

KOMPOSIT KOLAGEN FIBRIL-ALGINAT SEBAGAI KANDIDAT MEMBRAN HIDROGEL SKIN SUBSTITUTE

Faiq Nadiatul Mardia Asa^{1*)}, Sri Sumarsih², Andi Hamim Zaidan³, Mochammad Zaki Fahmi⁴, Dyah Hikmawati⁵, Suryani Dyah Astuti⁶

¹Prodi S2 Teknobiomedik, Sekolah Pascasarjana, Universitas Airlangga, Surabaya,
email: faiq.nadia@gmail.com

²Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya,
email: sri-s@fst.unair.ac.id

³Fisika, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya,
email: andi-h-z-i@fst.unair.ac.id

Abstrak

Telah dilakukan sintesis membran hidrogel komposit berbahan kolagen, alginat sebagai kandidat skin substitute. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sifat fisikokimia dari membran hidrogel komposit kolagen-alginat. Metode yang dilakukan yaitu dengan teknik kering udarakan yang dicetak pada mika tipis selama tujuh hari pada suhu ruang. Hasil sintesis dikarakterisasi dengan PSA untuk mengetahui distribusi ukuran nanopartikel perak, FTIR, penentuan morfologi dengan SEM, uji absorpsi dengan larutan PBS (Phosphate Buffer Saline) uji kuat tarik, uji elongasi, uji sitotoksitas dan uji antibakteri. Hasil analisis FT-IR pada membran memperlihatkan serapan kolagen dan alginat yang ditunjukkan dengan munculnya pergeseran pita serapan pada membran komposit yaitu adanya Amida I dari kolagen, gugus karbonil (C=O) dari alginat. Hasil pengujian SEM membran komposit tanpa nanopartikel perak menunjukkan penebalan dinding dan pori yang lebar, sedangkan membran dengan penambahan nanopartikel perak ukuran pori lebih kecil. Berdasarkan hasil pengujian absorpsi menunjukkan semakin banyak komposisi kolagen pada membran maka semakin menurun lama membran hidrogel komposit menyerap larutan. Hasil pengujian kuat tarik menunjukkan bahwa semakin banyak komposisi kolagen pada membran hidrogel komposit maka semakin tinggi nilai kuat tariknya. Hasil uji elongasi menunjukkan semakin banyak komposisi kolagen maka semakin menurun nilai elongasinya.

Kata kunci : membran hidrogel, kolagen, alginat

Abstract

Composite hydrogel membrane had been synthesized made from collagen and alginate as a skin substitute candidate. The purpose of this research is to know the characteristics of physicochemical composite membrane hydrogel collagen-alginate. The method employed in this study by the air dry method on a glass for seven days at room temperature. The results of the membrane was characterized with FTIR, determine morphology by SEM, the ability of absorption membranes, membrane strength, and membrane elongation. Result of FT-IR data analysis in the membranes showed the existence of alginate and collagen absorbance, which was indicated by the

emergence of typical absorbance band such as of \ amide I of collagen and carbonyl Group (C = O) of alginate. The test results of composite membrane hidrogel collagen-alginate by SEM showed thickening of the wall and the wide pore. Membrane absorption was decreased with many compositions of collagen The results show that the effect of the addition of the collagen composition makes the mechanical properties of hydrogel membrane lower than the membrane with lower collagen compositions displayed on the tensile strength of the membrane. Elongation test results showed that the addition of the collagen composition gives the effect of a decrease in the value of elongation.

Key words: *composite hidrogel membrane, collagen, alginate*

1. PENDAHULUAN

Meningkatnya kebutuhan skin substitute untuk permasalahan luka bakar dan luka dalam banyak dikembangkan yang digunakan untuk menggantikan secara permanen kerusakan kulit atau memberi penutupan luka sementara. Penggunaan bahan yang sesuai dengan karakterisasi kulit merupakan hal pokok yang harus dipenuhi skin substitute karena potensinya sebagai pendukung, pembentuk, dan pelindung epidermal. Fungsi utama skin substitute untuk membatasi kehilangan cairan pada transdermal, infeksi, serta mengurangi kemungkinan terjadinya jaringan hipertropik dengan mempercepat penutupan luka dan pemulihan akhir pasien (Kempf et al., 2011). Skin substitute yang tersedia saat ini lebih banyak mengandung unsur porcine atau babi seperti pada kolagen maupun mukosa intestinal dari babi (Reema et al., 2014).

2. Tinjauan Pustaka

2.1 Kolagen Fibril

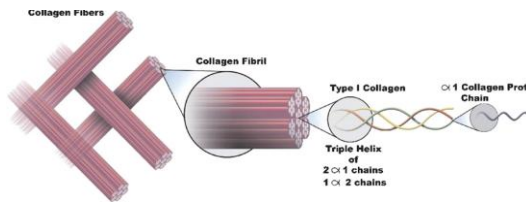
Kolagen merupakan golongan protein komponen utama dari jaringan ikat vertebrata, yang membentuk sekitar 25% sampai 35% dari kandungan protein tubuh. kolagen adalah protein yang mana bertanggung jawab untuk menjaga integritas struktural dan fungsi mekanik jaringan dalam organisme selular paling multi. Kolagen telah diidentifikasi dalam jaringan mamalia lebih dari 27 bentuk. Variasi dalam komposisi kolagen memenuhi persyaratan mekanik yang luas untuk berbagai fungsi dan pemuatan kondisi. Diantara berbagai macam tipe kolagen, tipe I kolagen adalah yang paling banyak dalam tubuh manusia. Kolagen tipe I memiliki struktur fibril yang menyediakan dasar struktural untuk menahan kekuatan tarik, geser atau kompresi dan terutama dapat ditemukan dalam jaringan struktural seperti kulit, tendon, ligamen, pembuluh darah tulang

rawan dan di yuybagian organik dari tulang dan gigi (Babtiste et al., 2014).

Kolagen fibril merupakan komponen utama dari matriks ekstraselular (ECM) dan penghubung jaringan seperti tulang dan tendon, serta pada jaringan kornea. Serupa dengan alginat, kolagen hidrogel telah digunakan untuk berbagai aplikasi termasuk penelitian tentang kesesuaiannya dengan stroma sel sumsum tulang, sebagai scaffold untuk rekayasa teknik jaringan tulang rawan, dalam bentuk penyokong pembuluh darah, dan untuk aplikasi dalam penyembuhan luka serta sebagai situs pro-angiogenik untuk transplantasi islet. Kolagen fibril pada kolagen tipe I memiliki pola periodik karakteristik 60-70 nm. Gambaran nano-topografi yang sangat periodik diyakini penting untuk adhesi dan pertumbuhan sel (Mahmoud et al., 2015).

Kolagen terdapat pada hampir 25% dari total massa protein pada mamalia yang ada di tulang, jaringan ikat, tendon, pembuluh darah, dan kulit. Pada kulit, kolagen berhubungan dengan protein lain, seperti elastin, membentuk matriks dasar fleksibel dan lentur yang menggabungkan sel-sel kulit hidup, pembuluh darah, kelenjar sebaceous, serta komponen lain dari matriks ekstraselular.

