

Karakteristik dan Uji Aktivitas Antiosidan Ekstrak Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa sp.*)

Ainur Ridha^{a, 1}, Yulistia Budianti Soemarie^{a, 2}, Nily Su'aida^{a, 3*}

^a Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Islam Kalimantan Muhammad Arsyad Al-Banjari, Banjarmasin, Indonesia

¹ainurrida.app2003@gmail.com, ²yulistiaab@gmail.com, ³naily.suaida@gmail.com*

*naily.suaida@gmail.com

Kata kunci:

Antioksidan;
Sisik Ikan Gabus;
DPPH

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi kolagen dari sisik ikan gabus (*Channa sp.*) dan mengevaluasi aktivitas antioksidan dari ekstrak kolagen yang dihasilkan. Kolagen diisolasi menggunakan metode asam asetat 0,5 M dengan prosedur ekstraksi yang melibatkan pelarutan dan pemurnian. Karakterisasi ekstrak kolagen dilakukan menggunakan analisis FTIR untuk mendeteksi gugus fungsional yang ada, serta uji fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa aktif. Aktivitas antioksidan diuji dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) untuk mengukur potensi penangkal radikal bebas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kolagen sisik ikan gabus mengandung senyawa bioaktif dengan aktivitas antioksidan yang signifikan. Nilai IC₅₀ ekstrak kolagen menunjukkan kemampuan yang baik dalam menangkal radikal bebas, dengan potensi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Berdasarkan hasil analisis FTIR ekstrak kolagen *Channa sp.*, terdeteksi gugus hidroksil (3330,21 cm⁻¹), gugus metil (2111,83 cm⁻¹), dan gugus karbonil (1635,85 cm⁻¹) sebagai karakteristik fitokimia ekstrak kolagen *Channa sp.* Hasil penelitian ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ ekstrak kolagen *Channa sp.* pada konsentrasi 25% 2,558 ppm (sangat kuat), konsentrasi 50% 17,333 ppm (kuat), dan konsentrasi 75% 59,278 ppm (sedang). Aktivitas antioksidan ekstrak sisik ikan gabus tergolong sangat kuat pada konsentrasi rendah, tetapi menurun seiring peningkatan konsentrasi.

Key word:

Antioxidant;
snakehead fish scales;
DPPH

ABSTRACT

Abstract

This study aims to isolate collagen from the scales of snakehead fish (*Channa sp.*) and evaluate the antioxidant activity of the extracted collagen. Collagen was isolated using a 0.5 M acetic acid method, involving dissolution and purification procedures. The collagen extract was characterized using FTIR analysis to detect functional groups and phytochemical tests to identify active compounds. Antioxidant activity was assessed using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method to measure free radical scavenging potential. The results indicated that the collagen extract from snakehead fish scales contains bioactive compounds with significant antioxidant activity. The IC₅₀ values demonstrated a strong ability to neutralize free radicals, showing higher potency than the control. FTIR analysis detected hydroxyl (3330.21 cm⁻¹), methyl (2111.83 cm⁻¹), and carbonyl (1635.85 cm⁻¹) groups as characteristic phytochemical components of *Channa sp.* collagen extract. The IC₅₀ values at different concentrations were classified as very strong at low concentrations (25%), strong at moderate concentrations (50%), and moderate at higher concentrations (75%). The antioxidant activity of snakehead fish scale extract was very strong at lower concentrations but decreased as the concentration increased.

