

POTENSI NANOKOLAGEN LIMBAH SISIK IKAN SEBAGAI *COSMECEUTICAL*

Hanny Setyowati^{1*}, Wahyuning Setyani²

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi “YAYASAN PHARMASI”, Semarang

²Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

Abstract: *Collagen is the most abundant protein of white connective tissue, comprising approximately 30% of total animal protein. This is a fibrous protein which give strength and flexibility in the tissue and bone, also playing an important role for skin and tendon. The utilization of collagen from fish scales waste become an alternative for medication (pharmaceutical), and daily care as cosmetic, which known by cosmeceutical. Nanotechnology application can be completing of cosmeceutical, not only for cure, but also for daily treatment using an wasted materials changed into beneficial product to be developed.*

Keywords : *collagen, fish scales waste, cosmeceutical*

1. Pendahuluan

Kolagen berasal dari bahasa Yunani yakni “*cola*” yang berarti lem (*glue*) dan “*genno*” yang berarti kelahiran (*birth*). Hal ini disebabkan karakteristik kolagen yang melekatkan sel untuk membentuk kerangka jaringan dan organ tubuh. Molekul kolagen berdiameter 1,5 nm dengan panjang 280 nm dan berat molekulnya 290.000 Dalton. Kandungan kolagen berupa tiga rantai polipeptida dengan lebih dari 1000 asam amino dimasing-masing rantainya (Asyiraf, 2011).

Senyawa ini merupakan komponen struktural utama jaringan ikat putih (*white connective tissue*) yang meliputi hampir 30% total protein pada tubuh. Terdapat 19 jenis kolagen, yaitu tipe I sampai XIX. Tipe I, II, III, dan V adalah kolagen *fibrous*. Kolagen tipe I ditemukan di semua jaringan ikat, termasuk kulit dan tulang. Strukturnya terdiri atas heteropolimer (rantai alfa-1 dan alfa-2) dan *glycine* (tanpa *tryptophan* dan *cysteine*) (Jongjareonrak *et al.*, 2005). Peran kolagen tipe I yakni sebagai matrik protein ekstraselular dengan karakteristik peningkatan proliferasi sel sehingga secara langsung mempengaruhi fisiologis dan morfologi sel (Cardoso *et al.*, 2014). Tipe I ini banyak ditemukan pada kulit, tulang, dan sisik ikan, sementara kolagen tipe V terdapat pada jaringan

ikat dalam kulit, tendon, dan otot ikan yang juga mengandung kolagen tipe I (Nagai *et al.*, 2004).

Kolagen komersial biasanya diperoleh dari kulit sapi, kulit babi, atau kulit ayam, tetapi penggunaannya kurang tepat mengingat pertimbangan agama dan kontaminasi biologis seperti BSE (*Mad Cow Disease*), TSE (*Transmissible Spongiform Encephalopathy*), FMD (*Foot and Mouth Disease*) dan sebagainya. Kandungan asam amino yang tinggi pada hewan yang hidup darat juga menyebabkan proses denaturasi lebih cepat sehingga kualitas kolagennya juga rendah (Aberoumand, 2012). Di sisi lain, pendayagunaan kolagen yang berasal dari hewan yang hidup di air, seperti ikan dapat menjadi alternatif yang menjanjikan. Ekstrak kolagen dapat berperan sebagai kosmetik dan obat, serta residunya (*hydrolysate*) dapat dimanfaatkan dalam industri makanan sebagai pelembut makanan (Arvanitoyannis dan Kassaveti, 2008). Kolagen yang berasal dari sisik ikan dapat digunakan untuk menyembuhkan luka bakar dan perbaikan jaringan (Gelse *et al.*, 2003).

Cosmeceutical merupakan gabungan dari *cosmetic* dan obat (*pharmaceutical*). *Cosmetic* (FDA) didefinisikan sebagai sediaan yang diaplikasikan pada tubuh manusia untuk

*Email korespondensi: hannytan18@gmail.com

membersihkan, mempercantik, meningkatkan daya tarik atau penampilan seseorang. Istilah *cosmeceutical* ini mencakup pada penggunaan yang lebih luas, yakni bermanfaat untuk pengobatan, sekaligus berperan pada perawatan sehari-hari sebagai kosmetik (Lohani *et al.*, 2014). Berdasarkan kajian diatas, kolagen dapat berperan sebagai *cosmeceutical*. Pada bidang pengobatan, kolagen digunakan sebagai *sponges* untuk luka bakar, benang bedah, agen hemostatik, penggantian atau substitusi pada pembuluh darah dan katup jantung tiruan. Pada bidang kosmetik, kolagen digunakan untuk mengurangi keriput pada wajah atau dapat disuntikkan ke dalam kulit untuk menggantikan jaringan kulit yang telah rusak (Guillen *et al.*, 2011). Oleh karenanya, pemanfaatan kolagen yang berasal dari limbah sisik ikan sangat potensial digunakan sebagai *cosmeceutical*.

2. Tinjauan Pustaka

2.1 Limbah Sisik Ikan

Sisik merupakan lapisan terluar dari kulit yang berfungsi sebagai *barrier* yang mencegah masuknya senyawa asing ke dalam tubuh ikan. Variasi sisik ikan ini sangat luas, dapat dibedakan atas bentuk, ukuran, dan susunannya. Klasifikasi umum terdiri atas *cosmoid*, *ganoid*, *placoid*, dan *elasmoid* (*cycloid* dan *ctenoid*) yang sering ditemukan pada kelas *teleost* (Zhu *et al.*, 2011).

Lapisan kolagen pada sisik ikan tersusun kaku akibat mineralisasi, konsisten dengan sifat fleksibilitas yang rendah. Fase mineral terdiri dari *calcium hydroxyapatite*, dengan sejumlah kecil ion natrium, magnesium, karbonat, dan fosfat. Demineralisasi sisik ikan telah dilakukan dengan merendam sisik ikan ke dalam 0,5 M EDTA (1:25 dari rasio berat sisik) selama 2 hari setelah sebelumnya dihilangkan sisa protein menggunakan larutan NaCl 10% selama 1 hari. Seluruh prosedur dilakukan pada suhu 277 K untuk menghambat fragmentasi kolagen. Hasil perendaman dicuci dengan air suling sebanyak tiga kali. Berakhirnya proses demineralisasi ditegaskan dengan hilangnya 100% dari berat awal menggunakan analisis Thermogravimetri (TG) pada suhu 1437 K. Prosedur ini telah diterapkan pada spesies *Pagrus major* oleh Ikoma¹ *et al.* (2003).

Ekstraksi atau pemurnian kolagen setelah demineralisasi dapat menggunakan tiga metode utama, yakni menghasilkan kolagen larut garam netral, kolagen larut asam, dan kolagen larut pepsin (Aberoumand, 2010). Prosedur ekstraksi kolagen tersebut telah berhasil dilakukan pada beberapa spesies, seperti *Lates niloticus* (Muyonga *et al.*, 2004), *Sardinops melanostictus*, *Pagrus major*, *Lateolabrax japonicus* (Nagai *et al.*, 2004), *Lutjanus argentimaculatus*, *Lutjanus johnii* (Rosmilah *et al.*, 2005), *Lutjanus vitta*, *Priacanthus macracanthus* (Jongjareonrak *et al.*, 2006), *Pangasianodon hypophthalmus* (Singh² *et al.*, 2011), dan *Oreochromis niloticus* (Nurhayati *et al.*, 2013).