Setiap molekul kolagen pada ekstraseluler matriks kulit terbentuk dari 3 tiga rantai protein heliks yang selanjutnya dirangkai menjadi superheliks. Molekul prokolagen tripleheliks dalam sel fibroblast dan kemudian disekresikan ke dalam ruang ekstraseluler seperti pada Gambar 1 Pada ruang ekstraseluler, rantai heliks menjalani proses proteolitik, yang memungkinkan secara spontan merangkai rantai menjadi lebih besar, serta fibril yang lebih kompleks yang distabilkan oleh ikatan kovalen. Pertautan berkas kolagen pada gambar 2.2 memberikan kekuatan tarik pada kulit yang mendukung struktur khusus dalam kulit (Cynthia et al., 2010).



Gambar 1. Pembentukan berkas fiber pada kolagen (Cynthia et al., 2010).

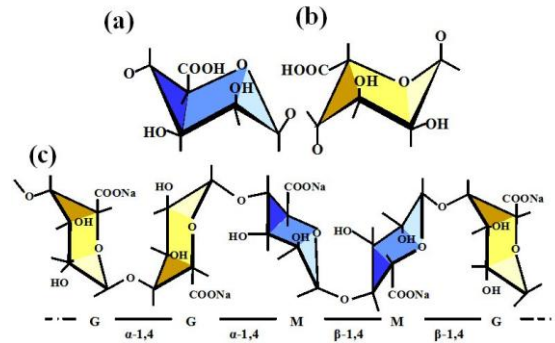
Kolagen adalah protein struktural utama yang terdapat pada ekstraseluler matrik. Berbagai penggunaan kolagen dalam biomaterial untuk rekonstruksi dan regenerasi jaringan telah menunjukkan bahwa kolagen memainkan peran aktif dalam mediasi adhesi dan migrasi sel karena potensinya untuk berinteraksi dengan sel. Mengatasi kelemahan kolagen yang mudah terdegradasi dan sifat mekanis yang lemah, maka dibutuhkan ikatan silang kimia melalui hibridisasi dengan polimer sintesis maupun polisakarida alam (Lin Sang *et al.*, 2011).

2.2 Alginat

Alginat adalah suatu polisakarida bahan alam yang diperoleh dari alga coklat. Alginat yang terdapat di alga coklat kebanyakan dalam bentuk asam karboksilat yang disebut asam alginat serta kebanyakan garam anorganik tidak larut dalam air, sehingga yang sering digunakan untuk keperluan industri adalah garam natrium maupun kalium alginat.

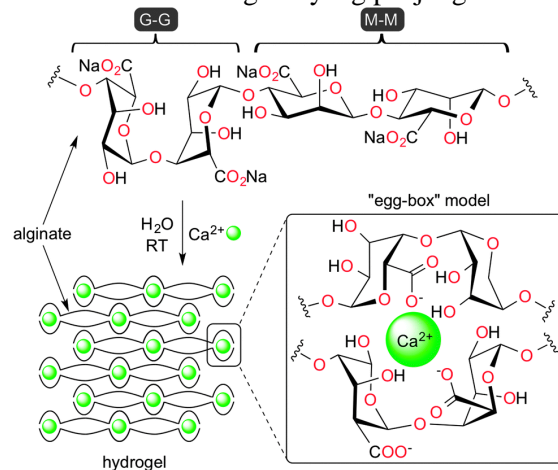
Alginat merupakan kopolimer linear yang mengandung lebih 700 residu asam-asam uronat yaitu β -D asam mannuronat (M) dan α -L asam guluronat (G) dengan ikatan 1,4. Rantai alginat yang hanya mengandung residu asam guluronat disebut kompleks G, rantai alginat yang hanya mengandung residu asam mannuronat disebut kompleks M dan rantai alginat yang hanya mengandung residu asam guluronat serta asam mannuronat disebut

kompleks G-M (Khasima *et al.*, 2011). Struktur kimia alginat dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. (a) Asam β -D-mannuronat. (b) Asam α -L-guluronat (c) Struktur molekul natrium alginat (Khasima *et al.*, 2011)

Natrium alginat dapat membentuk gel dengan adanya kation-kation divalent seperti Ca^{2+} . Ion kalsium menggantikan natrium dalam alginat, mengikat molekul-molekul alginat yang panjang sehingga membentuk gel. Alginat dengan kandungan G (asam guluronat) yang tinggi akan membentuk gel lebih kuat dibandingkan dengan alginat dengan kandungan M (asam mannuronat) yang tinggi. Proses pembentukan gel oleh alginat seperti pada Gambar 3 menunjukkan kalsium menggantikan natrium sehingga terjadi ikatan molekul-molekul alginat yang panjang.



Gambar 3. Pembentukan gel blok homopolimer dari persimpangan asam α -L-guluronat dengan ion kalsium.

Pengikatan kation divalen oleh alginat
(Bruchet *et al.*, 2015)

2.3 Hidrogel

Hidrogel terbentuk melalui proses gelasi (Gulrez *et al.*, 2011). Pada awalnya, sebelum terjadi proses interkoneksi jaringan polimer, material dasar hidrogel adalah berbentuk polimer bercabang yang tersebar dalam cairan pelarut. Proses interkoneksi antar cabang polimer kemudian menghasilkan polimer bercabang dalam ukuran yang lebih besar yang dibarengi dengan penurunan derajat solubilitasnya. Proses ini berlanjut sampai dengan tercapainya titik gelasi (gel point), yaitu titik dimana hidrogel mencapai kestabilan secara struktur. Pada umumnya hidrogel memiliki struktur yang berongga dengan ukuran lebar yang bervariasi baik dalam skala nano dengan diameter 50-200 nm (Scanning Electron Microscopy—SEM) dengan area permukaan seluas ~300 m²/gram (Brunauer Emmet Teller—BET), maupun skala mikro (~300 µm) tergantung jenis material dan teknik sintesis yang diterapkan (Kimura *et al.*, 2011).

Hidrogel adalah sistem semisolid yang dibentuk dari kombinasi satu atau lebih polimer hidrofilik. Hidrogel sering digunakan untuk pengobatan luka dan luka bakar karena kemampuannya untuk menyerap lebih banyak air dari pada beratnya sendiri. Hidrogel berfungsi sebagai bahan ganti yang mengurangi potensi iritasi ketika kontak dengan jaringan dan struktur serupa lainnya. Hidrogel mampu menjaga kelembapan yang mendukung penetrasi oksigen (Ali *et al.*, 2011).

Keuntungan penggunaan hidrogel untuk penanganan luka dan luka bakar adalah sebagai berikut (Ali *et al.*, 2011):

1. Bioadhesi gel ke permukaan luka tinggi, hal ini juga memudahkan perawatan karena meningkatnya kontak dengan luka.
2. Struktur hidrogel memfasilitasi kelembapan dan permeabilitas uap air

yang diperlukan untuk menyembuhkan daerah luka.

3. Kesulitan yang khususnya terkait dengan aplikasi untuk membuka luka tidak terlihat dalam penggunaannya.
4. Dapat dengan mudah dihilangkan dari situs aplikasi ketika terdapat efek samping.