Pendahuluan

Ikan gabus (*Channa sp.*) adalah ikan air tawar yang banyak ditemukan di perairan Indonesia, terutama di wilayah Kalimantan dan Sumatra. Selain dikenal sebagai sumber protein yang tinggi, sisik ikan gabus juga memiliki manfaat lain yang penting, yaitu sebagai sumber kolagen. Kolagen adalah protein utama dalam jaringan ikat tubuh yang berperan penting dalam menjaga kekuatan, elastisitas, dan integritas kulit, tendon, tulang, serta pembuluh darah. Kolagen ikan gabus memiliki keuntungan sebagai bahan baku kosmetik dan farmasi karena sifatnya yang biokompatibel (cocok dengan tubuh manusia) dan dapat terurai secara alami (*biodegradable*) (Goh *et al.*, 2016). Pada berbagai penelitian, ekstrak kolagen dari ikan gabus terbukti memiliki berbagai manfaat, termasuk mempercepat proses penyembuhan luka, meningkatkan hidrasi kulit, serta menjaga elastisitas kulit (Setyowiranti & Darmaputra, 2023). Oleh karena itu, pemanfaatan kolagen ikan gabus dalam bidang kosmetik dan farmasi menjadi sangat menarik. Namun, sebelum digunakan dalam produk topikal, penting untuk mengkarakterisasi ekstrak kolagen tersebut untuk memastikan kualitas dan stabilitasnya. Karakterisasi ini mencakup uji pH, viskositas, dan suhu denaturasi kolagen.

Uji pH merupakan salah satu parameter penting dalam menentukan kestabilan dan keamanan untuk formulasi sediaan dari ekstrak kolagen pada aplikasi topikal. pH yang tidak sesuai dapat merusak struktur kolagen dan mempengaruhi efektivitasnya. Kolagen dari sisik ikan gabus harus berada pada pH yang sesuai dengan kondisi kulit manusia, yaitu sekitar 4.5–5.5, agar tidak menyebabkan iritasi (Budianto *et al.*, 2021). Selain itu, uji viskositas juga perlu dilakukan untuk mengevaluasi kekentalan ekstrak kolagen, karena viskositas yang sesuai mempengaruhi kelancaran aplikasi produk topikal. Sediaan yang terlalu kental dapat menyulitkan aplikasi, sementara yang terlalu cair dapat mengurangi efektivitas dan daya rekatnya pada kulit (Rahman *et al.*, 2019). Uji suhu denaturasi kolagen juga penting untuk menilai suhu kritis yang menyebabkan perubahan struktur protein kolagen, yang dapat mempengaruhi fungsinya. Kolagen yang stabil pada suhu tinggi lebih mudah diolah dalam formulasi produk yang membutuhkan proses pemanasan atau penyimpanan pada suhu tertentu (Liu *et al.*, 2018).

Selain karakterisasi ekstrak kolagen, aktivitas antioksidan juga menjadi parameter penting dalam pengembangan produk kosmetik dan farmasi. Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh berperan dalam proses penuaan kulit dan berbagai penyakit degeneratif, seperti kanker dan diabetes. Oleh karena itu, senyawa dengan aktivitas antioksidan yang kuat dibutuhkan untuk melindungi kulit dan tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas. Ekstrak kolagen ikan gabus diketahui mengandung senyawa bioaktif, seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin, yang dapat berfungsi sebagai agen antioksidan alami (Setyaningsih *et al.*, 2020).

Untuk mengukur aktivitas antioksidan, metode yang paling umum digunakan adalah uji DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Uji DPPH adalah salah satu metode spektrofotometri yang digunakan untuk menilai kemampuan senyawa dalam menangkal radikal bebas. DPPH merupakan senyawa stabil yang memiliki warna ungu, dan ketika berinteraksi dengan senyawa antioksidan, warna ini akan memudar. Penurunan absorbansi DPPH diukur pada panjang gelombang 512 nm, dan hasilnya dihitung dalam bentuk nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi senyawa yang diperlukan untuk mengurangi 50% radikal bebas DPPH. Nilai IC₅₀ yang lebih rendah menunjukkan kemampuan antioksidan yang lebih kuat (Yulistian *et al.*, 2021).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi kolagen dari sisik ikan gabus (*Channa sp.*), mengkarakterisasi ekstrak kolagen yang dihasilkan melalui uji pH, viskositas, dan suhu denaturasi, serta mengevaluasi aktivitas antioksidan dari ekstrak kolagen menggunakan metode DPPH. Harapannya hasil penelitian ini dapat memberikan informasi yang berguna mengenai potensi ekstrak kolagen sisik ikan gabus sebagai agen antioksidan alami dan aplikasinya dalam produk kosmetik dan farmasi. Kolagen dari sisik ikan gabus memiliki potensi besar untuk dikembangkan sebagai bahan aktif dalam produk perawatan kulit yang efektif dan aman.

