

PENGARUH KONSENTRASI NANOEMULSI KITOSAN (NeCs) TERHADAP SIFAT MEMBRAN NANOFIBER NeCs/PVA DAN APLIKASINYA SEBAGAI PEMBALUT LUKA SAYAT

Eka Wahyu Firmansyah^a, Harini Sosiati^a, Aris Widyo Nugroho^a

^aTeknik Mesin, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Bantul, Yogyakarta, Indonesia

+62 274 387656 Ext. 233/+62 274 387646

e-mail: eka.wahyu.2014@ft.umy.ac.id

Abstract

Fabrication of nanofiber membranes with chitosan and polyvinyl alcohol (PVA) materials was carried out using the electrospinning method. The chitosan used was nanoemulsion chitosan (NeCs). The matrix used is PVA solution. The matrix is made by dissolving PVA into distilled water at a level of 10% by weight. In this study, four solutions were used with different concentrations of NeCS in the matrix used 0, 5, 10, and 15% by weight. The electrospinning process was carried out at 11 kV, the distance between the needle tip and the collector plate (TCD) was 12 cm, and the internal diameter of the syringe needle was 0.6 mm. The morphology of NeCs/PVA nanofiber membranes was observed using a scanning electron microscope (SEM), the characterization of solutions using viscometer and conductometer, mechanical properties analysis using universal testing machine and in vivo tests performed on mice wounds. The results show a decrease in viscosity can reduce the size of fiber diameter and electrical conductivity of the solution can affect the uniformity of diameter nanofiber. The resulting nanofiber membrane has a uniform morphology with a diameter of 141,446-196,738 nm. The results of the mechanical properties analysis showed that NeCs/PVA nanofiber membranes had the lowest tensile strength at 15% NeCS concentration, which was 8.27 MPa and the highest at 5% NeCS concentration of 13.68 MPa. The modulus of membrane elasticity is between 36.69 - 59.70 MPa. While the results of in vivo tests indicate that 15% PVA/NeCs membranes can be able to approach commercial wound dressing capabilities..

Keywords: *nanofiber membrane, chitosan nanoemulsion, wound dressing, molecular weight*

Abstrak

Pembuatan membran *nanofiber* dengan bahan kitosan dan *polyvinyl alcohol* (PVA) telah dilakukan menggunakan metode *electrospinning*. Nanokitosan yang digunakan berbentuk emulsi yang mana disebut sebagai nanoemulsi kitosan (NeCs). Matriks yang digunakan adalah larutan PVA. Pembuatan matriks dilakukan dengan melarutkan PVA kedalam aquades pada kadar 10% berat. Pada penelitian ini, digunakan empat larutan dengan perbedaan konsentrasi NeCS dalam matriks yang digunakan, yaitu 0, 5, 10, dan 15% berat. Proses *electrospinning* dilakukan pada tegangan 11 kV, jarak antara ujung jarum dengan plat kolektor (TCD) 12 cm, dan diameter internal jarum syringe 0,6 mm. Morfologi membran *nanofiber* NeCs/PVA diamati menggunakan *scanning electron microscope* (SEM), karakterisasi larutan menggunakan viscometer dan konduktometer, analisa sifat mekanis menggunakan *universal testing machine* dan uji *in vivo* dilakukan pada luka mencit. Hasil menunjukkan penurunan viskositas mampu menurunkan ukuran diameter fiber dan konduktivitas elektrik larutan mampu mempengaruhi keseragaman diameter *nanofiber*. Membran nanofiber yang dihasilkan memiliki morfologi yang seragam dengan diameter dari 141,446-196,738 nm. Adapun hasil analisa sifat mekanis yang telah dilakukan menunjukkan membran *nanofiber* NeCS/PVA memiliki kuat tarik paling rendah pada konsentrasi NeCS 15% yaitu 8,27 MPa dan tertinggi pada konsentrasi NeCS 5% yaitu 13,68 MPa. Adapun nilai modulus elastisitas membran yaitu antara 36,69 – 59,70 MPa. Sedangkan hasil uji *in vivo* menunjukkan bahwa membran PVA/NeCs 15% dapat mampu mendekati kemampuan pembalut luka komersial.

Kata kunci : membran nanofiber, nanoemulsi kitosan, *wound dressing*, berat molekul

1. Pendahuluan

Luka merupakan terputusnya kontinuitas jaringan pada kulit karena pembedahan atau cedera¹; rusaknya struktur kulit yang disebabkan oleh trauma yang terjadi secara mekanik, kimia, radiasi, dan lainnya². Penanganan luka menggunakan metode lama (penanganan luka dalam kondisi kering) ternyata menghambat penyembuhan luka, karena terhambatnya proliferasi sel dan kolagen. Penanganan luka dengan cara mempertahankan kelembapan seimbang (*moisture balance*) menggunakan alat balut luka yang lebih modern dikenal sebagai metode *modern dressing*¹. Selain itu, bahan dari pembalut luka harus bersifat tidak menyebabkan alergi, mudah disterilkan, tidak beracun, *biodegradable*, *biocompatible*, dan mempunyai sifat mekanik memadai (elastis dan kuat)³.