2.4 Hidrogel Kolagen Fibril-Alginat

Hidrogel alginat telah banyak digunakan untuk enkapsulasi sel, transplasi sel, drug delivery, dan aplikasi teknik rekayasa jaringan. Menurut Mahmud (2015), meskipun penggunaan alginat yang telah luas dikenal karena sifatnya yang banyak menguntungkan untuk aplikasi teknik rekayasa jaringan, alginat kurang spesifik dalam interaksi dengan sel mamalia.

Hidrogel kolagen fibril yang dikompositkan dengan alginat untuk dapat meningkatkan potensinya dalam aplikasi skin substitute. Kolagen mudah untuk terdegradasi dan memiliki sifat mekanik yang lemah. Alginat yang merupakan polisakarida alam mampu membentuk ikatan silang kimia dengan kolagen fibril yang dapat menghasilkan strategi efektif untuk peningkatan sifat kolagen (Lin Sang *et al.*, 2011).

2.5 Fourier Transform Infra Red (FTIR)

Karakterisasi sampel dengan uji FTIR dilakukan dengan menggunakan alat Jasco FT/IR 5300 pada rentang bilangan gelombang 4000-600 cm⁻¹. Sebelumnya sampel dan serbuk KBr dihaluskan dalam satu cawan dengan penempa hingga halus dan merata kemudian dicetak dalam cetakan dan diberikan pembebanan hingga diperoleh sampel berbentuk palet tipis dengan ketebalan kurang dari 1 mm. Data yang diperoleh dari uji FT-IR berupa puncak spektrum serapan karakteristik gugus fungsi yang digambarkan sebagai kurva transmitansi (%) terhadap bilangan gelombang (cm⁻¹).

2.6 Scanning Electron Microscope (SEM)

Karakterisasi sampel dengan uji FTIR dilakukan dengan menggunakan alat Jasco FTIR 5300 pada rentang bilangan gelombang 4000-600 cm⁻¹. Sebelumnya sampel dan

serbuk KBr dihaluskan dalam satu cawan dengan penempa hingga halus dan merata kemudian dicetak dalam cetakan dan diberikan pembebanan hingga diperoleh sampel berbentuk palet tipis dengan ketebalan kurang dari 1 mm. Data yang diperoleh dari uji FT-IR berupa puncak spektrum serapan karakteristik gugus fungsi yang digambarkan sebagai kurva transmisi (%) terhadap bilangan gelombang (cm^{-1}).

2.7 Uji Absorpsi

Derajat pengembangan merupakan suatu parameter untuk mengetahui terjadinya ikatan polimer sehingga diketahui kekuatan suatu bahan untuk menahan air. Tingkatan atau keteraturan ikatan dalam polimer ditentukan melalui persentase penambahan berat polimer setelah mengalami pengembangan. Jika polimer hidrogel mengembang (swelling) dalam mediumnya, ini menunjukkan bahwa hidrogel mampu mengabsorpsi medium cairnya tanpa larut didalamnya. Kemampuan absorpsi penutup luka yang sesuai dengan kemampuan absorpsi plester komersil yakni 195,6990%. Pengukuran persentase pengembangan ditentukan berdasarkan persamaan, yaitu: (Muthoharoh, 2012).

2.8 Uji Kuat Tarik

Prinsip kuat tarik adalah menghitung besarnya beban tarik maksimum per satuan luas. Kekuatan tarik merupakan gaya tarik maksimum yang dapat ditahan oleh bahan selama pengukuran berlangsung hingga bahan terputus, sehingga kuat tarik dari suatu kasa sangat berpengaruh terhadap kualitas dari bahan tersebut. Pengujian kekuatan tarik ini nantinya untuk mengetahui seberapa besar nilai kuat tarik paduan yang dihasilkan. Kecepatan penarikan yang digunakan pada semua sampel adalah sama, sehingga tidak mempengaruhi nilai kuat tarik yang dihasilkan.

2.9 Uji Kemuluran (Elongation at break)

Prinsip elongasi adalah besarnya pertambahan panjang yang diakibatkan oleh beban tarikan pada saat putus. Nilai elongasi atau persen perpanjangan merupakan perubahan panjang maksimal bahan sebelum terputus. Nilai elongasi atau persen

perpanjangan dari suatu bahan juga sangat berpengaruh terhadap kualitas dari bahan tersebut. Besarnya elongasi menentukan keelastisan atau keuletan (ductility) suatu material. Nilai elongasi untuk kulit manusia berada pada kisaran 30-115%. Bila nilainya mendekati nol maka material tersebut merupakan material yang rapuh (Annaidh, 2012).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Sintesis komposit kolagen-alginat-nanopartikel perak

Tahap awal pembuatan membran hidrogel dimulai dengan melarutkan alginat 3%w/v atau sebanyak 3 gram dalam 50 ml aquades dengan menggunakan pengaduk magnetik selama ± 1 jam. Selanjutnya melarutkan kolagen dengan variasi komposisi berat antara lain 1%, 2%, 3%, 4% dan 5% (w/v) dalam 25 ml asam sitrat selama ± 3 jam dalam suhu ruang dengan menggunakan pengaduk magnetik. Larutan alginat yang sudah terbentuk akan ditambahkan larutan kolagen pertetes dengan dilakukan pengadukan menggunakan pengaduk magnetik sampai kedua larutan homogen, lalu ditambahkan CaCO_3 sebanyak 0,06 gram dan GDL sebanyak 0,214 gram dengan tetap melakukan pengadukan pada larutan alginat-kolagen. Hidrogel yang telah terbentuk dari ketiga larutan dituang pada cetakan untuk membentuk membran dengan metode kering udara pada suhu ruang selama ± 7 hari dan selanjutnya dilepaskan dari cetakan.

3.2 Uji FTIR (Fourier Transform Infra Red)

Karakterisasi sampel dengan uji FTIR dilakukan dengan menggunakan alat Jasco FT/IR 5300 pada rentang bilangan gelombang 4000-600 cm^{-1} . Sebelumnya sampel dan serbuk KBr dihaluskan dalam satu cawan dengan penempa hingga halus dan merata kemudian dicetak dalam cetakan dan diberikan pembebanan hingga diperoleh sampel berbentuk palet tipis dengan ketebalan kurang dari 1 mm. Data yang diperoleh dari uji FT-IR berupa puncak spektrum serapan karakteristik gugus fungsi yang digambarkan sebagai kurva transmisi (%) terhadap bilangan gelombang (cm^{-1}).

3.3 Uji SEM

Untuk mengetahui morfologi permukaan pada membran hidrogel komposit yang terbentuk, maka

dilakukan Uji SEM. Pengujiannya dengan memotong spesimen lalu dilapisi dengan emas. Struktur mikro membran hidrogel komposit diselidiki dengan pengukuran geometris pada pemindaian elektron mikroskop.

Uji Absorpsi

Uji kemampuan absorpsi membran hidrogel komposit dilakukan dengan menginkubasi membran hidrogel komposit pada pH 7,4 dalam larutan phosphate buffer saline (PBS) pada suhu ruang. Penghitungan berat basah membran hidrogel komposit dilakukan selama beberapa kali dengan memberi membran filter paper yang digunakan untuk menghilangkan air serapan pada permukaan kemudian segera ditimbang dengan timbangan digital.