Metode

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah , pipet tetes (*pyrex*®), blender (*panasonic*®), neraca analitik (*ACID AD-300i*®), mikro pipet (*dragonlab*®), gelas ukur (*pyrex*®), gelas beaker (*pyrex*®), spektrofotometer (*thermo scientific*®), grinder (*New Lab*®), . Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sisik ikan gabus, ethanol (*PT. Pandu Medikal*®), DPPH (*PT. Pandu Medikal*®), NaOH (*Merck*®), EDTA (*polylab*®), Aquades (*PT. Pandu Medikal*®), aluminium foil (*Merck*®), asam asetat (*Merck*®).

Pengumpulan Sisik Ikan Gabus

Sisik ikan gabus diperoleh dari pasar di Banjarbaru. Limbah sisik ikan gabus yang telah didapat dicuci kemudian dimasukkan ke freezer untuk mengurangi pertumbuhan mikroorganisme dan menjaga kesegaran sisik sebelum dilakukan proses ekstraksi. Setelah proses pembekuan, sisik ikan gabus dikeluarkan dari freezer dan dibiarkan pada suhu ruang agar tidak terlalu keras, lalu sisik dihaluskan dengan grinder untuk selanjutnya dilakukan isolasi kolagen (Issains *et al.*, 2019).

Pretreatment untuk menghilangkan lemak sisik ikan gabus

Tahapan ini dilakukan dekalsifikasi atau pelunakan kalsium. Tahapan dekalsifikasi dengan cara mencuci sisik ikan dengan aquadest. Selanjutnya dilakukan perendaman sisik ikan gabus dengan larutan NaOH 0,1 M (perbandingan 1:10 (b/v) selama 48 jam dengan suhu 4°C (Issains *et al.*, 2019). Selanjutnya dilakukan hidrolisis kolagen dengan larutan asam asetat.

Pemisahan Protein bukan Kolagen dari Sisik Ikan Gabus

Sisik ikan gabus hasil pemisahan protein non kolagen yang telah diperoleh, selanjutnya diekstraksi Asam asetat (CH_3COOH) 0,5 M 1:10 (b/v) selama 48 jam dengan suhu 4°C. Larutan mengandung kolagen difiltrasi dengan kertas saring *Whatman*, dan dihasilkan protein kolagen bewujud cair (Issains *et al.*, 2019). Tahapan selanjutnya adalah perhitungan rendemen, dan dihasilkan kolagen bewujud cair dalam bentuk ekstrak.

Hidrolisis kolagen Sisik Ikan Gabus dengan Larutan Asam Asetat

The snakehead fish scales, after separating the non-collagen proteins, are then extracted with a 0.5 M acetic acid (CH_3COOH) solution at a 1:10 (w/v) ratio for 48 hours at 4°C. The solution containing collagen is filtered through Whatman filter paper, yielding collagen protein in a liquid form (Issains *et al.*, 2019). The next step is to calculate the yield, resulting in collagen in a liquid form as an extract.

Uji Karakterisasi Ekstrak Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa sp*)

Uji pH

Kolagen ditambah akuades dengan rasio 1:100 (b/v) selanjutnya dihomogenisasi. Sampel diukur pH menggunakan pH meter hingga diperoleh nilai pH yang stabil. Menurut BSN (2014) nilai pH kolagen berkisar 6,5-8,0 (Chen *et al.*, 2021).

Uji Viskositas

Pengukuran viskositas menggunakan alat Viskometer *Brookfield*. Larutan asam asetat 0,5 M sebanyak 300 mL digunakan untuk melarutkan kolagen sisik ikan gabus dengan konsentrasi 0,3% (b/v). Larutan kolagen yang telah homogen sebanyak 250 mL diukur viskositasnya. Instrumen yang digunakan adalah viskometer *Brookfield* dengan spindle no.2 pada 100 rpm (Kharat *et al.*, 2021).