Proses ekstraksi menentukan karakteristik fisik kolagen yang didapatkan, contohnya pada penelitian Nurhayati *et al.* (2013) didapatkan hasil bahwa ekstraksi dengan asam asetat pada suhu 4°C dengan konsentrasi 0,5 M dan 1,5 M memiliki perbedaan kadar asam amino, suhu denaturasi, dan kemampuan mengembang. Pada perlakuan asam asetat 0,5 M, kolagen memiliki proporsi asam amino dan suhu denaturasi yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan asam asetat 1,5 M, meskipun kemampuan mengembangnya membutuhkan waktu yang lebih lama. Ekstraksi dengan asam asetat juga dilakukan oleh Dincer *et al.* (2015) pada spesies *Dicentrarchus labrax*. Pada penelitian ini dilakukan perbandingan ekstraksi menggunakan asam asetat 0,5 M dan campuran pepsin 1% selama 48 jam. ASC (*Acid Soluble Collagen*) memiliki rendemen lebih tinggi dibandingkan PSC (*Pepsin Soluble Collagen*). ASC diklasifikasikan dalam kolagen tipe I yang juga terdapat pada spesies *Theragra chalcogramma* berdasarkan penelitian Yan *et al.* (2008) dan spesies *Pseudosciaena crocea* oleh Wang *et al.* (2013). Hal yang berbeda ditunjukkan oleh Muralidharan *et al.* (2013) karena rendemen PSC lebih besar dibandingkan ASC dari spesies *Odonus niger*. Liofilisasi sering dilakukan untuk mendapatkan kolagen murni setelah proses ekstraksi dengan asam (Sadowska *et al.*, 2003). Baik ASC maupun PSC memiliki karakteristik protein fibrin (protein berbentuk serabut) yang berguna dalam bidang farmasi, biomedis, dan kosmetik (Guillen *et al.*, 2011).

Yunoki *et al.* (2003) menyatakan bahwa kolagen yang berasal dari ikan salmon memiliki denaturasi yang lebih kecil dibandingkan kolagen yang berasal dari mamalia. Stabilitas terhadap iradiasi UV dan *dehydrothermal* juga telah dipastikan dengan pengujian infra merah (*Fourier Transform-Infrared Spectroscopy*) dan thermal menggunakan DSC (*Differential Scanning Calorimetry*). Penelitian serupa juga dilakukan oleh Sankar *et al.* (2007) dengan menggunakan sisik ikan *Lates calcarifer* yang telah dievaluasi dengan IR (*Infrared Spectroscopy*), TGA (*Thermo-Gravimetric Analysis*), dan SEM (*Scanning Electron Microscopy*). Kekuatan (*tensile strength*) yang baik dapat berpotensi sebagai bahan penyembuh luka. Pengujian secara biologis baik secara *in vivo* dan *in vitro* dilakukan menggunakan kolagen dari ikan Tilapia. Ekstrak kolagen yang diperoleh telah lulus uji sterilitas terhadap bakteri dan virus (termasuk endotoksin), serta toksisitas terhadap sel, sensitivitas, kelainan kromosom, reaksi intrakutan, toksisitas akut sistemis, reaksi pirogen, dan hemolisis juga menunjukkan hasil negatif sesuai kriteria ISO dan *Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan*. Kolagen tersebut berpotensi sebagai biomaterial untuk proses regeneratif jaringan pada penyembuhan luka (Yamamoto *et al.*, 2014).

2.2 Kolagen

Kolagen adalah protein serabut yang memberikan kekuatan dan fleksibilitas pada jaringan dan tulang serta memegang peranan penting bagi jaringan lainnya, termasuk kulit dan tendon. Senyawa ini merupakan protein utama yang menyusun komponen matrik ekstraseluler. Kolagen tersusun atas *triple helix* dari tiga rantai α polipeptida, mengandung dua jenis turunan asam amino yang tidak langsung dimasukkan selama proses translasi (Fratzl, 2008; Muyonga *et al.*, 2004). Struktur *triple helix* kolagen berasal dari tiga asam amino utama, yakni *glycine*, *proline*, dan *hydroxyproline* (Lodish *et al.*, 2000), dapat diamati pada Gambar 1.

Seluruh tipe kolagen dapat diekstraksi dengan cara fermentasi diikuti proses pemisahan berdasarkan kelarutannya pada ion dan pH yang berbeda. Pemisahan kolagen tipe I, II, dan III telah

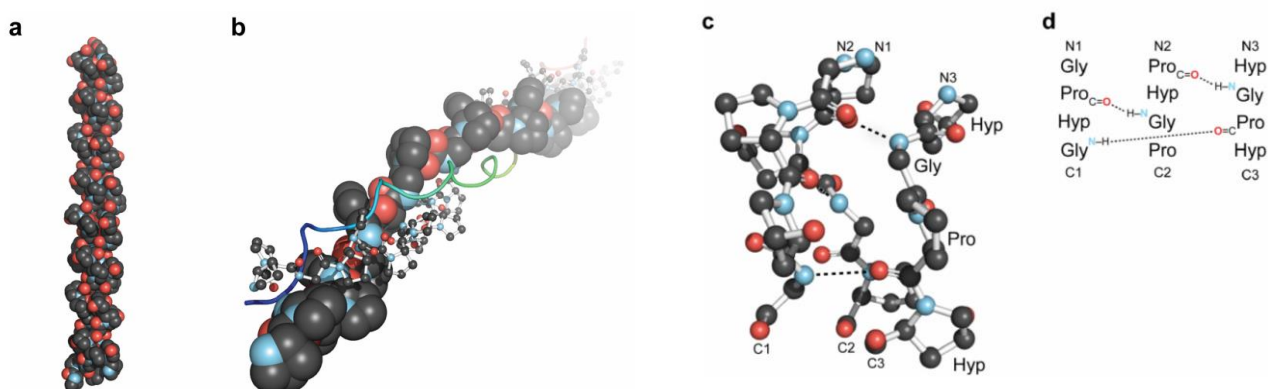
dilakukan dengan mengkondisikan larutan pada pH yang berbeda, salah satunya dengan elektroforesis. Kolagen tipe I banyak ditemukan pada lapisan dermis dan tendon, kolagen tipe II dominan pada kartilago, sedangkan kolagen tipe III juga ditemukan pada dermis ketika usia muda dan menurun konsentrasinya seiring dengan bertambahnya usia (Hsiao *et al.*, 2004). Bae *et al.* (2008) yang meneliti kolagen pada spesies *Siganus fuscescens*, *Kyphosus bigibbus*, *Myliobatis tobijei*, *Dasyatis akajei*, *Dasyatis laevigata*, dan Shahiri *et al.* (2012) yang menggunakan spesies *Onchorhynchus mykiss* menyimpulkan bahwa kelarutan kolagen pada kisaran pH 1-4 lebih tinggi akibat gaya tolak menolak antar molekul, sedangkan pada pH 7 dan 9, justru terjadi penurunan kelarutan. Fenomena ini ditandai dengan terbentuknya presipitat dan agregasi yang disebabkan oleh interaksi hidrofobik antar molekul kolagen sehingga terjadilah koagulasi.