Serat nano (*nanofiber*) merupakan serat dengan diameter kurang dari 0,5 mikron (500nm)⁴. Membran *nanofiber* yang dibuat dari suatu larutan polimer memiliki beberapa keunggulan yaitu luas permukaan per satuan volumenya lebih tinggi, ukuran pori pori yang kecil, dan strukturnya bisa dibentuk menjadi tiga dimensi sehingga dapat digunakan untuk serat optik, pakaian pelindung (*protective clothing*), media filtrasi dan sistem penghantar obat (*drug delivery*) dalam dunia farmasi⁵. Sedangkan pada dunia medis, membran nanofiber dapat digunakan sebagai bahan pembalut luka (*wound dressing*)⁶⁻⁷, media pembentuk jaringan lunak (*tissue scaffold*)⁸ dan mempercepat proses regenerasi tulang⁹.

Pembuatan membran nanofiber dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu *drawing*, *template synthesis*, *phase separation*, *self-assembly*, *fiber mesh*, *fiber-bonding*, *melt blown*, dan *electrospinning*¹⁰. Dari semua metode diatas, *electrospinning* merupakan metode paling sederhana dan serbaguna yang telah digunakan untuk membuat membran mikro dan nanofibers untuk aplikasi biomedis¹¹⁻¹². Selain itu, membran nanofiber hasil *electrospinning* juga memiliki karakteristik yang bagus seperti luas area yang besar, porositas yang tinggi dengan pori pori yang kecil¹³.

Kitosan merupakan salah satu polisakarida yang paling melimpah, yang berasal dari kitin dan telah banyak digunakan untuk pembalut luka (*wound dressing*) karena bersifat *biodegradable* dan *biocompatible*¹⁴. Kitosan tidak dapat larut dalam air, tetapi dapat larut dalam larutan asam¹⁵. Dengan pembuatan kitosan mikro menjadi berukuran nano menyebabkan meningkatnya kemampuan dalam penyerapan (*adsorption*) dan distribusi antigen yang mempengaruhi daya imunitas¹⁶. Namun, *electrospinning* menggunakan kitosan murni masih sulit untuk dilakukan karena nilai konduktivitas yang tinggi, karena itu dibutuhkan polimer yang mampu mengurangi konduktivitasnya yaitu PVA *Poly (vinyl alcohol)*¹⁷. Selain itu, PVA juga memiliki sifat *biocompatible*, *biodegradable*, larut dalam air dan telah banyak dipelajari untuk aplikasi biomedis¹⁴.

Pembuatan nanofiber berbahan Kitosan/PVA sudah banyak dilakukan. Diantaranya adalah pembuatan pembalut luka PVA/Kitosan yang di uji in vivo pada mencit¹⁴. Penelitian ini berhasil mempercepat proses penyembuhan luka pada tubuh mencit. Penelitian tentang sifat mekanis dan morfologi dari membran nanofiber Kitosan/PVA, hasilnya menunjukkan bahwa penambahan kitosan menurunkan nilai kuat tarik, modulus elastisitas dan diameter membran nanofiber¹⁵.

Pembuatan membran nanofiber nanoemulsi kitosan (NeCs)/PVA menggunakan PVA dengan berat molekul yang tinggi (85.000-124.000 g/mol) sudah pernah dilakukan¹⁸. Hasilnya modulus elastisitasnya 83,04-89,48 MPa. Nilai ini masih sangat jauh dari nilai *native skin* (kuat tarik 5-30 MPa dan modulus elastisitas 4,6-20 MPa). Nilai modulus elastisitas yang terlalu tinggi akan menyebabkan membran *nanofiber* menjadi kaku dan tidak dapat mengikuti sifat mekanis *native skin*. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan penelitian pembuatan membran nanofiber NeCs/PVA menggunakan PVA *low molecular weight* agar didapatkan membran nanofiber dengan sifat mekanis *native skin*.

2. Bahan dan Metode

2.1 Bahan

PVA (*molecular weight*: 22.000 g/mol), Kitosan Nanoemulsi (NeCs), *Hydrolyzed water*, Mencit (*Mus musculus albinus*).

2.2 Metode

2.2.1 Pembuatan larutan PVA/NeCs

Pembuatan larutan diawali dengan melarutkan PVA menggunakan *hydrolyzed water* (10% w/w) dengan suhu 80°C. Kemudian larutan PVA 10% w/w dicampurkan dengan NeCs dengan perbandingan 100/0, 95/5, 90/10, 85/15

2.2.2 Pengujian sifat fisis larutan

Sifat fisis yang diuji pada penelitian ini adalah viskositas dan konduktivitas elektrik larutan PVA/NeCs. Viskositas larutan diukur menggunakan *viscometer Brookfield DV-II+ Pro* milik laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada. Sedangkan konduktivitas elektrik larutan diukur menggunakan konduktometer *SensoDirect Con200 Lovibond* milik LPPT Universitas Gadjah Mada.

