologi pada penelitian ini memenuhi standar baku mutu Badan Standardisasi Nasional (BSN) (2014) yaitu total koloni mikroba <30 dan total coliform negatif.

Potensi Serum Kolagen Terhadap Kecepatan Waktu Penyembuhan Luka Kulit Mencit

Kolagen terbaik dari hasil penambahan ekstrak kulit buah pepaya yang digunakan pada pengujian preklinis yaitu konsentrasi 20% ekstrak kulit buah pepaya. Pemilihan konsentrasi tersebut berdasarkan pada hasil pengukuran kadar protein dan kriteria kolagen menurut Badan Standardisasi Nasional (BSN) (2014). Kolagen tersebut diformulasikan dengan *base serum* dan mengacu pada *Cosmetic Ingredient Review Expert Panel* (2017) dibagi menjadi tiga konsentrasi yaitu 5, 10, dan 20 mg/mL. Pemberian perlakuan selama 10 hari dilakukan dengan mempertimbangkan fase penyembuhan luka yaitu fase proliferasi yang berakhir pada hari ke-21 setelah terjadinya luka. Serum kolagen dinyatakan efektif dapat menyembuhkan luka jika serum kolagen mampu memperpendek fase proliferasi yang ditandai dengan menyatunya kembali permukaan luka dan terbentuknya jaringan kulit yang baru.

Berdasarkan analisa statistik pada data pengurangan diameter luka mencit selama 10 hari dapat disimpulkan bahwa pemberian kolagen tentakel cumi-cumi mampu mempercepat fase proliferasi dilihat dengan tertutupnya permukaan luka oleh jaringan yang baru (Gambar 1, hari ke-10). Fase proliferasi berakhir pada hari ke-21 setelah terjadinya luka (Ramadhian & Widiastini, 2018). Hasil ini juga didukung oleh hasil penelitian Imamah (2015) yaitu dengan pemberian kolagen ikan pada luka insisi tikus putih (*Rattus norvegicus*) mampu meningkatkan ketebalan kolagen pada luka mulai hari ke-3 hingga hari ke-10. Penelitian dari Minggu (2018) menunjukkan bahwa luka insisi tikus putih (*R. norvegicus*) yang diberi kolagen dari limbah sisik ikan dengan penambahan ekstrak daun pepaya mengalami penutupan hingga 68,3%.

Proses penyembuhan luka secara umum terdiri dari fase inflamasi, proliferasi, dan *remodelling*. Rangkaian proses tersebut dapat berlangsung selama bertahun-tahun dan bersifat linearitas. Namun, adanya faktor ekstrinsik dan instrinsik dapat memengaruhi proses penyembuhan luka menjadi lebih cepat ataupun lebih lambat (Imamah, 2015). Kolagen memiliki peran yang sangat penting dalam penyembuhan luka, ketika fase inflamasi dan kolagen sudah terbentuk secara alami, tetapi dalam jumlah yang sedikit. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian kolagen dari tentakel cumi-cumi pada awal terjadinya luka berkontribusi dalam fase inflamasi. Kittiphattanabawon et al. (2015) mengatakan glisin merupakan asam amino terbanyak yang terdapat dalam kolagen cumi-cumi. Glisin memiliki peran dalam fase inflamasi yaitu mengaktifkan trombosit untuk menghentikan pendarahan, membersihkan debris, mengaktifkan enzim hidrolitik dan sitokin,

sehingga jaringan granulasi mulai dibentuk oleh fibroblast (Hochstein & Bhatia, 2014). Imamah (2015) menunjukkan pemberian kolagen ikan pada luka insisi tikus putih mampu meningkatkan kadar *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF- β 1) pada pemberian kolagen dihari ke-3. Terbentuknya TGF- β 1 pada fase inflamasi akan membantu pembentukan kolagen di fase proliferasi dan kolagen tersebut berperan dalam angiogenesis, sintesis kolagen, dan membentuk *extracellular matrix* (ECM).

