

PENGARUH IRADIASI GAMMA PADA SIFAT FISIKO-KIMIA KOLAGEN DALAM LARUTAN

Erizal¹, Basril Abbas¹, R. Setyo A.K.¹, Sulistioso G.S.² dan Sudirman²

¹Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi (PATIR) - Badan Tenaga Nuklir Nasional
Jl. Lebak Bulus Raya No.49, Jakarta 12440

²Pusat Sains dan Teknologi Bahan Maju (PSTBM) - Badan Tenaga Nuklir Nasional
Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan

Diterima: 6 Januari 2014

Diperbaiki: 27 Maret 2014

Disetujui: 30 Mei 2014

ABSTRAK

PENGARUH IRADIASI GAMMA PADA SIFAT FISIKO-KIMIA KOLAGEN DALAM LARUTAN.

Kolagen merupakan salah satu bahan biomaterial yang penting di industri, namun seringkali mudah dikontaminasi oleh bakteri. Iradiasi gamma merupakan salah satu metode yang paling baik untuk mencegah kontaminasi bakteri dari bahan biomaterial. Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh iradiasi gamma terhadap perubahan sifat fisiko-kimia kolagen. Larutan kolagen (10% b/v) diiradiasi menggunakan sinar gamma dari kobalt-60 secara berturut-turut pada dosis 0,10 kGy, 20 kGy, 30 kGy, 40 kGy, dan 50 kGy (laju dosis 5 kGy/jam). Perubahan konsentrasi larutan kolagen dipelajari menggunakan Spektrofotometer *Ultra Violet-Visible (UV-Vis)* dan viskositas larutan kolagen diukur menggunakan viskosimeter. Spektrofotometer *Fourier Transform-Infra Red (FT-IR)* digunakan untuk karakterisasi larutan kolagen. Hasil evaluasi menunjukkan bahwa pada kondisi optimum (30 kGy) konsentrasi larutan kolagen meningkat dan viskositasnya menurun serta terjadi pergeseran bilangan gelombang amida II yang relatif besar pada kisaran 10 bilangan gelombang (1544 cm⁻¹ hingga 1554 cm⁻¹) pada spektrum *FT-IR*. Dapat disimpulkan bahwa iradiasi gamma dapat mempengaruhi struktur molekul kolagen.

Kata kunci : Kolagen, Viskositas, Iradiasi Gamma, Kobalt-60, Fisiko-kimia

ABSTRACT

EFFECT OF GAMMA IRRADIATION TO PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF COLLAGEN IN SOLUTION.

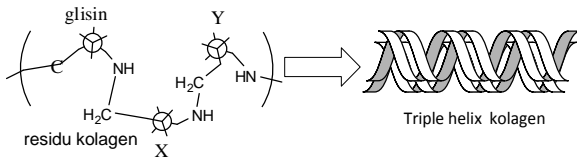
Collagen is one of the important biomaterials in industry, however it is commonly contaminated by bacteria. Exposure to gamma ray radiation is a superior method used to prevent bacterial contamination of biomaterial products. The aim of this research is to study the effect gamma irradiation on the physico-chemical of collagen in solution. The collagen solution (10%, w/v) were irradiated using gamma rays from cobalt-60 at doses of 0,10 kGy, 20 kGy, 30 kGy, 40 kGy, and 50 kGy (dose rate of 5 kGy/h). The collagen solution concentration changes were measured using Ultra Violet-Visible (UV-Vis) Spectrophotometer, and viscosity collagen were measured using viscosimeter and chemical changes of collagen were characterized using Fourier Transform-Infra Red (FT-IR) Spectrophotometer. It was found that at optimum conditions (30 kGy), the concentration of collagen solution increase and its viscosity decrease, and there was a pronounce shift of the amide II band of the order approximately 10 wavenumber (1544-1554) cm⁻¹. It can be concluded, that gamma radiation can influence the molecular structure of collagen.