Kolagen yang paling banyak dikenal adalah kolagen tipe I yang terdiri dari tiga rantai α polipeptida. Kolagen tipe I paling banyak terdapat pada bagian tubuh yang lunak seperti kulit dan tendon maupun bagian tubuh yang keras seperti tulang dan gigi serta jaringan penghubung (Cardoso *et al.*, 2014). Senyawa ini dapat diperoleh dari kulit hewan laut seperti ubur-ubur, bintang laut, gurita, *paper nautilus*, *cuttlefish purple*, dan *sea urchin*. Ekstraksi kolagen tipe I dari sisik ikan mengandung kolagen fiber tipe I dan *calcium hydroxyapatite* ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) (Ikoma² *et al.*, 2003, Pang *et al.*, 2013).

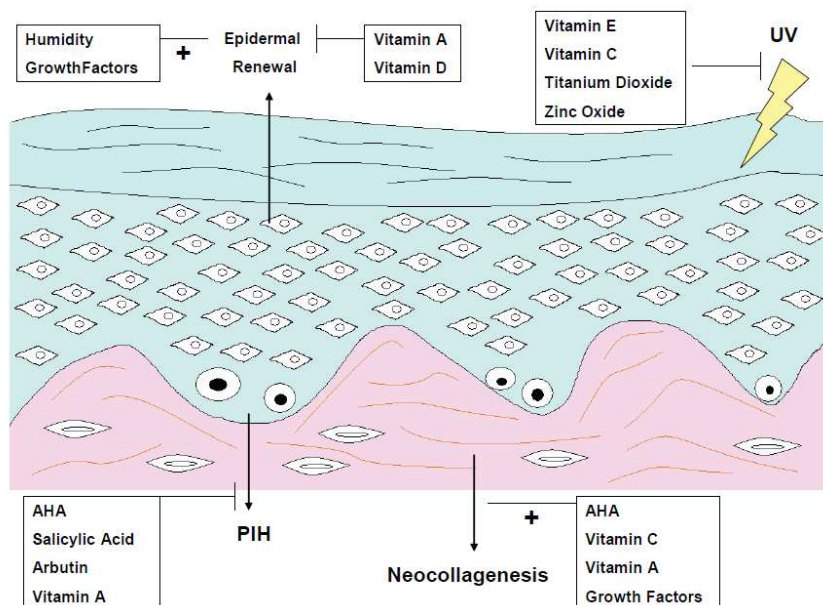
Glycine ditemukan sebagai asam amino utama bersama dengan *alanine*, *proline*, dan *hydroxyproline* pada sisik ikan spesies *Thunnus alalunga*, *Scoliodon sorrakowah*, dan *Labeo rohita* (Hema *et al.*, 2013). Pada spesies *Catla catla* dan *Cirrhinus mrigala*, ditemukan kandungan *glycine* dan *alanine* bersama dengan grup imin (*proline*, *hydroxyproline*) yang berlimpah (Mahboob, 2015). *Glycine* dan *proline* juga menjadi asam amino dengan konsentrasi terbesar yang ditemukan pada spesies *Liza melinoptera*, *Liza macrolepis*, *Valamugil speigleri*, dan *Mugil cephalus* berdasarkan penelitian Massod *et al.* (2015). Hasil ini menegaskan adanya kandungan kolagen, sebab *glycine* dan *proline*

merupakan komponen esensial sebagai penyusun kolagen. Evaluasi dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) menghasilkan data bahwa kolagen yang didapatkan adalah kolagen tipe I, dengan satu sampai tiga *glycine*, dan sejumlah kecil *tyrosine* dan *histidine*, sedangkan *tryptophan* dan *cysteine* tidak terlihat. Selain *glycine* dan *proline*, *lysine* merupakan komponen esensial lainnya untuk

pembentukan kolagen karena terlibat dalam ikatan *cross-linking telopeptide* kolagen. Kandungan *lysine* relatif tinggi pada *L. melinoptera*, *M. cephalus* tetapi rendah pada *L. macrolepis* dan *V. Speigleri*. Hal serupa juga ditemukan pada spesies *Priacanthus tayenus* (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005) dan *Tachysurus maculatus* (Bama *et al.*, 2010) yang sisiknya mengandung kolagen tipe I.



Gambar 1. Struktur kolagen triple helix: (a) struktur kristal resolusi tinggi pertama kolagen, tersusun dari $(ProHypGly)_4-(ProHypAla)-(ProHypGly)_5$; (b) Tampilan melintang dari satu $(ProProGly)_{10}$ triple helix dengan tiga helaian pada ruang kosong yang digambarkan sebagai bola, tongkat, dan pita; (c) gambar bola dan tongkat dari segmen kolagen triple helix; (d) ikatan tiga helai pada segmen panel c (Shoulders dan Raines, 2009).



Gambar 2. Mekanisme agen *cosmeceutical*. AHA: Alpha-hydroxyacid; PIH: Post-inflammatory hyperpigmentation; UV: ultraviolet light (Tsai dan Hantash, 2008)

2.3 Cosmeceutical

Cosmeceutical mulai tumbuh dengan pesat pada industri perawatan personal. Formulasi *cosmeceutical* telah menyebar dari ujung rambut sampai ujung kaki dan telah digunakan untuk mengobati hiperpigmentasi, kerutan, dan kerusakan rambut (Walters dan Roberts, 2008) dengan berbagai bentuk sediaan, seperti krim, lotio, dan salep (Kim *et al.*, 2008). Terobosan terbaru seperti nanoteknologi ditujukan untuk meningkatkan efektivitas sediaan *cosmeceutical* sekaligus membuatnya tampak elegan (Lohani *et al.*, 2014). Beberapa bahan yang dapat digunakan sebagai *cosmeceutical* diantaranya asam salisilat, asam glikolat (AHA), arbutin, ceramide, vitamin C, vitamin E, vitamin A, dan fenol tumbuhan yang berperan sebagai anti inflamasi, agen *depigmenting*, mempercepat pertumbuhan kulit, pelembab, dan tabir surya, seperti ditunjukkan pada Gambar 2.

Cosmeceutical dapat berupa *active cosmetics*, *nutricosmetics*, *performance cosmetics*, *functional cosmetics*, dan *dermaceuticals*. Perbedaan *cosmetics* dan *cosmeceutical* seperti ditunjukkan pada Tabel 1.