Ekstrak pepaya juga berperan dalam proses penyembuhan luka. Hal tersebut dapat dilihat dari kelompok dengan penambahan ekstrak kulit buah pepaya memiliki penyembuhan luka lebih cepat daripada kelompok yang hanya menggunakan *base serum*. Kecepatan penyembuhan luka pada kelompok ini juga berbeda tidak signifikan dengan kelompok yang menggunakan kolagen yang dihasilkan tanpa penambahan ekstrak kulit buah pepaya, walaupun lebih rendah dari pada kelompok yang menggunakan obat komersial. Parampasi dan Soemarno (2013) mengatakan pepaya memiliki kandungan saponin yang memicu pembentukan kolagen saat penyembuhan luka, *chymopapain* dan enzim papain yang menambah produksi interleukin sehingga kerja makrofag lebih cepat, dan vitamin C yang mengubah prolin menjadi hidrokprolin.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penambahan 15% ekstrak kulit buah pepaya menghasilkan rendemen kolagen kasar tertinggi sebesar 19,2%. Kolagen kasar dari tentakel cumi-cumi yang dihasilkan memenuhi kriteria BSN pada jumlah mikrobia dan total *coliform* dan belum memenuhi kriteria BSN pada kadar protein, pH, dan kadar air. Pengujian preklinis pada hewan coba mencit jantan (*Mus musculus*) menunjukkan bahwa serum kolagen dengan penambahan ekstrak kulit buah pepaya pada kelompok perlakuan kolagen 20 mg/mL memiliki presentase penutupan luka kulit mencit sebesar 84,61%. Pengujian secara statistik menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan dengan kelompok perlakuan kontrol positif namun hasil penyembuhan luka dengan kolagen tanpa penambahan ekstrak kulit buah pepaya lebih tinggi daripada hasil penyembuhan luka dengan kolagen hasil penambahan ekstrak kulit buah pepaya. Oleh sebab itu, penambahan ekstrak kulit buah pepaya pada penelitian ini berpengaruh terhadap rendemen dan kualitas kolagen kasar yang dihasilkan. Namun, pada pengujian preklinis masih perlu dilakukan penelitian lanjutan guna menemukan konsentrasi yang sesuai.

Adapun saran untuk peneliti selanjutnya yaitu perlu dilakukan pemurnian enzim protease pada ekstrak kulit buah pepaya untuk mengetahui efektivitas enzim protease dalam mengekstraksi kolagen secara lebih akurat. Pengoptimalan selama proses ekstraksi seperti dilakukan perbandingan penggunaan jenis dan konsentrasi larutan selama proses *pretreatment*, dilakukan efisiensi penggunaan ekstrak seperti waktu perendaman substrat dan konsentrasi yang digunakan dan perlu dilakukan proses liofilisasi kolagen untuk mendapat kualitas kolagen yang lebih baik. Optimalisasi proses pengujian kualitas kolagen, seperti uji lemak, analisis protein perlu dilakukan dengan metode non-kolorimetri, uji kandungan asam amino kolagen, dan dilakukan karakterisasi kolagen untuk menentukan tipe kolagen. Untuk mengetahui pengaruh pemberian serum kolagen pada penambahan ekstrak kulit buah pepaya terhadap jumlah fibroblas dan jumlah kolagen pada kulit mencit, dapat dilengkapi dengan pengamatan histopatologi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing: Aniek Prasetyaningsih, Dra. M, Si dan Vinsa Cantya Prakasita., drh., SKH., M.Sc, yang telah membimbing penulis dari awal penelitian hingga terwujudnya tulisan ini.

REFERENSI

- Alhana., Suptijah, P., & Tarman, K. (2015). Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari daging teripang gamma. *Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(2), 150-161. doi: 10.17844/jphpi.2015.18.2.150.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). (2019). Peraturan badan pengawas obat dan makanan nomor 32 tahun 2019 tentang persyaratan keamanan dan mutu obat tradisional.