3.4 Uji Mekanik

Pengujian kekuatan tarik merupakan salah satu uji mekanik yang dilakukan dengan mesin tensile IMADA tipe HV-1000N. Sebelum sampel diletakkan pada mesin tensile tersebut, tebal membran diukur dahulu. Nilai beban penarik dan perubahan panjang sampel pada saat putus dicatat. Hasil yang akan diperoleh adalah nilai tensile strength dan elongation dari bahan yang diuji.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian sampel dengan FTIR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat pada sampel. Pengujian MTT assay untuk mengetahui sitotoksitas sampel. Pengujian pH untuk mengetahui besarnya nilai pH pada membran yang terbentuk. Pengujian SEM dilakukan untuk mengetahui morfologi permukaan membran yang telah terbentuk. Pengujian absorpsi dilakukan untuk mengetahui kemampuan membran dalam menahan air. Pengujian mekanik dilakukan untuk mengetahui kemampuan membran untuk menahan beban dengan tanpa mengalami putus.

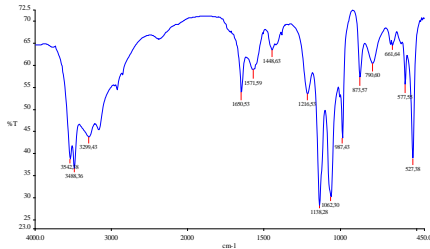
4.1 Uji FTIR

Pembuatan membran hidrogel komposit bahan utamanya antara lain bubuk natrium alginat dan kolagen. Kedua bahan utama tersebut diuji FTIR untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat di dalam masing-masing bahan utama untuk dijadikan acuan

pencocokan dengan uji FTIR sampel membran komposit. Pada tahap pengujian bahan yang akan diuji larutkan dengan KBr yang kemudian diuji dengan alat FTIR. Membran yang diuji dengan spektroskopi FTIR akan menghasilkan grafik spektrum yang menggambarkan nilai bilangan gelombang dan % transmitansi.

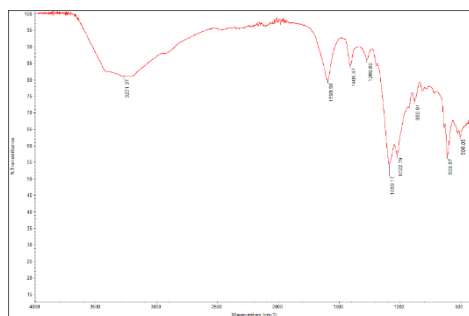
Hasil analisis dari spektroskopi FTIR yang didapatkan dari kolagen dan alginat yang merupakan bahan utama akan menjadi acuan untuk menunjukkan adanya interaksi kedua bahan utama tersebut pada membran hidrogel komposit. Pada hasil spektroskopi membran hidrogel komposit menunjukkan kesamaan serapan pada gelombang yang dimiliki oleh kedua bahan dasar utama.

Pada gambar 4 yang merupakan spektrum serapan kolagen terdapat dominasi gugus amida yang menunjukkan bahwa kolagen merupakan turunan asam amino. Spektrum serapan kolagen terdapat gugus hidroksil (O-H) yang muncul pada bilangan gelombang 3488 cm⁻¹. Gugus N-H (stretching) muncul pada bilangan gelombang 3299 cm⁻¹. Gugus amida I, II, dan III merupakan pita serapan yang khas dari kolagen berdasarkan struktur kimianya. Amida I adalah faktor penting dalam memahami struktur sekunder dari protein. Gugus amida I ditunjukkan pada bilangan gelombang 1650 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi C=O (stretching). Sedangkan Amida II menunjukkan adanya struktur heliks. Gugus amida II ditunjukkan pada bilangan gelombang 1571 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi N-H (bending). Adanya amida III ditunjukkan pada serapan bilangan gelombang 1448 cm⁻¹. Gugus amina ditunjukkan pada serapan bilangan gelombang 1216 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi C-N stretching.



Gambar 4. Spektrum FTIR kolagen

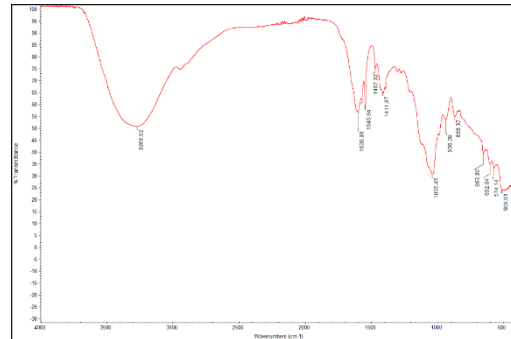
Pada gambar 5 merupakan spektrum serapan alginat yang memiliki pita serapan yang khas yaitu gugus karboksil berdasarkan struktur kimia alginat. Gugus hidroksil (O-H) ditunjukkan pada serapan bilangan gelombang 3271 cm⁻¹ dan 1408,97 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi O-H stretching. Gugus hidroksil pada alginat menunjukkan pita yang melebar dikarenakan adanya ikatan hidrogen antar molekul. Gugus karbonil yang merupakan pita serapan yang khas dari alginat ditunjukkan pada serapan bilangan gelombang 1593 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi C=O stretching. Gugus alkil (-CH-) ditunjukkan pada panjang gelombang 1089,17 cm⁻¹. Sedangkan gugus karbonil ditunjukkan pada bilangan gelombang 1022,79 cm⁻¹



Gambar 5. Spektrum FTIR Alginat

Gambar 6 merupakan hasil uji FTIR membran hidrogel komposit. Pada spektrum ini muncul serapan bilangan gelombang 1600,93 cm⁻¹ yang menunjukkan gugus fungsional C=O (karbonil) pada alginat dan juga gugus C=O (amida I) pada kolagen. Bilangan gelombang 1545,65 cm⁻¹ menunjukkan gugus N-H (amida II) pada kolagen. Pada serapan bilangan gelombang 1467 cm⁻¹ menunjukkan gugus fungsional C-N (amida III) dari kolagen. Sedangkan gugus

fungsional C=O (hidroksil) dari alginat ditunjukkan pada bilangan gelombang 1412 cm⁻¹. Serapan bilangan gelombang 1035 cm⁻¹ merupakan gugus fungsional C-O (hidroksil) dari alginat.



Gambar 6. Spektrum FTIR komposit kolagen-alginat

Pada membran hidrogel komposit menunjukkan bahwa terjadi interaksi antara dua bahan utama yaitu alginat dan kolagen. Masing-masing gugus fungsional dari kedua bahan utama muncul pada spektrum serapan infra red. Gugus amida I, II dan III yang merupakan dominasi gugus pada kolagen muncul pada spektrum FTIR membran hidrogel komposit. Gugus karbonil dari alginat juga muncul pada spektrum FTIR membran hidrogel komposit.