Keywords : Collagen, Viscosity, Irradiation, Gamma Irradiation, Cobalt-60, Physico-chemical

PENDAHULUAN

Kolagen adalah salah satu jenis protein komponen utama dari kulit dan *connective tissue* (jaringan penghubung) pada organisme yang terdiri dari rantai α -3- polipeptida terikat satu dengan lainnya dalam bentuk stuktur batang *helix* [1,2]. Setiap molekul kolagen panjangnya 300 nm, diameter 1,5 nm disertai berat molekul

sekitar 300.000 dalton. Residu asam amino dalam setiap rangkaiannya sangat spesifik misalnya glisin (Gly) terdapat pada setiap ujung ketiga bagian residu kolagen dalam rantai berulang Gly-X-Y (Gambar 1) masing-masing adalah prolin (X) dan asam imino hidroksi prolin (Y) dengan tingkat probabilitas yang tinggi.



Gambar 1. Struktur residu dan triple helix kolagen

Melalui proses biologis residu kolagen ini berubah menjadi kolagen berbentuk *triple helix*. Struktur molekul kolagen distabilkan oleh jumlah total ikatan intra dan antar ikatan hidrogen gugus $-NH$ glisin dan karbonil $C=O$ residu dari polipeptida lainnya atau dengan jembatan hidrogen dengan molekul air.

Kolagen merupakan salah satu senyawa protein potensial yang pada saat ini penggunaannya berkembang dengan pesat di industri makanan, kosmetika dan biomaterial [3-5]. Salah satu kelemahan dari kolagen pada aplikasinya adalah struktur molekulnya relatif besar menyebabkannya sukar diserap oleh kulit serta sukar larut dalam air. Untuk mengatasi hal tersebut, pada umumnya kolagen didegradasi menggunakan enzim yang relatif mahal dengan perlakuan khusus [6,7]. Oleh karena itu, untuk mengatasi hal tersebut kolagen selayaknya dapat didegradasi menggunakan iradiasi gamma.

Iradiasi gamma dan berkas elektron merupakan *tool* (alat) yang paling populer dimanfaatkan untuk sterilisasi di bidang kesehatan, pengawetan makanan dan pasteurisasi tanaman obat [8-12]. Selain itu, kedua alat tersebut dapat dimanfaatkan untuk *surface coating* dan pembuatan *heat shrinkable cable* [13,14]. Kedua jenis sumber energi tersebut pada saat ini telah dimanfaatkan lebih jauh untuk proses ikatan silang dan degradasi monomer/polimer. Keunggulan radiasi gamma dan berkas elektron antara lain adalah prosesnya relatif cepat, tidak ada residu yang tersisa, dan dosis iradiasi dapat diatur sesuai keperluan.

Berdasarkan deskripsi hal-hal tersebut diatas, maka pada penelitian ini dilakukan iradiasi gamma pada larutan kolagen sekaligus sterilisasi secara simultan dalam kerangka merubah struktur kolagen dengan mempelajari perubahan sifat fisiko-kimianya. Larutan kolagen pada konsentrasi 10 % diiradiasi pada dosis 10 kGy, 20 kGy, 30 kGy, 40 kGy dan 50 kGy. Larutan hasil iradiasi dikarakterisasi perubahan kimianya menggunakan Spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red (FT-IR)*. Perubahan konsentrasi (absorbansi) diukur menggunakan Spektrofotometer *Ultra Violet-Visible (UV-Vis)* dan viskositasnya diukur menggunakan viskosimeter.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Kolagen yang digunakan adalah kolagen hasil ekstraksi sisik ikan kakap putih diperoleh dari Balai Besar

Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Sliipi, Departemen Kelautan, Jakarta Pusat. Asam asetat glacial buatan *Merck*. KBr buatan *Merck*. Bahan kimia lainnya kualitas pro analisis.