Uji Suhu Denaturasi

Penentuan titik leleh menggunakan prosedur analisis Martianingsih dan Atmajaya (2009). Instrumen *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) digunakan untuk analisis titik leleh, sehingga diketahui karakteristik termal dari kolagen yang dihasilkan. Sebanyak 0,005-0,01 g kolagen diletakkan dalam tempat berbahan aluminium, kemudian ditutup. Setelah itu alat DSC dikondisikan untuk memiliki kecepatan pemanasan 10°C/menit pada suhu 20°C-300°C (Gonfa *et al.*, 2023).

Uji FTIR

Analisis FTIR dilakukan dengan menguji secara kualitatif dan kuantitatif. Untuk uji kualitatif dengan cara menentukan gugus fungsi khas kolagen dengan menimbang 100 mg KBr dan 2 mg sampel dicampur. Untuk uji kuantitatif dengan melihat spectra pada FTIR dengan menunjukkan puncak serapan bilangan gelombang sampel (Kristoffersen *et al.*, 2023).

Hasil dan Pembahasan

Perhitungan Rendemen

Tabel 1. Perhitungan Rendemen Ekstrak Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa sp*)

Bobot serbuk (gram)	Bobot Ekstrak Cair (gram)	Rendemen (%)
900 gram	500 gram	55%

Rendemen yang dihasilkan pada penyerbukan ekstrak sisik ikan gabus (*Channa sp*) yaitu 55%. Rendemen ekstrak sisik ikan gabus pada penelitian ini memenuhi persyaratan rendemen ekstrak yaitu tidak kurang dari 10%. Semakin besar nilai rendemen yang didapatkan menunjukkan bahwa nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

Hasil Karakterisasi Ekstrak Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Chana sp*)

Uji pH

Tabel 2. Hasil Uji pH Ekstrak Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa sp*)

Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata ± SD
3,43	3,45	3,46	3,44 ± 0,017

Hasil pengujian pH pada ekstrak kolagen sisik ikan gabus yaitu 3,44 dengan konsentrasi asam asetat 0,5 M. Konsentrasi asam asetat menentukan nilai pH larutan sehingga mengatur tingkat kerapatan muatan kolagen yang mempengaruhi interaksi elektrostatis dan struktur kolagen dan menentukan tingkat kelarutan serta ekstraktibilitas kolagen dari jaringan sisik ikan (Ren *et al.*, 2023)(Ren *et al.*, 2023). Kenaikan konsentrasi asam asetat berbanding lurus dengan penurunan nilai pH, dimana semakin tinggi konsentrasi asam asetat maka nilai pH yang dihasilkan semakin rendah sedangkan semakin rendah konsentrasi asam asetat maka semakin tinggi nilai pH yang dihasilkan, pH kolagen pada setiap perlakuan mengalami penurunan nilai pH yang dihasilkan. Hasil ini sejalan dengan penelitian Blidi *et al.*, (2017) melakukan isolasi kolagen menggunakan asam asetat didapatkan hasil $pH > 3$ yang sesuai dengan pH kolagen komersial 3-5.

Uji Viskositas

Tabel 3. Hasil Uji Viskositas Ekstrak Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa sp*)

Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata ± SD
3,00 mPa	3,00 mPa	3,00 mPa	3,00 ± 0,008

Asam asetat 0,5 M sebagai pelarut memiliki viskositas yang relatif rendah (1–10 mPa.s). Hal ini sangat bermanfaat dalam proses ekstraksi karena pelarut dapat mengalir dengan mudah dan tidak menghambat ekstraksi bahan aktif. Jika viskositas ekstrak terlalu tinggi, maka proses ekstraksi dapat menjadi kurang efisien. Asam asetat 0,5 M adalah pelarut yang relatif encer karena konsentrasi asamnya hanya 0,5 M, yang berarti tidak akan memberikan viskositas yang sangat tinggi. Oleh karena itu, larutan ini umumnya memiliki viskositas rendah, biasanya dalam kisaran 1–10 mPa.s.