- (2020, January 20). Retrieved from [https://asrot.pom.go.id/asrot/index.php/download/dataannounce2/204/PerBPOM 32 Tahun 2019 Persyaratan dan Keamanan Mutu OT.pdf](https://asrot.pom.go.id/asrot/index.php/download/dataannounce2/204/PerBPOM_32_Tahun_2019_Persyaratan_dan_Keamanan_Mutu_OT.pdf).
- Badan Pusat Statistik. (2020a). Buletin statistik perdagangan luar negeri. (2020, July 8) Retrieved from <https://www.bps.go.id/publication/download.html>.
- Badan Pusat Statistik (BPS). (2020b). Buletin statistik perdagangan luar negeri. (2020, July 8). Retrieved from <https://www.bps.go.id/publication/download.html>.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN). (1992). *SNI 01-2891-1992 cara uji makanan dan minuman*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN). (2014). *Kolagen kasar dari sisik ikan - Syarat mutu dan pengolahan*. Badan Standardisasi Nasional. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Budiarti, E., Budiarti, P., Aristri, M. A., & Batubara, I. (2019). Kolagen dari limbah tulang ayam (*Gallus gallus domesticus*) terhadap aktivitas anti aging secara in vitro. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 15(1), 44. doi: 10.20961/alchemy.15.1.23046.44-56.
- Cosmetic Ingredient Review Expert* (2017). Safety assessment of ectodermal-derived proteins and peptides as used in cosmetics status. Retrieved from <https://www.cir-safety.org/sites/default/files/tsupep062017tent.pdf>.
- Cozza, N., Bonani, W., Motta, A., & Migliaresi, C. (2016). Evaluation of alternative sources of collagen fractions from *Loligo vulgaris* squid mantle. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 504-513. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.03.013.
- Devi, H. L. N. A., Suptijah, P., & Nurilmala, M. (2017). Efektivitas alkali dan asam terhadap mutu kolagen dari kulit ikan patin. *Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 20(2), 255-265. doi: 10.17844/jphpi.v20i2.17906.
- Fawzya, Y. N., Chasanah, E., Poernomo, A., & Khirzin, M. H. (2016). Isolasi dan karakterisasi parsial kolagen dari teripang gamma (*Stichopus variegatus*). *Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 11(1), 91-100. doi: 10.15578/jpbkp.v11i1.284.
- Gadi, D. S., Trilaksani, W., & Nurhayati, T. (2019). Histologi, ekstraksi dan karakterisasi kolagen gelembng renang ikan cunang *Muarenesox talabon*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689-1699. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Hadinoto, S., & Syukroni, I. (2019). Pengukuran protein terlarut air cucian gelembung renang dan kulit ikan tuna menggunakan metode Bradford. *Majalah Biam*, 15(1), 15-20. doi: 10.29360/mb.v15i1.5247.
- Hochstein, A. O., & Bhatia, A. A. (2014). Collagen: Its role in wound healing. *Podiatry Management*, (August).
- Imamah, I. N. (2015). Pengaruh pemberian kolagen ikan terhadap proses penyembuhan luka insisi (studi eksperimen pada tikus putih *Rattus norvegicus*). *Husada Mahakam*, 4(1), 1-10.
- Jamilah, B., Umi, H. M. R., Mat, H. D., & Sazili, A. Q. (2013). Properties of collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) skin. *International Food Research Journal*, 20(2), 791-798.
- Joy, D. P., Kumar, K. K., Kumar, B. D., & Silvipriya, S. K. (2017). Collagen from squid and its biological activity. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(3), 24-26. doi: 10.22159/ijcpr.2017v9i3.19591.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. (2010). Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *LWT - Food Science and Technology*, 43(5), 792-800. doi: 10.1016/j.lwt.2010.01.006.
- Kittiphattanabawon, P., Nalinanon, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2015). Characteristics of pepsin-solubilised collagen from the skin of splendid squid (*Loligo formosana*). *Journal of Chemistry*, 2015. doi: 10.1155/2015/482354.
- Komala, A. H. (2015). Ekstraksi dan karakteristik kolagen dari kulit ikan tongkol (*Euthynnus Affinis*) (Skripsi sarjana). Institut Pertanian Bogor, Indonesia.
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A. B., & Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted

- golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129(3), 1179-1186. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.099.
- Minggu, E. (2018). *Ekstraksi kolagen limbah sisik ikan dengan penambahan ekstrak daun pepaya (Carica papaya L.) untuk penyembuhan luka insisi kulit tikus* (Skripsi sarjana). Universitas Kristen Duta Wacana, DIY Yogyakarta, Indonesia.
- Parampasi, N., & Soemarno, T. (2013). Pengaruh pemberian ekstrak daun pepaya dalam etanol 70 % pada proses penyembuhan luka insisi. *Majalah Patologi*, 22(1), 31-36.
- Putra, A. B. N., Sahubawa, L., & Ekantari, N. (2013). Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan nila hitam (*Oreochromis niloticus*). *Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 8(2), 171-180. doi: 10.15578/jpbkp.v8i2.61.
- Ramadhian, M. R., & Widiastini, A. A. (2018). Kegunaan ekstrak daun pepaya (*Carica papaya*) pada luka. *Agromedicine*, 5(1), 513-517.
- Ratnayani, K. (2014). *Skrining aktivitas protease pada getah tanaman (labu siam, lidah buaya, dan talas)* (Laporan akhir penelitian dosen muda, Universitas Udayana, Bali, Indonesia). Retrieved from https://simdos.unud.ac.id/uploads/file_riwayat_penelitian_1_dir/110e72962df8948bad9be17f54c7a45f.pdf.
- Roni, A., Maesaroh, M., & Marliani, L. (2019). Aktivitas antibakteri biji, kulit dan daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 6(1), 29. doi: 10.26874/kjif.v6i1.134.
- Setyowati, H., & Setyani, W. (2015). Potensi nanokolagen limbah sisik ikan sebagai cosmeceutical. *Farmasi Sains dan Komunitas*, 12(1), 30-40.
- Sripriya, R., & Kumar, R. (2015). A novel enzymatic method for preparation and characterization of collagen film from swim bladder of fish rohu (*Labeo rohita*). *Food and Nutrition Sciences*, 06(15), 1468-1478. doi: 10.4236/fns.2015.615151.
- Torres-Arreola, W., Pacheco-Aguilar, R., Sotelo-Mundo, R. R., Rouzaud-Sández, O., & Ezquerra-Brauer, J. M. (2008). Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *CYTA-Journal of Food*, 6(2), 101-108. doi: 10.1080/11358120809487634.
- Veeruraj, A., Arumugam, M., Ajithkumar, T., & Balasubramanian, T. (2015). Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). *Food Hydrocolloids*, 43, 708e716-716. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.07.025.
- Zusfahair., Ningsih, D. R., & Habibah, F. N. (2014). Karakterisasi papain dari daun pepaya (*Carica papaya* L.). *Molekul*, 9(1), 44-55. doi: 10.20884/1.jm.2014.9.1.149.