2.4 Nanoteknologi

Penggabungan nanoteknologi dalam *cosmeceutical* bertujuan untuk memperbaiki aktivitas sediaan kosmetik tersebut, diantaranya produk parfum memiliki bau harum yang bertahan lama, tabir surya yang mampu melindungi hingga 24 jam, krim anti penuaan dengan efek kulit muda dan bercahaya, serta pelembab yang menjaga agar kulit tidak kering dan sehat (Tsai dan Hantash, 2008). Beberapa inovasi dalam nanoteknologi diantaranya pembuatan nanoemulsi (karakteristik transparan dan tekstur yang lembut), nanokapsul (pada produk perawatan kesehatan), nanopigmen (aktivitas perlindungan sinar ultraviolet yang lebih kuat), formulasi liposom (kandungan bahan obat dalam vesikel yang untuk melindungi bahan dari oksigen atau cahaya), niosom, nanopartikel lipid padat, dendrimer (Kaur dan Agrawal, 2007) serta sistem nanopartikel dengan *nanotubes*, *nanocrystal*, *fullerenes*, *nanotopes*, dan *nanospheres* (Sharma dan Sharma, 2012). Skema

pembuatan nanokolagen (Gambar 3) telah dilakukan oleh Papi *et al.* (2011) yang ditujukan untuk meningkatkan stabilitas sediaan *cosmeceutical* sehingga menghasilkan efek maksimal.

Teknologi nano menghasilkan nanopartikel dengan dua karakter yakni (1) nanopartikel *soluble* dan atau *biodegradable* (seperti liposom dan nanoemulsi) dan (2) nanopartikel *insoluble* dan atau *nonbiodegradable* (seperti TiO₂, *fullerenes*, and *quantum dots*). Nanopartikel kolagen yang selanjutnya disingkat nanokolagen dapat berpenetrasi melalui folikel rambut dan pori-pori kulit. Semakin kecil ukuran partikelnya akan semakin mudah menembus lapisan epidermis kulit secara transfolikuler (Lohani *et al.*, 2014).

Ukuran nano ini dapat berperan sebagai tabir surya dengan karakteristik *UV-reflecting* dan *UV-absorbing*. Peredaman sinar UV adalah total penjumlahan dari penghamburan dan absorpsi serta tergantung pada beberapa faktor, yakni (1) dispersi partikel inorganik, (2) ukuran partikel, dan (3) indek refraktif. Semakin kecil ukuran partikel, perlindungannya menuju ke arah sinar UV dengan panjang gelombang rendah. Berdasarkan uji TEM (*Transmission Electron Microscopy*), nanopartikel dapat merefleksikan dan mengabsorpsi sinar UV lebih efisien pada bentuk agregat yang berukuran 100 nm (Gambar 4). Dengan demikian, absorpsi perkutan dapat tercapai sehingga dapat berperan sebagai *barrier* yang mencegah kerusakan kulit akibat sinar UV (Chen *et al.*, 2013).

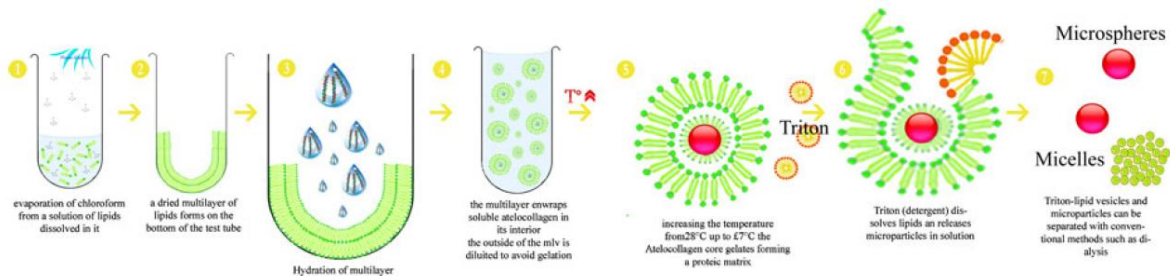
2.5 Aplikasi cosmeceutical

2.5.1 Skin aging (penuaan dini)

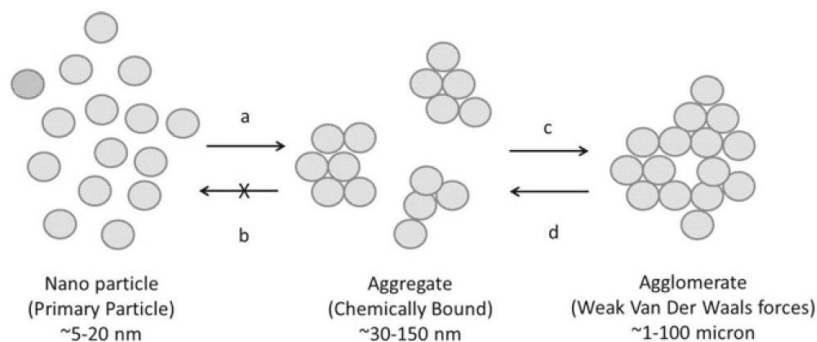
Keriput atau kerutan merupakan manifestasi klinis dari '*cutaneous aging*' dan tanda terjadinya penuaan dini (*skin aging*). Faktor intrinsik (genetik, metabolisme selular, dan hormon) dan faktor ekstrinsik (paparan sinar matahari, polusi, radiasi radikal bebas/ ion, bahan kimia, dan toksin) merupakan kombinasi faktor yang menyebabkan akumulasi perubahan struktur dan fungsi kulit (Ganceviciene *et al.*, 2012).

Tabel 1. *Cosmetic versus cosmeceutical* (Wanjari dan Waghmare, 2015)

<i>Cosmetics</i>	<i>Cosmeceuticals</i>
<ul style="list-style-type: none"> • FD& C ACT (<i>Federal Food, Drug and Cosmetics Act</i>) mendefinisikan produk <i>cosmetic</i> sesuai dengan tujuan penggunaannya untuk membersihkan dan mempercantik kulit. • Produk <i>cosmetic</i> hanya menghantarkan senyawa aktifnya pada lapisan kulit yang paling atas. • <i>Cosmetic</i> tidak menghambat proses penuaan dini (<i>skin aging</i>) karena hanya bekerja pada lapisan atas epidermis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Produk <i>cosmeceutical</i> memiliki manfaat farmakologi pada kulit. • Produk <i>cosmeceutical</i> mengandung senyawa aktif yang beraksi pada struktur sel kulit bagian dalam melalui pemberian secara topikal untuk tujuan terapi, melawan penyakit, dan penyembuhan atau regenerasi kulit. • <i>Cosmeceutical</i> lebih terkonsentrasi, alami, dan efektif dalam terapi sekaligus dapat mencegah penuaan dini.