Tabel 1. Hasil pengujian FTIR pada sampel Membran Komposit

Gugus/ Ikatan	Kolagen	Alginat	Komposit
Amida (N-H)	3299	-	3266,92
Amida I (C=O)	1650	-	1600,93
Amida II (N-H)	1571	-	1545,64
Amida III (C-N)	1448	-	1467,02
Amina (C-N)	1216	-	-
Karbonil (C=O)	-	1593,56	1600,93
Hidroksi	-	1408,97	1411,97

I (O-H)			
Alkil (C-H)	-	1089,17	-
Karbonil (C=O)	-	1022,79	1035,45

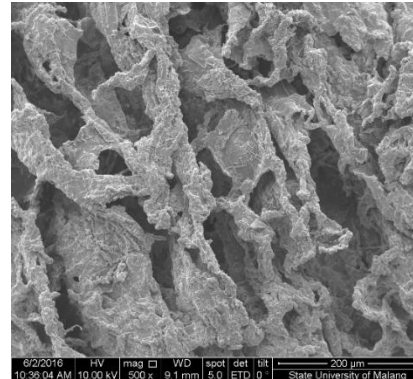
Pada membran hidrogel komposit menunjukkan bahwa terjadi ikatan antara dua bahan utama yaitu alginat dan kolagen. Masing-masing gugus fungsional dari kedua bahan utama muncul pada spektrum serapan infra red. Gugus amida I, II dan III yang merupakan dominasi gugus pada kolagen muncul pada spektrum FTIR membran hidrogel komposit. Gugus karbonil dari alginat juga muncul pada spektrum FTIR membran hidrogel komposit.

Pada hasil spektrum serapan membran hidrogel kolagen fibril-alginat-nanopartikel perak tidak muncul gugus baru dan hanya terjadi pergeseran panjang gelombang. Seluruh panjang gelombang pada hasil serapan spektrum komposit yang terbentuk mengalami pergeseran panjang gelombang seperti pada hasil FTIR membran komposit ditunjukkan spektrum serapan bilangan gelombang 1600,93 cm⁻¹ yang merupakan gugus Amida I yang merupakan karakteristik yang khas dari kolagen. Amida I adalah faktor penting dalam pemahaman struktur sekunder dari protein (Su Rong et al., 2009). Pada bilangan 1600,93 cm⁻¹ juga menunjukkan gugus karbonil dari alginat. Spektrum serapan tersebut menunjukkan bahwa terjadi pergeseran bilangan gelombang yang menunjukkan adanya interaksi dari kolagen dan alginat. Ikatan antara gugus karbonil (C=O) pada alginat dengan gugus amida (N-H) pada kolagen menghasilkan ikatan kimia berupa ikatan hidrogen.

Penentuan Morfologi Membran Hidrogel Komposit dengan SEM (*Scanning Electron Microscope*)

Morfologi permukaan sampel membran hidrogel komposit dapat diamati dengan menggunakan. Pengamatan dengan SEM

memerlukan coating terlebih dahulu dikarenakan sampel membran hidrogel komposit yang bahan utamanya merupakan polimer alam tidak akan tertembak elektron yang menyebabkan sampel rusak karena berongga pada saat pengamatan dengan SEM. Pelapisan menggunakan emas atau Au (Aurum). Hasil yang ditunjukkan dari pengamatan sampel dengan menggunakan SEM dapat dilihat pada gambar 7.



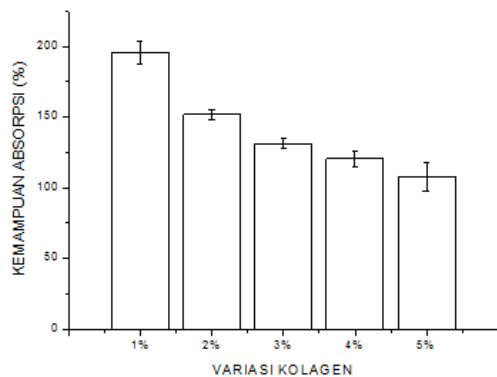
Gambar 7. Penampang morfologi membran komposit alginat-kolagen

Analisis uji morfologi dengan SEM ini didapatkan gambaran permukaan membran yang berwarna gelap dan terang. Warna terang pada gambar hasil tersebut menunjukkan permukaan membran yang lebih tinggi dibandingkan yang berwarna gelap. Sehingga warna yang terlihat gelap merupakan pori dari sebuah membran. Pada gambar 4. ditunjukkan menunjukkan permukaan yang berpori besar dan berdinding tebal.

Uji Kemampuan Absorpsi

Pengujian kemampuan absorpsi bertujuan untuk mengetahui besarnya penyerapan air (swelling) yang mampu dilakukan oleh membran hidrogel. Ukuran membran hidrogel yang digunakan untuk pengujian ini adalah 1 x 1 cm, yang kemudian dilakukan penimbangan untuk mengetahui berat awal membran hidrogel komposit. Selanjutnya membran direndam dalam larutan PBS ber-pH 7 selama 12 jam. Larutan PBS didapatkan dari melarutkan satu tablet PBS dalam 100 ml

aquades. Selanjutnya dilakukan penimbangan membran hidrogel komposit untuk mengetahui berat akhir setelah perendaman dengan PBS selama 12 jam. Masing-masing membran hidrogel dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, yang kemudian dilakukan perhitungan presentase rata-rata nilai absorpsi (swelling) membran hidrogel komposit. Hasil perhitungan presentase nilai rata-rata absorpsi membran hidrogel komposit dapat dilihat pada Lampiran 10. Presentase banyaknya air yang terserap oleh membran hidrogel komposit dapat dihitung dengan persamaan 1 dan hasil perhitungan rata-rata presentase absorpsi membran hidrogel komposit ditunjukkan pada Tabel 5.



Gambar 8. Grafik kemampuan absorpsi membran hidrogel komposit.

Tabel 2. Rata-rata presentase kemampuan absorpsi

Variasi komposisi kolagen	Kuat tarik (N/mm ²)	Standar deviasi
1%	3,07	±0,69
2%	1,25	±0,62
3%	0,77	±0,25
4%	3,73	±1,33
5%	3,74	±1,05

Berdasarkan Tabel 2. dapat diketahui rata-rata nilai presentase kemampuan absorpsi masing-masing membran hidrogel komposit kolagen-alginat-nanopartikel perak dengan variasi komposisi kolagen 1%, 2%, 3%, 4%

dan 5% antara lain $196\% \pm 8,02$; $152\% \pm 4,04$; $131\% \pm 3,61$; $122\% \pm 5,51$ dan $108\% \pm 10,02$. Berdasarkan hasil analisis tersebut menunjukkan perbedaan nilai presentase penyerapan air (swelling) dari masing-masing variasi komposisi kolagen pada membran hidrogel komposit. Hal ini didukung dengan hasil uji statistik dari data uji absorpsi yang diketahui signifikansi pada uji ANOVA sebesar 0,000 ($P < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan data uji absorpsi memiliki minimal satu pasangan kelompok yang berbeda. Nilai rata-rata presentase absorpsi membran mengalami penurunan seiring dengan kenaikan komposisi kolagen.