Alat

Alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red (FT-IR) Prestige 21* model 8400 S (*Shimadzu*, Jepang) digunakan untuk menganalisis perubahan struktur kimia kolagen. Spektrofotometer *Ultra Violet-Visible (UV-Vis) Genesys 2*, buatan Jerman digunakan untuk analisis serapan maksimum dari larutan kolagen. Viskosimeter, *Visconic*, Tokyo Keiki digunakan untuk menetapkan viskositas dari larutan kolagen. Sumber iradiasi gamma dari kobalt-60 yang dikalibrasi dengan dosimeter Fricke digunakan untuk iradiasi bahan.

Ekstraksi Kolagen dari Sisik Ikan

Sisik ikan yang diperoleh dari hasil samping industri perikanan, dicuci permukaannya dengan air mengalir hingga bersih. Kemudian sisik ikan direndam dalam larutan surfaktan selama 24 jam untuk menghilangkan lemak dan kotoran lainnya. Selanjutnya sisik ikan dalam larutan surfaktan dibersihkan kembali dengan menggoyangkannya menggunakan *shaker* horizontal dengan kecepatan 200 rpm selang waktu 1 jam. Perlakuan tersebut dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Kemudian sisik ikan dicuci dengan air suling untuk menghilangkan surfaktan dan dikeringkan dalam *oven* pada suhu 60 °C. Sisik ikan selanjutnya direndam dalam larutan asam asetat 0,5 M pada suhu 4 °C dalam waktu 48 jam. Kemudian edapan hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas *whatman* 42 dan dikeringkan pada suhu kamar.

Iradiasi Larutan Kolagen

Sebanyak ± 10 gr kolagen hasil ekstraksi dilarutkan dalam larutan asam asetat 0,5 M. Selanjutnya dikemas dalam kantong plastik polipropilen (PP) dan diiradiasi menggunakan sinar gamma pada dosis 10 kGy, 20 kGy, 30 kGy, 40 kGy dan 50 kGy (laju dosis 5 kGy/jam). Larutan kolagen hasil iradiasi diuji perubahan sifat fisiko-kimianya.

Pengujian Serapan Maksimum Larutan Kolagen Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 5 mL larutan kolagen hasil iradiasi dimasukkan ke dalam kuvet, lalu diukur absorbannya pada panjang gelombang maksimum.

Pengukuran Perubahan Kimia Kolagen Menggunakan Spektrofotometer FT-IR

Spektrum FT-IR kolagen hasil iradiasi dan kontrol (0 kGy) diukur menggunakan FT-IR Spectrophotometer Shimadzu Prestige-21 dengan teknik Attenuated Total Reflectance (ATR) pada rentang bilangan gelombang 750 cm⁻¹ hingga 4000 cm⁻¹. Cuplikan sampel dalam larutan diletakkan pada permukaan kristal ATR. Kemudian spektrum FT-IR diukur pada resolusi 2 cm⁻¹ dan kecepatan scanning 20 scan/detik. Spektrum larutan asam asetat digunakan untuk mengekstraksi spektrum kolagen dari spektrum larutan kolagen.

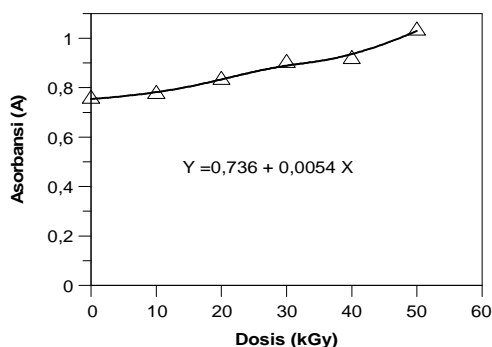
Pengukuran Viskositas Larutan Kolagen

Larutan kolagen (5mL) dengan konsentrasi 10 % (b/v) hasil iradiasi dan kontrol dimasukkan ke dalam cawan stasioner dari viscosimeter. Kemudian larutan diputar dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 25 °C. Setelah 5 menit perputaran, viskositas larutan dicatat. Setiap pengujian viskositas larutan dilakukan 5 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Serapan Maksimum Spektra UV-Vis Larutan Kolagen Hasil Iradiasi