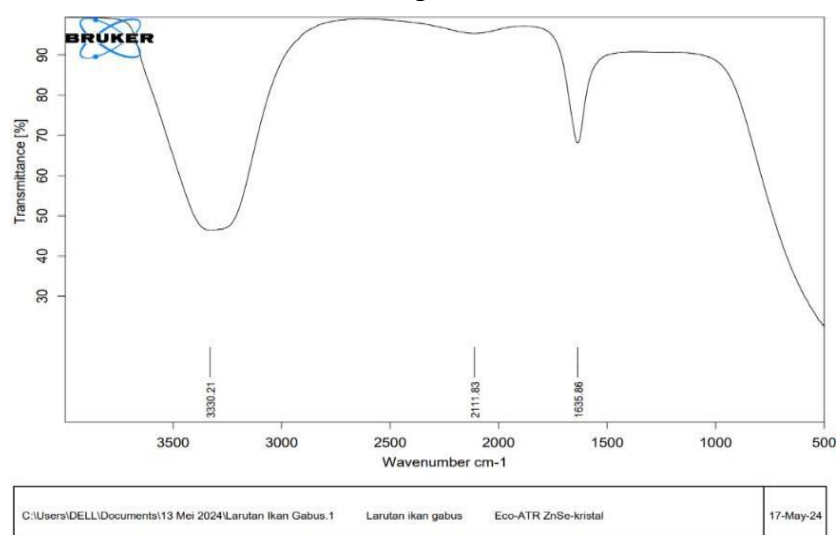
Uji Suhu Denaturasi

Tabel 4. Hasil Uji Suhu Denaturasi Ekstrak Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa sp*)

Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata ± SD
84°C	83°C	89°C	85 ± 2,62

Denaturasi protein pada perlakuan pH 3 menunjukkan bahwa kombinasi keasaman yaitu asam asetat dan suhu tinggi pada 80°C yang menyebabkan denaturasi cepat struktur kolagen dan akibatnya peningkatan kelarutan protein. Hidrolisat yang dihasilkan pada pH dan suhu yang berbeda menunjukkan sifat yang berbeda. Perlakuan pada suhu yang lebih tinggi dari denaturasi dan dalam kondisi asam menyebabkan pembentukan kandungan protein larut yang lebih tinggi dan berat molekul rata-rata yang lebih rendah, menghasilkan gel dengan sifat mekanik yang sangat baik pada jam pertama proses (Nikolaidis *et al.*, 2017). Perlakuan dalam pH asam menyebabkan perubahan yang paling relevan dalam karakteristik hidrolisat, bahkan pada suhu di dekat atau di bawah denaturasi. Oleh karena itu, untuk mendapatkan produk dengan kelarutan tinggi, penerapan suhu tinggi dan pH rendah diperlukan (Quevedo *et al.*, 2021)

Identifikasi Karakteristik Fitokimia Ekstrak Kolagen Ikan Gabus



Gambar 1. Hasil Kromatogram FTIR Ekstrak Kolagen Ikan Gabus

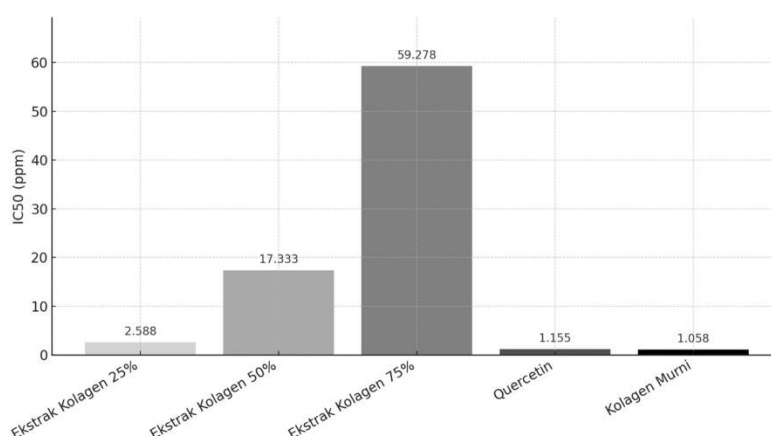
Kromatogram FTIR ekstrak kolagen ikan gabus menunjukkan 3 *peak* yang sesuai dengan kandungan senyawa dalam ekstrak. Senyawa diidentifikasi berdasarkan serapan gelombang (cm⁻¹). Berdasarkan **Gambar 1**, bilangan gelombang 3330,21 cm⁻¹ menunjukkan gugus hidroksil (3200–3600