Presentase absorpsi sangat bergantung pada sifat hidrofilik dan mikro membran, karena kolagen dan alginat merupakan bahan hidrofilik maka keduanya memiliki kemampuan untuk mempertahankan struktur membran tetap solid. Kolagen yang memiliki sifat mekanik yang rendah menyebabkan kolagen tidak dapat mempertahankan struktur membran berpori saat dibawa keluar dari larutan PBS. Sebaliknya, alginat yang memiliki sifat elastisitas yang tinggi dibanding kolagen dapat membantu struktur membran berpori. Hal tersebut menyebabkan presentase rata-rata absorpsi akan menurun seiring dengan meningkatnya penambahan kolagen. Namun demikian, membran ini dapat dikatakan sebagai membran hidrogel karena memiliki presentase rata-rata absorpsi $> 90\%$ (Muthoharoh, 2012). Pada sampel 2 yang memiliki nilai absorpsi optimum dibandingkan sampel lainnya dikarenakan memiliki komposisi alginat dan kolagen yang ideal dimana komposisi alginat masih lebih besar dibandingkan kolagen dan komposisi kolagen tidak terlalu kecil. Hal tersebut didukung dengan nilai standar deviasi yang kecil dan data uji statistik dengan ANOVA. Hasil uji statistik data uji absorpsi terdapat perbedaan nyata pada perlakuan untuk kolagen 1% dan perlakuan kolagen 2%. Pada sampel dengan komposisi alginat dan kolagen yang seimbang sampel cenderung menurun kekuatan absorpsinya. Alginat sebagai agen pembentuk gel berkurang kemampuan absorpsinya ketika

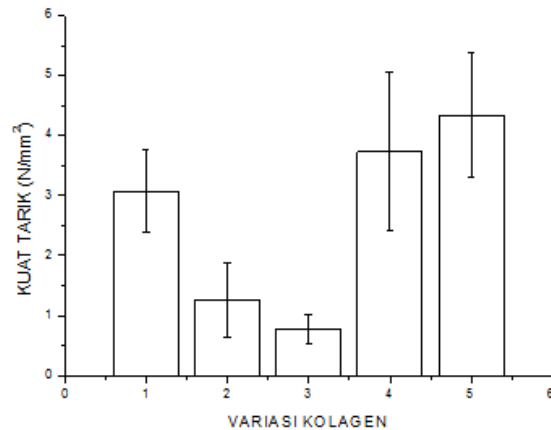
komposisi kolagen diperbanyak, hal ini membuat semakin banyak rantai alginat yang berikatan dengan kolagen sehingga kemampuan mengembangnya akan menurun sehingga membran menjadi semakin kuat. Hal tersebut didukung dengan hasil uji statistik data uji absorpsi untuk perlakuan kolagen 3% yang tidak terdapat perbedaan nyata dengan data uji absorpsi untuk perlakuan kolagen 4%. Pada sampel dengan komposisi alginat terbesar memiliki nilai absorb yang tinggi dikarenakan masih belum banyak terjadi ikatan antara rantai alginat dan kolagen. Hal ini membuat membran lebih banyak menyerap larutan sehingga membran mudah rapuh dan mudah hancur. Hal tersebut didukung dengan hasil uji stasistik dengan ANOVA dimana data uji absorpsi untuk perlakuan kolagen 4% tidak berbeda nyata dengan data uji absorpsi untuk perlakuan kolagen 5%.

UJI MEKANIK

Parameter penting untuk karakteristik mekanik yang diukur dan diamati dari sebuah membran hidrogel adalah kekuatan tarik dan elongasi. Pengujian tensile strength atau uji tarik dan elongasi dilakukan untuk mengetahui kakarakteristik mekanik membran pada masing-masing komposisi dengan menggunakan persamaan 2.4. dan elongasi menggunakan persamaan 2.5. Hasil pengujian tarik sampel membran hidrogel komposit dapat dilihat pada Tabel.3

Tabel 3. Data pengukuran kuat tarik membran hidrogel komposit

Variasi komposisi kolagen	Kuat tarik (MPa)	Standar deviasi
1%	3,07	$\pm 0,69$
2%	1,25	$\pm 0,62$
3%	0,77	$\pm 0,25$
4%	3,73	$\pm 1,33$
5%	3,74	$\pm 1,05$



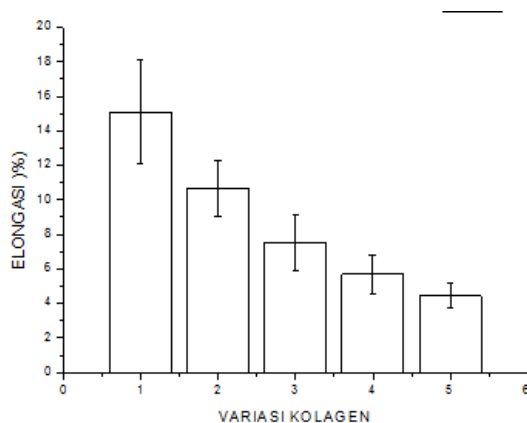
Gambar 9. Grafik kuat tarik membran hidrogel komposit kolagen-alginat-nanopartikel perak

Pada membran hidrogel komposit dengan variasi komposisi kolagen 1%, 2%, 3%, 4% dan 5% (w/v) mempunyai nilai kuat tarik masing-masing sebesar 3,07 MPa \pm 0,69 ; 1,25 MPa \pm 0,62 ; 0,77 MPa \pm 0,25 ; 3,73 MPa \pm 1,33 dan 3,74 MPa \pm 1,05 yang ditunjukkan pada Gambar 5.8. Terdapat nilai yang menurun signifikan pada sampel 2 dan 3. Hal tersebut dikarenakan pada sampel 2 dan 3 terjadi kesalahan prosedural ketika pencetakan yaitu saat dilakukan uji tarik sampel sebenarnya belum benar-benar kering. Waktu pengeringan yang berbeda pada sampel 2 dan 3 dibandingkan sampel yang lain berpengaruh pada tingkat kekeringan sampel. Sampel dengan waktu pengeringan yang lebih singkat menghasilkan kondisi sampel yang lembab dan mudah robek. Pada sampel 1 dikarenakan memiliki komposisi kolagen terkecil sehingga memiliki nilai uji tarik yang kecil dibandingkan sampel 4 dan 5 yang memiliki komposisi kolagen terbanyak. Sampel 4 dan 5 yang memiliki nilai kuat tarik lebih tinggi dibandingkan sampel lainnya dikarekan kolagen memiliki kemampuan untuk meningkatkan kekuatan mekanik membran.

Tabel 4. Data pengukuran elongasi membran hidrogel komposit

Variasi komposisi kolagen	Elongasi (%)	Standar deviasi
---------------------------	--------------	-----------------

1%	15,08	$\pm 2,5$
2%	10,69	$\pm 1,3$
3%	7,42	$\pm 1,4$
4%	5,62	$\pm 0,9$
5%	4,43	$\pm 0,6$



Gambar 10. Grafik elongasi membran hidrogel komposit kolagen-alginat-nanopartikel perak

Pada Tabel 4 elongasi membran hidrogel komposit kolagen-alginat-nanopartikel perak pada variasi komposisi kolagen 1%, 2%, 3%, 4% dan 5% (w/v) memiliki nilai masing-masing sebesar 15,08% $\pm 2,5$; 10,69% $\pm 1,3$; 7,42% $\pm 1,4$; 5,63% $\pm 0,9$ dan 4,43% $\pm 0,6$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin besar komposisi kolagen maka nilai elongasi semakin menurun.