Pengaruh dosis iradiasi gamma pada rentang dosis iradiasi 10-50 kGy terhadap nilai absorbansi maksimum kolagen dalam larutan disajikan pada Gambar 2. Terlihat bahwa absorbansi kolagen terjadi pada rentang 200-250 nm dengan absorbansi maksimum pada 237 nm. Namun demikian tidak terjadi absorbansi maksimum pada rentang 250-290 nm yang menunjukkan tidak adanya struktur aromatis dari tyrosine dan phenil alanin. Hal ini mengindikasikan bahwa sisik ikan mengandung kolagen [14]. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Li dkk [15] serta Zhang dkk [16] yaitu kolagen yang diperoleh dari ikan lele (*catfish*) absorbansi maksimumnya disekitar 232 nm dan kolagen sisik ikan gurame (*carp fish*) pada



Gambar 2. Pengaruh dosis iradiasi terhadap absorbansi larutan kolagen diukur menggunakan UV-Vis spektrofotometer

absorbansi maksimum 230 nm. Pada Gambar 2 terlihat bahwa dengan meningkatnya dosis iradiasi dari 0 kGy hingga 50 kGy, nilai absorbansi dari larutan kolagen meningkat dari 0,754 pada 0 kGy hingga 1.030 pada 50 kGy. Hal ini karena radiasi gamma mengakibatkan terjadinya transisi bentuk helik kolagen ke bentuk koil. Nilai absorbansi setelah iradiasi pada dosis 30 dan 40 relatif sama besar. Peneliti sebelumnya melaporkan bahwa pengaruh iradiasi hingga dosis 40 kGy pada larutan kolagen dengan konsentrasi 0,1 % hingga 10 % akan terjadi *partially crosslinked* dari kolagen [17]. Hal ini mengindikasikan bahwa pada iradiasi dengan dosis ≥ 30 kGy, molekul kolagen secara sempurna mengalami perubahan bentuk konformasinya [18].

Pengaruh Iradiasi Terhadap Viskositas Intrinsik Larutan Kolagen

Perubahan viskositas intrinsik larutan kolagen terhadap pengaruh dosis iradiasi 0 kGy, 10 kGy, 20 kGy, 30 kGy, 40 kGy dan 50 kGy disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 3. Terlihat bahwa dengan meningkatnya dosis iradiasi hingga 50 kGy, viskositas intrinsik larutan kolagen menurun secara tidak signifikan sebagai fungsi linier dosis iradiasi dari 1660 cPs pada dosis 0 kGy menjadi 1650 cPs pada dosis 50 kGy yang hubungan matematisnya dapat dituliskan dengan Persamaan (1).

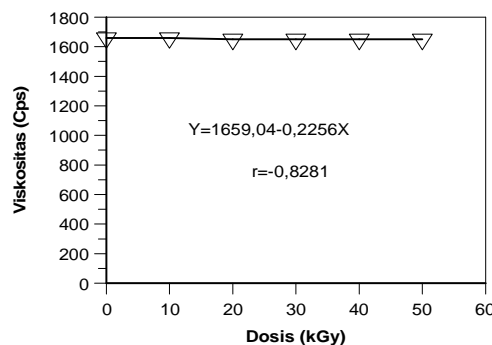
$$Y = 1659,04 - 0,225 X \quad (r = 0,828) \quad \dots\dots\dots (1)$$

Dimana :

- Y = Viskositas intrinsik larutan kolagen (cP)
- X = Dosis iradiasi (kGy)
- r = Regresi linier

Tabel 1. Viskositas larutan kolagen hasil iradiasi 10 hingga 50 kGy

Dosis iradiasi (kGy)	Viskositas rerata larutan kolagen* (cPs)
0	1660
10	1660
20	1650
30	1650
40	1650
50	1650