cm^{-1}) dan bilangan gelombang $2111,83 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan gugus metil ($2110\text{--}2200 \text{ cm}^{-1}$) dalam kolagen ikan gabus (Marselia *et al.*, 2021). Hal ini menunjukkan bahwa struktur kimia spesifik dalam ekstrak kolagen berasal dari asam amino atau ikatan peptida tertentu. Pada bilangan gelombang $1635,85 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan peregangan gugus karbonil ($1630\text{--}1680 \text{ cm}^{-1}$) dari ikatan peptida dalam protein (Nuraini, 2024).

Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Kolagen Sisik Ikan Gabus (*Channa sp.*)

Tabel 5. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Kolagen Sisik Ikan Gabus

Sampel Uji	Nilai IC ₅₀	Keterangan
25%	$2,558 \pm 0,872$	Sangat Kuat
50%	$17,333 \pm 4,051$	Sangat Kuat
75%	$59,278 \pm 13,046$	Kuat
Kuersetin	$1,155 \pm 0,545$	Sangat Kuat
Kolagen Murni	$1,058 \pm 0,296$	Sangat Kuat



Gambar 2. Hasil Nilai IC₅₀ Ekstrak Sisik Ikan Gabus dan Pembanding

Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kolagen, nilai IC₅₀ justru meningkat, yang menunjukkan penurunan aktivitas antioksidan. Fenomena ini dapat dijelaskan oleh beberapa faktor ilmiah. Salah satu penyebabnya adalah agregasi molekul pada konsentrasi tinggi, di mana senyawa bioaktif seperti peptida atau polifenol saling berinteraksi sehingga mengurangi aksesibilitas gugus aktif yang berperan dalam menangkap radikal bebas (Li *et al.*, 2013). Selain itu, adanya interaksi antar-senyawa dalam ekstrak juga dapat menghasilkan efek antagonis, yang menyebabkan senyawa aktif menjadi kurang efektif dalam menangkalkan radikal bebas (Gulcin, 2020). Pada konsentrasi tinggi, beberapa senyawa antioksidan bahkan dapat bertindak sebagai pro-oksidan, yang berarti mereka justru memicu pembentukan radikal bebas baru melalui reaksi redoks berulang (Halliwell & Gutteridge, 2015). Faktor lain yang turut berkontribusi adalah kelarutan dan difusi senyawa, di mana pada konsentrasi tinggi, beberapa senyawa dalam ekstrak mungkin tidak larut sempurna, sehingga tidak dapat berinteraksi secara optimal dengan radikal bebas dalam uji DPPH (Prior *et al.*, 2005). Oleh karena itu, peningkatan konsentrasi ekstrak tidak selalu meningkatkan aktivitas antioksidan, melainkan dapat menurunkannya akibat faktor-faktor seperti agregasi molekul, interaksi antar-senyawa, efek pro-oksidan, dan keterbatasan kelarutan.

Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan penelitian ini, ekstrak kolagen dari sisik ikan gabus (*Channa sp.*) menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat pada konsentrasi rendah, tetapi efektivitasnya menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi. Analisis FTIR mengonfirmasi keberadaan gugus hidroksil, metil, dan karbonil sebagai karakteristik fitokimia ekstrak kolagen. Penurunan aktivitas antioksidan pada konsentrasi tinggi kemungkinan disebabkan oleh faktor seperti agregasi molekul, interaksi antar-senyawa, efek pro-oksidan, dan keterbatasan kelarutan senyawa dalam sistem uji. Untuk meningkatkan efektivitas antioksidan ekstrak kolagen pada konsentrasi tinggi, perlu dilakukan optimasi metode ekstraksi dan pemurnian agar dapat mempertahankan stabilitas senyawa bioaktif. Selain itu, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami mekanisme interaksi antar-senyawa dalam ekstrak serta mengevaluasi potensinya dalam formulasi produk farmasi atau kosmetik. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode lain, seperti ABTS atau FRAP, juga disarankan untuk memperoleh hasil yang lebih komprehensif.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. apt. Yulistia Budianti Soemarie, M.Farm dan apt. Nily Su'aida. M.Farm yang telah membimbing dan memberi masukan serta saran dalam penelitian saya ini dan kepada Universitas Islam Kalimantan Muhammad Arsyad Al-Banjari yang memberikan pendampingan serta fasilitas dari awal hingga selesainya penelitian.