Gambar 3. Skema pembuatan nanopartikel kolagen (Papi *et al.*, 2011). Keterangan: 1) Disolusi lipid dalam kloroform; 2) Pembentukan multilayer; 3) Proses hidrasi multilayer; 4) Pembentukan vesikel multilayer; 5) Pembentukan inti kolagen dengan suhu 37°C; 6) Nanopartikel kolagen terdapat pada larutan



Gambar 4. Formasi agregat dan aglomerasi dari nanopartikel (Chen *et al.*, 2013)

Photoageing adalah super posisi *chronicultraviolet* (UV) yang menginduksi perubahan struktur kulit. Manifestasi *photoaging* berupa kerutan pada lapisan atas dan bawah epidermis kulit, perkembangan tekstur kasar, atropi, dan *dyspigmentation*. Jumlah kerusakan kulit yang disebabkan sinar matahari ditentukan dari jumlah paparan radiasi dan proteksi pigmen seseorang. Perubahan epidermis akibat sinar matahari termasuk

dalam penipisan epidermis dan ekspresi lesi yang memicu aktivasi keratosis, karsinoma sel basal, dan karsinoma sel *squamous* (Arsiwala *et al.*, 2013).

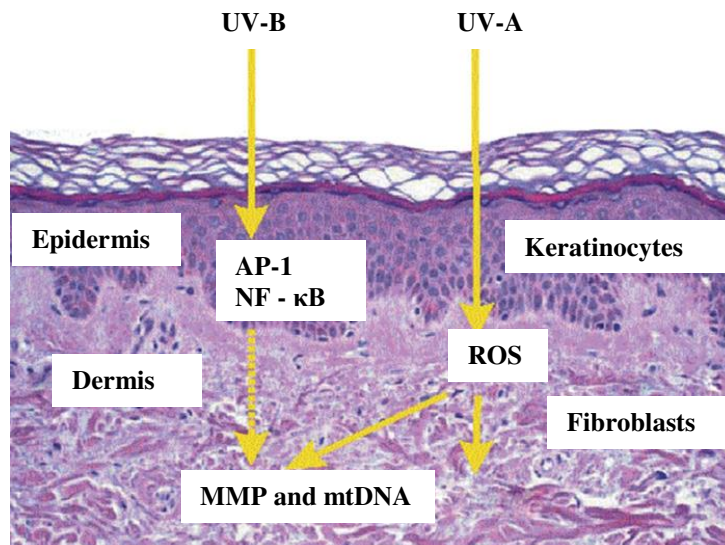
Radiasi sinar UV mempengaruhi modifikasi *post-translasi* dari matrik protein kulit (melalui ROS/*Reactive Oxygen Species*) dan menurunkan regulasi transkripsi protein yang sama (melalui jalur TGF - β /*Smad signaling*). Sinar

UVA dan UVB menginduksi varietas *matrix metalloproteinases* (MMPs) yang luas. Senyawa ini mendegradasi matrik protein kulit, spesifiknya yakni kolagen melalui aktivitas enzimatik. UV menginduksi MMP-1 dengan menginisiasi *cleavage* tipe I dan III kolagen kulit, diikuti dengan degradasi MMP-3 dan MMP-9. Kolagen tipe I distabilkan oleh ikatan silang dengan matrik protein kulit sehingga dengan adanya degradasi oleh MMPs, akan mengganggu intergritas dermis yang berujung pada kerusakan kulit, seperti ditunjukkan pada Gambar 5 (Alam dan Havey, 2010).

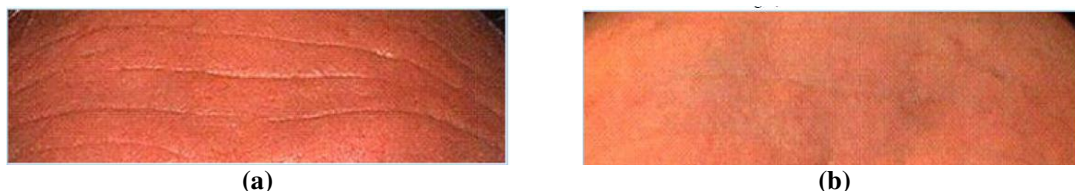
Photoprotection merupakan mekanisme pertahanan alami yang dikembangkan untuk meminimalkan kerusakan kulit ketika terpapar radiasi UV. Perlindungan ini dapat diperoleh dari komponen organik atau inorganik yang berasal dari hewan darat maupun laut. Beberapa senyawa protektif tersebut diantaranya *scytonemins* (eksklusif dalam *cyanobacteria*), *mycosporines* (pada jamur),

mycosporine-like amino acids (MAAs, pada *cyanobacteria*, ganggang, dan hewan laut), *phenyl propanoids* dan flavonoid (tumbuhan tingkat tinggi), melanin (manusia, hewan darat lainnya, atau beberapa bakteri), dan bahan-bahan lain yang mampu mengabsorpsi UV (Pallela *et al.*, 2010).

Berdasarkan pengamatan histopatologi menurut Saghari dan Baumann (2009), sel keriput disebabkan oleh penipisan lapisan epidermis, perbesaran (atopi) jaringan adiposa subkutan hipodermis yang setara dengan kekurangan kolagen, glikosaminoglikan, dan jaringan elastin. Kekurangan kolagen merupakan temuan utama yang menyebabkan keriput, baik pada kulit yang terpapar maupun tidak terpapar sinar matahari. Biosintesis kolagen mulai menurun seiring dengan bertambahnya usia dan adanya peningkatan *matrix metalloproteinases* (MMPs) menyebabkan degradasi kolagen semakin besar.



Gambar 5. Sinar UV berinteraksi dengan sel kulit yang berbeda. Lebih spesifik, energi dari sinar UVB diabsorpsi oleh epidermis dan mempengaruhi sel epidermis seperti keratinosit. Energi dari sinar UVA mempengaruhi epidermis, keratinosit, dan fibroblas. Keterangan: AP -1: *activator protein- 1*; NF - κ B: *nuclear factor κ B*; MMP: *matrix metalloproteinase* ; mtDNA: *mitochondrial DNA*; ROS: *Reactive Oxygen Species*



Gambar 6. (a) Sebelum pemberian, (b) Setelah 25 hari pemberian

Sediaan topikal yang mengandung senyawa retinoid dapat digunakan untuk mencegah dan mengobati penuaan dini (*skin aging*) melalui peningkatan sintesis kolagen dan penurunan MMPs. Senyawa antioksidan seperti vitamin C (asam askorbat) juga berperan dalam jalur sintesis kolagen melalui enzim *prolyl hydroxylase*. Penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan sel keriput dengan pemberian asam askorbat yang berkorelasi dengan peningkatan kolagen pada lokasi yang diobati. Selain vitamin C, *coenzyme Q10* (ubiquinone), *green tea*, dan vitamin E dipercaya dapat mencegah dan mengobati penuaan dini (Lee *et al.*, 2015). Sejalan dengan bahan sintetik, *marine* kolagen juga dapat menurunkan MMPs dengan meningkatkan aktivitas inhibitor jaringan *metalloproteinases*. Kolagen juga mendorong biosintesis kolagen melalui peningkatan prokolagen tipe I dan III mRNA (Farris, 2010)

Hasil penelitian Chai *et al.* (2010) yang mengekstraksi kolagen dari sisik ikan Tilapia (*Oreochromis sp*) menunjukkan bahwa kolagen memiliki aktivitas penetrasi ke dalam stratum korneum epidermis berdasarkan pengujian *Franz-type diffusion cell*. Ekstrak kolagen mengaktifkan jaringan fibroblas dan menginisiasi biosintesis kolagen dari dalam sehingga meningkatkan elastisitas dan kelembaban kulit. Pengujian secara *in vivo* telah dilakukan oleh Kumar *et al.* (2011) yang menunjukkan bahwa kolagen yang diekstraksi dari sisik ikan Tilapia (*Oreochromis niloticus*) mampu mengurangi kerutan dibagian dahi setelah 25 hari pemakaian (Gambar 6). Hal ini disebabkan ukuran molekul yang kecil sehingga mudah menembus jaringan epidermis dan dermis sehingga mampu memperbaiki sel kulit yang rusak.