Pada kelima sampel membran hidrogel komposit hanya sampel 2 dan 3 yang belum memenuhi standart kuat tarik untuk scaffold kulit manusia pada bagian abdomen menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Annaid et al, 2011 yakni dengan range nilai UTS 1-24 MPa. Kesalahan prosedur pada waktu sintesis pada sampel 2 dan 3 membuat nilai kuat tarik dari kedua bahan tersebut tidak sesuai dengan standart. Hal tersebut berbanding lurus dengan nilai standar deviasi (standar error) kedua bahan yang cenderung besar dibandingkan dengan sampel lainnya. Nilai kuat tarik optimum ditunjukkan pada sampel 1 dibandingkan sampel lainnya dilihat

dari standar deviasinya. Berdasarkan hasil uji statistik data uji kuat tarik untuk perlakuan kolagen 2% dan 3% tidak ditemukan perbedaan yang nyata. Hal mendukung hasil pengukuran dengan alat uji tensile dimana sampel 2 dan 3 yaitu pada penambahan kolagen 2 % dan 4% yang mengalami kesalahan prosedural. Pada sampel 4 dan sampel 5 memiliki nilai kuat tarik tertinggi namun standar deviasinya juga tinggi dibanding sampel lain sehingga hasil kedua sampel ini kurang representatif. Hal tersebut dapat dikarenakan beberapa faktor, salah satunya karena ketebalan yang tidak merata sehingga nilai kuat tarik yang didapat kurang representatif.

Berdasarkan hasil uji statistik data uji kuat tarik untuk perlakuan kolagen 4% dan 5% diketahui tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Nilai kuat tarik sampel yang tergolong kecil menunjukkan sampel belum optimum dikarenakan tidak terdapat gugus fungsi baru hanya terjadi ikatan fisik yang dikarenakan terjadinya pergeseran panjang gelombang spektrum serapan pada hasil uji FTIR membran hidrogel komposit. Perlu penambahan crosslinker untuk memperbanyak ikatan silang antara kolagen dan alginat. Hal tersebut juga diperkuat dengan hasil uji statistik data uji kuat tarik untuk perlakuan kolagen 1% yang tidak ada perbedaan nyata dengan perlakuan kolagen 2% dan 3% serta perlakuan kolagen 4% dan 5%. Meskipun demikian hasil uji ANOVA data uji kuat tarik memiliki nilai signifikansi sebesar 0,002 ($P < 0,05$) yang berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan minimal terdapat satu pasang kelompok perlakuan yang berbeda.

Hasil elongasi dari kelima sampel menunjukkan bahwa semakin besar komposisi kolagen maka nilai elongasi semakin menurun. Pada sampel 1 yang memiliki komposisi kolagen paling rendah memiliki nilai elongasi tertinggi dikarenakan perbandingan kolagen lebih sedikit dibandingkan alginat yang merupakan polimer alam yang memiliki sifat elastis yang tinggi. Penambahan komposisi kolagen yang terlalu tinggi seperti pada

sampel 4 dan 5 akan menghasilkan membran dengan sifat yang kaku atau getas (brittle) (Krisna, 2011). Hal tersebut didukung dengan uji statistik data uji elongasi untuk perlakuan kolagen 4% dan 5% yang tidak memiliki perbedaan nyata. Nilai elongasi optimum ditunjukkan pada sampel 2 dimana standar deviasi sampel 2 cenderung kecil dibanding keempat sampel lainnya. Sampel 2 menunjukkan nilai representatif dimana komposisi kolagen dan alginat dapat dikatakan ideal karena komposisi alginat lebih besar dibanding kolagen, namun komposisi kolagen juga tidak terlalu kecil sehingga membran tidak terlalu elastis dan tidak terlalu kaku. Hasil tersebut didukung dengan hasil uji statistik data uji elongasi untuk perlakuan kolagen 2% yang tidak memiliki perbedaan nyata dengan sampel 1% dikarenakan keduanya masih memiliki komposisi alginat yang lebih besar dibanding ketiga perlakuan kolagen lainnya.

UJI STATISTIK

Pengujian statistik digunakan untuk menganalisis data yang telah diperoleh dari penelitian ini, diantaranya berdasarkan uji absorpsi, uji kuat tarik dan uji elongasi. Uji statistik yang digunakan pada penelitian ini yaitu uji ANOVA agar dapat diketahui ada tidaknya pengaruh dari perlakuan yang diberikan. Uji ANOVA dapat dilakukan jika memenuhi beberapa syarat antara lain skala data minimal interval, data harus terdistribusi normal dan homogen.

Pengujian statistik menggunakan program SPSS untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pada masing-masing kelompok perlakuan. Hasil uji statistik disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji statistik.

	Kelompok Perlakuan	N	Data Hasil Uji		ANOVA	
			Rata-rata	SD	Signifika nsi	Kesimpu lan
DATA UJI ABSORPSI	Kolagen 1% ^(d)	3	195,67	8,02	0,000	Ada beda makna
	Kolagen 2% ^(c)	3	151,67	4,04		
	Kolagen 3% ^(b)	3	131	3,61		
	Kolagen 4% ^(a,b)	3	120,67	5,51		
	Kolagen 5% ^(a)	3	107,67	10,02		
DATA UJI KUAT TARIK	Kolagen 1% ^(a,b)	3	3,07	0,69	0,002	Ada beda makna
	Kolagen 2% ^(a)	3	1,25	0,62		
	Kolagen 3% ^(a)	3	0,77	0,25		
	Kolagen 4% ^(b)	3	3,73	1,33		
	Kolagen 5% ^(b)	3	4,34	1,05		
DATA UJI ELONGASI	Kolagen 1% ^(c)	3	15,09	3,02	0,000	Ada beda makna
	Kolagen 2% ^(b,c)	3	10,65	1,59		
	Kolagen 3% ^(a,b)	3	7,50	1,66		
	Kolagen 4% ^(a)	3	5,68	1,12		
	Kolagen 5% ^(a)	3	4,43	0,74		

Hasil uji normalitas untuk data uji absorpsi menunjukkan signifikansi sebesar 0,875 ($P > 0,05$). Nilai signifikansi dari hasil uji normalitas pada data uji kuat tarik sama dengan hasil uji normalitas data uji absorpsi. Pada data uji elongasi juga menunjukkan kesamaan nilai signifikansi dengan data uji absorpsi dan data uji ku

at tarik. Nilai signifikansi dari ketiga data uji lebih dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi normal. Oleh sebab itu, data tersebut tidak terdapat penyN/mm² ngan dan dapat dilakukan uji lanjutan.