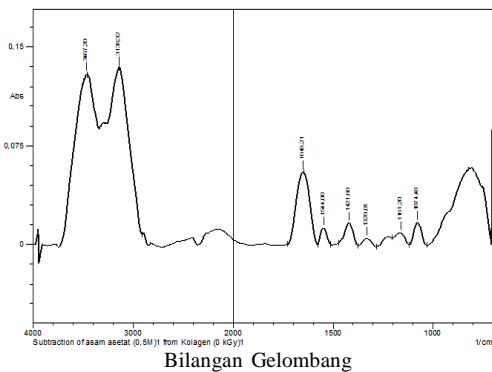
Gambar 3. Hubungan viskositas larutan kolagen terhadap dosis iradiasi

Viskositas intrinsik (η) mencerminkan besar-kecilnya lilitan (*entanglement*) rantai pada polimer dalam larutan [19]. Oleh karena itu, viskositas intrinsik η sangat berkaitan erat dengan berat molekul rata-rata dari polimer. Yu dkk [17] melaporkan bahwa pengaruh iradiasi hingga dosis 40 kGy pada larutan kolagen dengan konsentrasi 0,1 % hingga 10 % akan terjadi *partially crosslinked* dari kolagen. Hal tersebut diperkuat oleh Barley [20] yang melaporkan bahwa iradiasi pada dosis > 30 krad pada larutan kolagen menyebabkan terjadinya *intermoleculer crosslinking* pada kolagen. Hal ini mungkin yang menyebabkan tidak terjadinya perubahan yang signifikan pada viskositas larutan kolagen yang diiradiasi hingga 50 kGy.

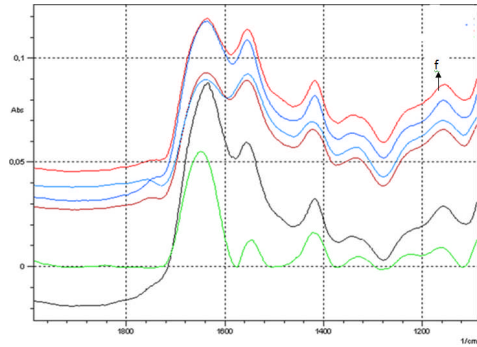
Spektrum FT-IR Kolagen

Spektrum FT-IR kolagen sisik ikan tanpa perlakuan iradiasi (0 kGy) disajikan pada Gambar 4. Terlihat bahwa spektrum puncak gugus amida A yang melebar merupakan vibrasi tekuk gugus NH- yang terletak pada rentang bilangan gelombang 3350 cm^{-1} hingga 3550 cm^{-1} dengan serapan maksimum pada bilangan gelombang 3457 cm^{-1} . Posisi ini juga disebabkan oleh adanya komponen gugus OH, yang mengkonfirmasi partisipasi aktif molekul air pada kolagen. Gugus amida B terletak pada rentang bilangan gelombang 3070 cm^{-1} hingga 3250 cm^{-1} dengan serapan maksimum pada bilangan gelombang 3138 cm^{-1} . Pita amida I terdapat pada rentang bilangan gelombang 1600 cm^{-1} hingga 1700 cm^{-1} dengan serapan maksimum disekitar bilangan gelombang 1650 cm^{-1} . Puncak ini dihasilkan dari ikatan peptida vibrasi gugus C=O tekuk. Gugus tersebut dapat digunakan untuk analisis perubahan sekunder yang terjadi pada senyawa polipeptida [18]. Pita amida II dengan serapan maksimum pada bilangan gelombang 1544 cm^{-1} berkaitan erat dengan gugus CNH. Posisi pita tersebut mengalami pergeseran dengan meningkatnya dosis iradiasi ke bilangan gelombang yang lebih tinggi.