2.5.2 Wound healing activity (penyembuhan luka bakar)

Kolagen merupakan komponen kunci pada proses penyembuhan luka. Pada luka bakar terjadi peningkatan jumlah *matrix metalloproteinases* (MMPs) yang menyebabkan degradasi kolagen

sebagai penyusun epidermis kulit. Pembentukan kolagen ini dapat dibuat dengan menggunakan pembawa atau kombinasi agen gel, pasta, polimer, *oxidized regenerated cellulose* (ORC), dan *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) (Brett, 2008). Senyawa ini merupakan biomaterial yang menstimulasi penyusunan serat baru dan jaringan di tempat luka serta menciptakan lingkungan yang baik untuk proses penyembuhan luka. Serabut kolagen ketika diaplikasikan pada luka, tidak hanya menginisiasi angiogenesis, tetapi juga merangsang mekanisme perbaikan alami tubuh. Peran ini dapat mengurangi edema dan cairan pada luka, memfasilitasi migrasi fibroblas ke tempat luka sehingga mampu menghentikan pendarahan. Sterilitas juga terjamin pada pemberian kolagen yang dibuktikan dengan tidak terdapat infeksi lain disekitar lokasi luka (Singh¹ *et al.*, 2011).

Fase regeneratif pada penyembuhan luka memerlukan tiga komponen utama, yakni sel, nutrisi, dan *scaffold*. Kolagen dapat berperan sebagai ideal *scaffold* yang mendukung berbagai jaringan ikat yang terdapat pada kulit, tendon, tulang, kartilago, pembuluh darah, dan ligamen (Hayashi *et al.*, 2012). Dengan demikian, fungsi kolagen diantaranya hemostasis, interaksi dengan trombosit, interaksi dengan fibronectin, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler, meningkatkan faktor pertumbuhan dan mendorong proses fibroplasia dan proliferasi pada epidermis. Tabel 2 menunjukkan peranan kolagen dalam proses penyembuhan luka menurut Triyono (2005).

Kolagen dari luar berperan dalam fase maturasi dengan membantu kolagen alami yang dari dalam tubuh untuk memberi kekuatan pada jaringan baru serta meningkatkan organisasi serabut-serabut kolagen pada waktu remodeling penyembuhan luka. Kolagen yang ditimbun dalam luka diubah, membuat penyembuhan lebih kuat dan lebih mirip jaringan. Kolagen baru menyatu, menekan pembuluh darah dalam penyembuhan luka, sehingga bekas luka, menjadi rata dan tipis.

Tabel 2. Peranan Kolagen Dalam Proses Penyembuhan Luka (Triyono, 2005)

Fase penyembuhan luka	Peranan kolagen
<ul style="list-style-type: none"> • Fase inflamasi <ul style="list-style-type: none"> a. Hemostasis dengan menghentikan perdarahan yang berlebihan. b. Vasodilatasi terjadi migrasi netrofil untuk melawan infeksi. c. Netrofil menarik makrofag membantu mengeluarkan debris. d. Makrofag menarik fibroblas ke daerah luka untuk mulai sintesa kolagen. 	<ul style="list-style-type: none"> a. Membantu proses hemostasis. b. Menarik makrofag dengan kemampuannya kemotaksis. c. Menyebabkan antibakteri secara alami infiltrat inflamasi.
<ul style="list-style-type: none"> • Fase proliferasi <ul style="list-style-type: none"> a. Fibroblas terlihat di daerah luka dan memulai sintesis kolagen. b. Pembentukan jaringan granulasi terdiri dari lengkung-lengkung kapiler yang membentuk lipatan-lipatan serabut kolagen. 	<ul style="list-style-type: none"> a. Aksinya sebagai lipatan-lipatan untuk penggabungan fibroblas. b. Menarik fibroblas ke daerah luka. c. Di dalam struktur matrik, menjadi model untuk pertumbuhan jaringan baru.
<ul style="list-style-type: none"> • Fase maturasi <ul style="list-style-type: none"> a. Reorganisasi matrik jaringan konektif . b. Fibril-fibril kolagen konsolidasi menjadi lebih tebal dan serabut yang lebih padat. 	<ul style="list-style-type: none"> a. Memberi kekuatan pada jaringan baru. b. Meningkatkan organisasi serabut-serabut kolagen yang kas pada fase remodeling penyembuhan luka.

Manfaat ini dapat meningkatkan estetika kulit dan berperan sebagai kosmetik alami untuk kulit (Brett, 2008).

3. Kesimpulan

Nanokolagen sebagai *cosmeceutical* memiliki kualitas dan aktivitas yang sama dengan bahan sintetik lainnya. Hal ini dapat mendorong pemanfaatan bahan alam, khususnya limbah sisik ikan sehingga dapat menerapkan efektivitas bahan, mengurangi pencemaran lingkungan, dan meningkatkan nilai jual sisik ikan dari sekedar limbah menjadi bahan yang potensial.