Hasil uji homogenitas pada data uji absorpsi, data uji kuat tarik dan data uji elongasi menunjukkan bahwa ketiga data uji tersebut homogen sehingga dapat dilakukan uji ANOVA. Hasil uji homogenitas data untuk uji absorpsi memiliki signifikansi sebesar 0,555 ($P > 0,05$). Pada data uji kuat tarik memiliki signifikansi sebesar 0,09 dan untuk data uji elongasi nilai signifikansinya sebesar 0,221. Berdasarkan hasil uji homogenitas dari ketiga data tersebut diketahui bahwa data tersebut homogen yang memenuhi syarat untuk melakukan uji ANOVA yang dilakukan untuk dapat mengetahui ada tidaknya perbedaan antar kelompok perlakuan.

Hasil uji ANOVA untuk data uji absorpsi menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($P < 0,05$) sehingga pada data uji ini diketahui terdapat minimal satu pasangan kelompok perlakuan yang berbeda. Uji selanjutnya yaitu Post Hoc Test yang mana diketahui tidak ada perbedaan yang nyata pada perlakuan kolagen 3% dan perlakuan kolagen 4%. Pada data uji absorpsi perlakuan kolagen 4% dan perlakuan kolagen 5% hasil uji Post Hoc Test juga menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata. Hasil yang berbeda ditunjukkan pada data uji perlakuan kolagen 1% dan perlakuan kolagen 2% yang diketahui terdapat perbedaan yang nyata dari keduanya dibandingkan data uji absorpsi perlakuan kolagen 3%, 4% dan 5%.

Hasil uji ANOVA untuk data uji kuat tarik menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,002 ($P < 0,05$) sehingga pada data uji ini diketahui terdapat minimal satu pasangan kelompok perlakuan yang berbeda. Pengujian selanjutnya menggunakan Post Hoc Test yang mana diketahui data uji kuat tarik untuk perlakuan kolagen 1% tidak terdapat perbedaan yang nyata. Pada data uji kuat tarik untuk perlakuan kolagen 2% dan 3% menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata. Pada data uji kuat tarik untuk perlakuan kolagen 4% dan 5%.

Hasil uji ANOVA untuk data uji elongasi menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($P < 0,05$) sehingga pada data uji ini diketahui terdapat minimal satu pasangan kelompok perlakuan yang berbeda. Pengujian lanjutan dengan Post Hoc Test menunjukkan data elongasi untuk perlakuan kolagen 1% dan 2% tidak ada perbedaan yang nyata, hal tersebut sama dengan data elongasi untuk perlakuan kolagen 4% dan 5%. Perbedaan yang nyata ditunjukkan pada data uji elongasi untuk perlakuan kolagen 1% dan 4%, serta data uji elongasi untuk perlakuan kolagen 1% dan 5%.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

Membran hidrogel komposit kolagen fibril-alginat-nanopartikel perak mempunyai karakter berdasarkan hasil FTIR menunjukkan bahan baku utama sudah sesuai dengan gugus fungsinya dan kedua bahan sudah tercampur, hasil pengujian SEM membran komposit tanpa nanopartikel perak menunjukkan penebalan dinding dan pori yang lebar, sedangkan membran dengan penambahan nanopartikel perak ukuran pori lebih kecil, kemampuan absorpsi menunjukkan rentang nilai rata-rata membran hidrogel komposit sebesar 107,67% - 195,67%, nilai kuat tarik menunjukkan rentang nilai rata-rata membran hidrogel komposit sebesar 0,77-3,74 MPa, nilai elongasi menunjukkan rentang rata-rata membran hidrogel komposit sebesar 4,43 - 15,08%.

DAFTAR PUSTAKA

Annaidh, A.N., Bruyèred, K., Destrade, M., Gilchrista, M.D., Otténio, M.,
2012. Characterization of The

- Anisotropic Mechanical Properties of Excised Human Skin. *Journal of The Mechanical Behaviour of Biomedical Materials*, **3** : 139-148.
- Baniasadi, Mahmoud., Majid Minary Jolandan. 2015. *Alginate-Collagen Fibril Composite Hydrogel*. *Materials* 2015, 8, 799-814. www.mdpi.com/journal/materials.
- Chattopadhyay, Sayani., Ronald T. Raines.2014. *Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing*.Biopolymer. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.
- Chawla, Reema., Amelia Seifalian, Nalem S. Moiemmen, Peter E. Butler, Alexander M. Seifalian. 2014. *The Use of Skin Substitute in The Treatment of Burns*. London : Elsavier Inc.
- Cunha, Cristiana Branco da., Darinka D. Klumpers, Weiwei A. Li, Sandeep T. Koshy, James C. Weaver, Ovijit Chaudhuri, Pedro L. Granja, David J. Mooney. 2014. *Influence of the stiffness of three- dimensional alginate/collagen-I interpenetrating networks on fibroblast biology*.Elsevier. www.elsevier.com/locate/biomaterials.
- Depalle, Baptiste., Zhao Qin, Sandra J. Shefelbine, Markus J. Buehler.2014. *Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils*.Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials (2014). Elsevier.
- Khasima, Keita., Masano Imai. 2011. Advanced Membrane Material from Marine Biological Polymer and Sensitive Molecular-Size Recognition for Promising Separation Technology. Intech. <http://www.intechopen.com/>
- Kempf, Margit., Yuki Miyamura, Pei-Yun Liu, Alice C.H. Chen, Hideki Nakamura, Hiroshi Shimizu, Yasuhiko Tabata, Roy M. Kimble, James R. McMillan. 2011. A denatured collagen microfiber scaffold seeded with human fibroblasts and keratinocytes for skin grafting.Elsevier. www.elsevier.com/locate/biomaterials.
- Krisna, Dimas Damar Adi, 2011, Pengaruh Regelatinasi dan Modifikasi Hidrotermal terhadap Sifat Fisik pada Pembuatan Edible Film Dari Pati Kacang Merah (*Vigna angularis* sp.), Tesis, Program Magister Teknik Kimia, UNDIP, Semarang
- Lee, Kuen Yong., David J. Mooney.2012. *Alginate: Properties and biomedical applications*.Elsevier. www.elsevier.com/locate/ppolysci.
- Nunamaker, Elizabeth A., Erin K. Purcell, Daryl R. Kipke. 2006. In Vivo Stability and Biocompatibility of Implanted Calcium Alginate Disks. Wiley InterScience. www.interscience.wiley.com.
- Sang, Lin., Dongmei Luo, Songmei Xu, Xiaoliang Wang, Xudong Li. 2011. Fabrication and evaluation of biomimetic scaffolds by using collagen– alginate fibrillar gels for potential tissue

- engineering applications.Elsevier.
[www.elsevier.com/ locate/msec](http://www.elsevier.com/locate/msec).
- Sang, Lin., Xiaoliang Wang, Zhenhua Chen, Jiao Lu, Zhongwei Gu, Xudong Li. 2011. Assembly of collagen fibrillar networks in the presence of alginate.Elsevier.
www.elsevier.com/locate/carbpol
- Su,Xiu-Rong,et al.,2009, Characterization of Acid-Soluble Collagen from the Ceolomic Wall of Sipunculida, Elsevier.
- Zheng, Li., Hai Qing Lu, Hong Song Fan, Xing Dong Zhang. 2013.
Reinforcement and chemical cross-linking in collagen-based scaffolds in cartilage tissue engineering: a comparative study.Journal Iran Polymer Vol. 22 page 833-842.