Daftar Pustaka

- Budianto, E., Yusuf, M., & Rahayu, D. (2021). Optimization of Fish Collagen Extraction and Its Application for Topical Formulations. *Journal of Cosmetic Science*, 72(2), 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.cosmet.2020.12.010>
- Chen, J., et al. (2021). Extraction Temperature Is A Decisive Factor For The Properties Of Pectin. *Food Hydrocolloids*, 112, 106160. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106160>
- Dorman, H. J. D., & Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties of extracts from selected culinary herbs and spices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(9), 2334-2343. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1561>
- Ghiselli, A., Nannelli, G., & Packer, L. (2000). Free radicals and antioxidants in the physiology of aging and age-related diseases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(2), 24-38. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(00\)00144-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(00)00144-2)
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715.
- Goh, K. L., Chia, S. L., & Lim, P. H. (2016). Marine Collagen from Fish Skin: A Potential Source of Bioactive Peptides. *Journal of Food Science*, 81(5), 911-918. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13135>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
- Issains, F.B., et al. (2019). Extraction of Collagen Type-I from Snakehead Fish Skin (*Channa Striata*) and Synthesis of Biopolymer for Wound Dressing. *AIP Conference Proceedings*, 2193(1), 20013. <https://doi.org/10.1063/1.5139333>
- Kharat, Z., et al. (2021). Chitosan/PEO Nanofibers Containing Calendula Officinalis Extract: Preparation, Characterization, In Vitro and In Vivo Evaluation for Wound Healing Applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 609, 121132. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121132>
- Li, Y., Zhang, J. J., Xu, D. P., Zhou, T., Zhou, Y., Li, S., & Li, H. B. (2013). Bioactivities and health benefits of wild fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1258.

- Liu, H., Zhang, Z., & Li, X. (2018). Denaturation Temperature and Structural Integrity of Collagen from Fish Scales: Implications for Biocompatible Cosmetics. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 15(3), 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.jbb.2018.01.015>
- Menezes, E. A., Lima, A. A. D., & Santos, G. T. (2019). The effect of pH on the antioxidant properties of natural products: A systematic review. *Journal of Food Science*, 84(7), 1713-1722. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14615>
- Nikolaidis, N., et al. (2017). Denaturation of collagen and its effect on protein solubility and gel properties under acidic and high-temperature conditions. *Food Biochemistry and Technology*, 45(8), 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.015>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Quevedo, A., et al. (2021). The impact of acidic conditions and temperature on collagen solubility and gel formation. *Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1229-1237. <https://doi.org/10.1007/s11483-021-01618-3>
- Rahman, M. M., Ahmed, T., & Hossain, M. M. (2019). Effects of Viscosity and pH on the Stability of Collagen Extracts for Pharmaceutical Applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(4), 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijps.2018.09.019>
- Setyaningsih, T., Supriyatna, P., & Santoso, S. (2020). The Antioxidant Properties of Collagen Extract from Fish Scales: A Review. *Journal of Functional Foods*, 68, 104535. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104535>
- Setyowiranti, M. F. ., & Darmaputra, I. G. N. . (2023). Snakehead Fish Extract in Increasing Skin Collagen & Fibroblasts. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 9(11), 1189–1197. <https://doi.org/10.29303/jppipa.v9i11.5496>
- Yulistian, Y., Arfianti, I., & Sari, L. (2021). DPPH Assay for Antioxidant Activity: A Review of Techniques and Applications in Plant Extracts. *Antioxidant Research*, 8(2), 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.antres.2021.05.003>