Daftar Pustaka

- Aberoumand, A., 2010, Isolation and Characteristics of Collagen from Fish Waste Material, *World Journal of Fish and Marine Sciences*, **2** (5): 471-474.
- Aberoumand, A., 2012, Comparative Study Between Different Methods of Collagen Extraction from Fish and its Properties, *World Applied Sciences Journal*, **16** (3): 316-319.
- Alam, M., dan Havey, J., 2010, Chapter 2: Photoaging dalam Draeos, Z.D., *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*. New York: Blackwell Publishing.
- Arsiwala, S., Tahiliani, S., Jerajani, H., Chandrashekhar, B.S., Aurangabadkar, S., Kohli, M., Savardekar, P., Sarangi K., Kharkar, R.D., dan Shah, F., 2013, Evaluation of Topikal Anti-Wrinkle and Firming (AWF) for Women, Anti-Wrinkle and Firming (AFM) for Men and Deep Wrinkles for Wrinkles on Face and Neck, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **6** (3): 86-89.
- Arvanitoyannis, I.S., dan Kassaveti, A., 2008, Fish Industry Waste: Treatments, Environmental Impacts, Current and Potential Uses, *International Journal of Food Science and Technology*, **43**: 726-745.
- Asyiraf, N., 2011, Extraction of Collagen From Fish Waste and Determination of Its Physico-chemical Characteristic, *Final Project*, Degree of Bachelor of Science (Hons.) Food Science and Technology, Faculty of Applied Sciences, Selangor: Universiti Teknologi MARA.
- Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A., dan Hara, K., 2008, Biochemical Properties of Acid-Soluble Collagens Extracted from The Skins of Underutilised Fishes, *Food Chemistry*, **108**: 49–54.
- Bama, P., Vijayalakshimi, M., Jayasimman, R., Kalaichelvan, P.T., Deccaraman, M., dan Sankaranarayanan, S., 2010, Extraction of Collagen from Cat Fish (*Tachysurus maculatus*) by Pepsin Digestion and Preparation and Characterization of Collagen Chitosan Sheet, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2** (4): 133-137.
- Brett, D., 2008, A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings, *Wounds*, **20** (12). www.medscape.com.
- Cardoso, V.S., Quelemes, P.V., Amorin, A., Primo, F.L., Gobo, G.G., Tedesco, A.C., Mafud, A.C., Mascarenhas, Y.P., Corrêa, J.R., Kuckelhaus, S.A et al., 2014, Collagen Based Silver Nanoparticles for Biological Applications: Synthesis and Characterization, *Journal of Nanobiotechnology*, **12** (36): 1-9.
- Chai, H. Y., Li, J. H., Huang, H. N., Li, T. L., Chan, Y. L., Shiau, C. Y., dan Wu, C. J., 2010, Effects of Sizes and Conformations of Fish-Scale Collagen Peptides on Facial Skin Qualities and Transdermal Penetration Efficiency, *Hindawi Publishing Corporation, Journal of Biomedicine and*

- Biotechnology*, Article ID 757301, 9 pages, doi:10.1155/2010/757301.
- Chen, L.L., Tooley, I., dan Wang, S.Q., 2013, Chapter 11: Nanotechnology in Photoprotection dalam Nasir *et al.*, *Nanotechnology in Dermatology*, New York: Springer.
- Dincer, M. T., Agcay, O. Y., Sargin, H., dan Baryam, H., 2015, Functional Properties of Gelatin Recovered From Scales of Farmed Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*), *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **39**: 102-109.
- Farris, P.K., 2010, Chapter 9: Marine Cosmeceuticals dalam Draeos, Z.D., *Cosmeceuticals: Procedures in Cosmetic Dermatology Series*, 3rd Edition Elsevier.
- Fratzl, P., 2008, *Collagen: Structure and Mechanics*, New York: Springer.
- Ganceviciene, R., Liakou, A.I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., dan Zouboulis, C.C., 2012, Skin Anti-aging Strategies, *Dermato-Endocrinology*, **4** (3): 308-319.
- Gelse, K., Poschl, E., dan Aigner, T., 2003, Collagens Structure, Function, and Biosynthesis, *Advanced Drug Delivery*, **55**: 1531-1546.
- Guillen, M.C.G., Gimenez, B., Caballero, M.E.L., dan Montero, M.P., 2011, Functional and Bioactive Properties of Collagen and Gelatin from Alternative Source: A Review, *Food Hydrocolloids*, **25** (8): 1813-1827.
- Hayashi, Y., Ikeda, T., Yamada, S., dan Yanagiguchi, K., 2012, Chapter 11: Fish Collagen and Tissue Repair dalam Kim, S.K., *Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects*, New York: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Hayashi, Y., Ikeda, T., Yamada, S., Koyama, Z., dan Yanagiguchi, K., 2014, Chapter 22: The Application of Fish Collagen to Dental and Hard Tissue Regenerative Medicine dalam Kim, S.K., *Seafood Processing By-Products: Trends and Application*, New York: Springer.
- Hema, G.S., Shyni, K., Mathew, S., Anandan, R., Ninan, G., dan Lakshmanan, P.T., 2013, A Simple Method for Isolation of Fish Skin Collagen- Biochemical Characterization of Skin Collagen Extracted from Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*), Dog Shark (*Scoliodon sorrakowah*), and Rohu (*Labeo rohita*), *Annals of Biological Research*, **4** (1):271-278.
- Hsiao, C.Y., Chou, C.H., Sun, H.W., dan Seah, J.N., 2004, Novel Collagen Production Method, *United States Patent Application Publication*, Patent Number 0253678 A1.
- Huang, C.Y., Wu, C.H., Yang, J.I., Li, Y.H., dan Kuo, J.M. 2013, Evaluation of Iron-binding Activity of Collagen Peptides Prepared from The Scales of Four Cultivated fishes in Taiwan, *Journal of Food and Drug Analysis*, **XXX**: 1-8.
- Ikoma¹, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., dan Mannb, S., 2003, Microstructure, Mechanical, and Biomimetic Properties of Fish Scales from *Pagrus major*, *Journal of Structural Biology*, **142**: 327-333.
- Ikoma², T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., dan Mannb, S. 2003. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*, *International Journal of Biological Macromolecules*, **32**: 199-204.
- Jongjareonrak, A., Benjakula, S., Visessanguanb, W., Prodpranc, T., dan Tanakad, M., 2005, Isolation and Characterisation of Acid and Pepsin-Solubilised Collagens from The Skin of Brownstripe Red Snapper (*Lutjanus vitta*), *Food Chemistry*, **93**: 475-484.
- Jongjareonrak, A., Benjakula, S., Visessanguanb, W., Prodpranc, T., dan Tanakad, M., 2006, Characterization of Edible Films from Skin Gelatin of Brownstripe Red Snapper and Bigeye Snapper. *Food Hydrocolloids*, **20**: 492-501.
- Kaur, I.P., dan Agrawal, R., 2007, Nanotechnology: A New Paradigm in Cosmeceuticals, *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*, **1**: 171-182.
- Kim, S.K., Ravichandran, Y.D., Khan, S.B., dan Kim, Y.D., 2008, Prospective of the Cosmeceuticals Derived from Marine Organisms, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **13**: 511-523.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., dan Tanaka, M., 2005, Characterisation of Acid-Soluble Collagen From Skin and Bone of Bigeye Snapper (*Priacanthus tayenus*), *Food Chemistry*, **89**: 363-372.
- Kumar, M. H., Spandana, V., dan Poonam, T., 2011, Extraction dan Determination of Collagen Peptide and Its Clinical Importance From Tilapia Fish Scales (*Oreochromis niloticus*), *International Research Journal of Pharmacy*, **2** (10): 97-99.
- Lee, H. Y., Ghimeray, A.K., Yim, J.H., dan Chang, M.S., 2015, Antioxidant, Collagen Synthesis Activity *in Vitro* and Clinical Test on Anti-Wrinkle Activity of Formulated Cream Containing *Veronica officinalis* Extract, *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, **5**: 45-51.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., dan Darnell J., 2000, *Molecular Cell Biology*, 4th Edition. New York: W. H. Freeman.
- Lohani, A., Verma, A., Joshi, H., Yadav, N., dan Karki, N., 2014, Nanotechnology-Based Cosmeceuticals, *Hindawi Publishing Corporation ISRN Dermatology*, Article ID 843687.
- Mahboob, S., 2015, Isolation and Characterization of Collagen From Fish Waste Material- Skin, Scales and Fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*, *Journal of Food Science and Technology*, **52** (7): 4296-4305.
- Massod, Z., Yasmeen, R., Haider, M.S., Tarar, O. M., Zehra, L., dan Hossain, M. Y., 2015, Evaluation of Crude Portein and Amino Acid Contents From The Scales of Four Mullet Species (Mugilidae) Collected From Karachi Fish Harbour, Pakistan, *Indian Journal of Geo-Marine Science*, **44** (5): 1-9.
- Muralidharan, N., Shakila, R.J., Sukumar, D., dan Jeyasekaram, G., 2013, Skin, Bone and Muscle Collagen Extraction From The Trash Fish, Leather