Metreveli dkk. [18] melaporkan bahwa untuk menganalisis perubahan yang terjadi pada molekul kolagen dari spektrum FT-IR dapat dilakukan dengan menguji perubahan yang terjadi pada gugus amida I dan



Gambar 4. Spektrum FT-IR kolagen kontrol (0 kGy)



Gambar 5. Spektra FT-IR gugus amida I dan amida II kolagen hasil iradiasi: (a). 0 kGy, (b). 10 kGy, (c). 20 kGy, (d). 30 kGy, (e). 40 kGy dan (f). 50 kGy

Tabel 2. Posisi bilangan gelombang (cm^{-1}) gugus amida I dan amida II kolagen hasil iradiasi

Gugus fungsi	Dosis iradiasi (kGy)					
	0	10	20	30	40	50
Amida I	1645	1634	1637	1640	1638	1637
Amida II	1544	1554	1554	1556	1552	1556

amida II. Spektrum gugus amida I dan II kolagen hasil iradiasi 0 kGy, 10 kGy, 20 kGy, 30 kGy, 40 kGy dan 50 kGy disajikan pada Gambar 5 dan data spektrum bilangan gelombang disajikan pada Tabel 2. Terlihat bahwa dengan meningkatnya dosis iradiasi dari 0 kGy hingga 50 kGy, posisi bilangan gelombang amida II bergeser ke bilangan gelombang yang lebih tinggi dengan pergeseran sekitar 10 cm^{-1} . Sedangkan letak posisi serta intensitas gugus amida I mengalami pergeseran ke bilangan gelombang yang lebih rendah. Pergeseran bilangan gelombang gugus amida I ke bilangan gelombang yang lebih tinggi (1556 cm^{-1}) pada hakikatnya adalah mendekati posisi letak gugus amida I dari gelatin (1570 cm^{-1}) [21]. Hal ini mengindikasikan bahwa dengan meningkatnya dosis iradiasi hingga 50 kGy, kolagen dalam larutan asam asetat mengalami reaksi denaturasi. Sedangkan terjadinya perubahan pada posisi letak gugus amida I dengan meningkatnya dosis iradiasi, hal ini berkaitan dengan terjadinya ikatan silang selama proses denaturasi [18]

KESIMPULAN

Iradiasi gamma dapat merubah struktur molekul kolagen. Meningkatnya dosis iradiasi hingga 50 kGy, menyebabkan absorpsi larutan kolagen meningkat dan viskositas larutannya relatif menurun. Selain itu, dalam spektrum ATR/FTIR terjadi pergeseran gugus amida II pada daerah bilangan gelombang 1544 cm^{-1} hingga 1556 cm^{-1} .

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada rekan-rekan di fasilitas Iradiator Karet (IRKA) bidang