- Jacket (*Odonus niger*) and Their Characterization, *Journal of Food Sciences and Technology*, **50** (6): 1106-1113.
- Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., dan Duodu, K.G., 2004, Characterization of Acid Soluble Collagen from Skins of Young and Adult Nile Perch (*Lates niloticus*), *Food Chemistry*, **85**: 81-89.
- Nagai, T., Izumi, M., dan Ishii, M., 2004, Fish Scale Collagen: Preparation and Partial Characterization, *International Journal of Food Science and Technology*, **39** (3): 239-244.
- Nurhayati, Tazwir, dan Murniyati, 2013, Ekstraksi dan Karakterisasi Kolagen Larut Asam dari Kulit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*), *JPB Kelautan dan Perikanan*, **8** (1): 85-92.
- Pallela, R., Young, Y. N., dan Kim, S. K., 2010, Anti-photoaging and Photoprotective Compounds Derived from Marine Organisms, *Marine Drugs*, **8**: 1189-1202.
- Pallela, R., Janapala, V.R., Shim, Y. B., dan Kim, S. K., 2015, Biomedical Implication of Type I Collagen: A Marine Perspective, *Research Gate*, <http://www.researchgate.net/publication/236131239>, 1-12.
- Pang, S., Chang, Y.P., dan Woo, K.K., 2013, The Evaluation of the Suitability of Fish Wastes as a Source of Collagen, *2nd International Conference on Nutrition and Food Sciences*, **53**: 77-81.
- Papi, M., Palmieri, V., Maulucci, G., Arcovito, G., Greco, E., Quintiliani, G., et al., 2011, Controlled Self Assembly of Collagen Nanoparticle, *Journal of Nanoparticle Research*, Springer, 1-7.
- Rosmilah, M., Shahnaz, M., Masita, A., Noormalin, A., dan Jamaludin, M., 2005, Identification of Major Allergens of Two Species of Local Snappers: *Lutjanus argentimaculatus* (Merah/ Red Snapper) and *Lutjanus johnii* (Jenahak/ Golden Snapper), *Tropical Biomedicine*, **22** (2): 171-177.
- Sadowska, M., Kolodziejska, I., dan Niecikowska, C., 2003, Isolation of Collagen From The Skins of Baltic cod (*Gadus morhua*), *Food Chemistry*, **81**: 257-262.
- Saghari, S. dan Baumann, L., 2009, Chapter 19: Wrinkled Skin dalam Baumann, L. *Cosmetic Dermatology Principle and Practice*, 2nd Edition, New York: Mc Graw Hill.
- Sankar, S., Sekar, S., Mohan, R., Rani, S., Sundaraseelan, J., dan Sastry, T.P., 2007, Preparation and Partial Characterization of Collagen Sheet from Fish (*Lates calcarifer*) Scales, *International Journal of Biological Macromolecules*, **42**: 6-9.
- Shahiri, H.T., Maghsoudlou, Y., Motamedzadegan, A., Sadeghi, A. R. M., dan Rostamzad, H., 2012, Study on Some Properties of Acid-Soluble Collagens Isolated from Fish Skin and Bones of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*), *International Food Research Journal*, **19** (1): 251-257.
- Sharma, B. dan Sharma, A., 2012, Future Prospect of Nanotechnology in Development of Anti-Ageing Formulations, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4** (3): 57-66.
- Shoulders, M.D. dan Raines, R.T., 2009, Collagen Structure and Stability, *Annual Review of Biochemistry*, **78**: 929-958.
- Singh¹, O., Gupta, S.S., Soni, M., Moses, S., Shukla, S., dan Mathur, R.K., 2011, Collagen Dressing Versus Conventional Dressings in Burn and Chronic Wounds: A Retrospective Study, *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, **4** (1): 12-16.
- Singh², P., Benjakul, S., Maqsood, S., dan Kishimura, H., 2011, Isolation and Characterization of Collagen Extracted from The Skin of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), *Food Chemistry*, **124** (1): 97-105.
- Triyono, B., 2005, Perbedaan Tampilan Kolagen di Sekitar Luka Insisi pada Tikus Wistar yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupikain dan yang Tidak Diberi Levobupikain, *Thesis*, Semarang: Universitas Diponegoro.
- Tsai, T.C., dan Hantash, B.M., 2008, Cosmeceutical Agents: A Comprehensive Review of the Literature, *Clinical Medicine: Dermatology*, **1**: 1-20.
- Walters, H.A. dan Roberts, M.S., 2008, *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches*, New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- Wang, B., Wang, Y. M., Chi, C.F., Luo, H. Y., Deng, S.G., dan Ma, J.Y., 2013, Isolation and Characterization of Collagen and Antioxidant Collagen Peptides from Scales of Croceine Croaker (*Pseudosciaena crocea*), *Marine Drugs*, **11**: 4641-4661.
- Wanjari, N. dan Waghmare, J., 2015, A Review on Latest Trend of Cosmetics-Cosmeceuticals, *International Journal of Pharma Research & Review*, **4** (5): 45-51.
- Yamamoto, K., Igawa, K., Sugimoto, K., Yoshizawa, Y., Yanagiguchi, K., Ikeda, T., Yamada, S., dan Hayashi, Y., 2014, Biological Safety of Fish (Tilapia) Collagen, *Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International*, Article ID 630757, 9 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/630757>.
- Yan, M. Y., Li, B.F., Zhao, X., Ren, G.Y., Zhuang, Y.L., Hou, H., Zhang, X.K., Chen, L., dan Fan. Y., 2008, Characterization of Acid-Soluble Collagen From The Skin of Walleye pollock (*Theragra chalcogramma*), *Food Chemistry*, **107**: 1581-1586.
- Yunoki, S., Suzuki, T., dan Takai, M., 2003, Stabilization of Low Denaturation Temperature Collagen From Fish by Physical Cross-Linking Methods, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96** (6): 575-577.
- Zhu, D., Ortega, C.F., Motamedi, R., Szewciw, L., Vernerey, F., dan Barthelat, F., 2011, Structure and Mechanical Performance of a "Modern" Fish Scale, *Advanced Engineering Materials*, **13** (XX): B1-B10