Fasilitas radiasi, PATIR-BATAN yang telah membantu iradiasi sampel. Ucapan yang sama disampaikan kepada Ibu Dian Iramani yang telah membantu pengujian viskositas larutan kolagen dalam penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- [1]. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*. New York : Garland Press, 1994.
- [2]. D.A.D. Parry, A.S. Draig, In : *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix (Eds. A.Ruggery, P.M. Motta)*. Boston : Martinus Nijhoff Publishers, 1984.
- [3]. G.Lazovic, M. Colic, M. Grubor, M. Jovanovic. "The Application of Collagen Sheet in Open Wound Healing". *Ann Burns Fire Disasters*, Vol. 30, pp. 151–156, Sep. 2005.
- [4]. C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee. "Biomedical applications of collagen". *Int J Pharm*. Vol. 221, pp. 1-22, 2001.
- [5]. Y. Liu, L. Ren, L.L. Kai, L. Wang, Y. Wang. "Preparation and characterization of a novel tobramycin-containing antibacterial collagen film for corneal tissue engineering". *Acta Biomaterialia*, 10 (2014), 289-299.
- [6]. V.D. Marielle, H.P. Hendri, K. Roel, R.J.V.D. Worp, J.M.M. Hooymans, I.L. Leonoor. "Invest. Ophthalmol". *Vis. Sci.*, Vol. 10, pp. 4552-4560, 2009.
- [7]. S. Pitchaivelu, C.L. Tau, D.C. Anthony, L. Andrew. "Enzymatic hydrolysis of bovine hide and recovery of collagen hydrolysate in aqueous two-phase systems". *Separation and Purification Technology*, Vol. 89, pp. 282-287, 2012.
- [8]. P. Siddhuraju, H.P.S. Makkar, K. Becker. "The effect of ionising radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food". *Food Chemistry*, Vol. 78, pp. 187-205, Aug. 2002.
- [9]. M. Lacroix, B. Ouattara. "Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products-a review." *Food Research International*, Vol. 33, pp. 719-724, 2000.
- [10]. M.L. Botelho, S.C. Verde, L. Alves, A. Belchior, J. Reymao, S. Trabulo, M.M. Gaspar, M.E.M. Cruz, S. Simoes. "Radiation sterilization of antibiotic liposome formulations: A case study". *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 76, pp.1542-1546. Aug-sep, 2007.
- [11]. Y.S.Soliman, W.B. Beshir, A.A. Abdel-Fattah, F. Abdel-Rehim. "Dosimetric studies for gamma radiation validation of medical devices". *Applied Radiation and Isotopes*, Vol.7, pp. 121-28, Jan. 2013.
- [12]. S.B. Della, K. Saeki, F. Joan, HILTON, W. Grayson, Marshall, J. M. Sally. "Effect of sterilization by gamma radiation on nano-mechanical properties of teeth". *Dental Materials*, Vol. 24, pp. 1137-1140, Aug. 2008.
- [13]. R. Zenker, G. Sacher, A. Buchwalder, J. Liebich, A. Reiter, R. Habler. "Hybrid technology hard coating – Electron beam surface hardening". *Surface and Coatings Technology*, Vol. 202, pp. 804-808. Dec. 2007.
- [14]. V. Kumar, Y. K. Bhardway, S. Sabarwal. "Hybrid technology hard coating Coating characteristics of electron beam cured bisphenol A diglycidyl ether diacrylate resin containing 1,6-hexanediol diacrylate on wood surface – Electron beam surface hardening". *Progress in Organic Coatings*, Vol.55, pp. 316-323, Apr. 2006.
- [15]. H.Y. Liu, D. Li, S.D. Guou. "Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)". *Food Chemistry*, Vol. 101, pp. 621-625, 2007.
- [16]. F. Zhang, A. Wang, Z. Li, S. He, L. Shan, *Food and Nutrition Sciences*, Vol. 2, pp. 818-823, 2011.
- [17]. J.C. yu, S.R. Yeo, T.H. KIM, D.S. SHU, C.H. CHANG "Radiation crosslinked collagen gel, and Preparation method and usage method thereof". Patent 20130287748, 2013.
- [18]. N.O. Metreveli, K.K. Jariashvili, L.O. Namicheishvili, D.V. Svintradze, E.N. Chikvaidze, A. Sionkowska, J. Skopinska, *Nano Studies*, Vol. 2, pp. 53-64, 2010.
- [19]. H.L. Wagner. "The Mark–Houwink–Sakurada Equation for the Viscosity of Linear Polyethylene". *J. Phys. Chem.*, Vol. 14, pp. 611-617, 1985.
- [20]. A.J. Bailey. "Irradiation-Induced Changes in the Denaturation Temperature and Intermolecular Cross-Linking of Tropocollagen". *Radiation Research*, Vol. 31, pp. 206-214, jun. 1967.
- [21]. D.P. Perkasa, Erizal, Darmawan, A. Rasyid, *Indonesian Journal of Chemistry*, Vol. 13 pp. 1411-9420, 2013.