2.2.3 Pembuatan membran PVA/NeCs

Membran PVA/NeCs dibuat dengan metode *electrospinning* menggunakan tegangan 11kV, jarak (*tip to collector distance/TCD*) 12cm dan *needle* berdiameter 0,6 mm (23G). Larutan PVA/NeCs dimasukkan ke dalam *syringe* 10ml sebelum dilakukan fabrikasi.

2.2.4 Karakteristik membran PVA/NeCs

Morfologi membran *nanofiber* PVA/NeCs diamati dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) Hitachi SU 3500. Menggunakan tegangan 5kV dan perbesaran 10.000 kali. Diameter dan distribusi serat diukur menggunakan *software ImageJ*.

2.2.5 Pengujian sifat mekanis membran PVA/NeCs

Membran PVA/NeCs diuji tarik menggunakan *Universal Testing Machine Zwick 0.5*. Dari pengujian ini akan didapatkan beberapa data yaitu kuat tarik (*tensile strength*), regangan (*elongation*), dan modulus elastisitas.

2.2.6 Pengujian *in vivo* membran PVA/NeCs

Pengujian *in vivo* membran *nanofiber* PVA/NeCs menggunakan mencit sebagai hewan uji coba. Mencit dibagi kedalam 3 kelompok, yaitu kelompok I menjadi kontrol positif (menggunakan sufratul sebagai pembalut luka), kelompok II menggunakan membran PVA/CsNe 100/0, dan kelompok III menggunakan membran PVA/CsNe 85/15.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Viskositas dan Daya Hantar Listrik (DHL) Larutan NeCs/PVA

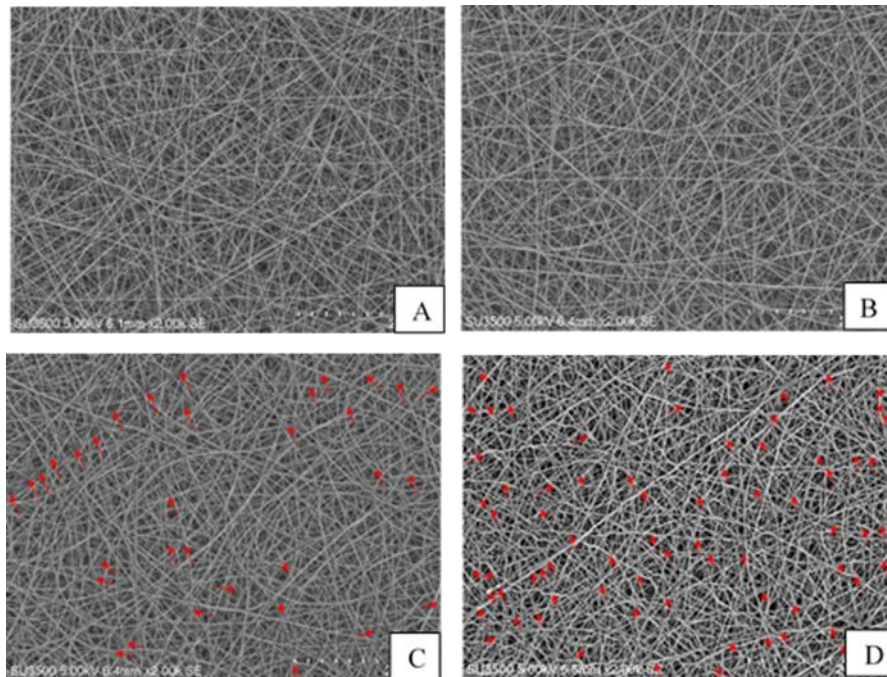
Salah satu faktor yang berpengaruh dalam proses pembentukan membran *nanofiber* adalah sifat fisis dari larutan meliputi viskositas dan konduktivitas¹⁰. Sifat fisis dari larutan diukur dengan menggunakan viskometer dan konduktometer. Hasil dari kedua pengujian ini ditampilkan pada tabel 1. Penambahan konsentrasi NeCs akan menaikkan nilai konduktivitas dari larutan, akan tetapi nilai viskositas larutan menjadi turun saat penambahan konsentrasi NeCs. Hal ini terjadi karena NeCs yang digunakan pada penelitian ini memiliki nilai viskositas yang rendah, namun memiliki nilai konduktivitas yang tinggi.

Tabel 1. Hasil Uji Viskositas dan DHL

| Konsentrasi | Viskositas | DHL |
|-------------|------------|--------|
| 0% | 577,9 | 539,67 |
| 5% | 369,9 | 590,00 |
| 10% | 313,9 | 613,33 |
| 15% | 218,5 | 651,67 |

3.2 Analisis Morfologi Membran PVA/NeCs

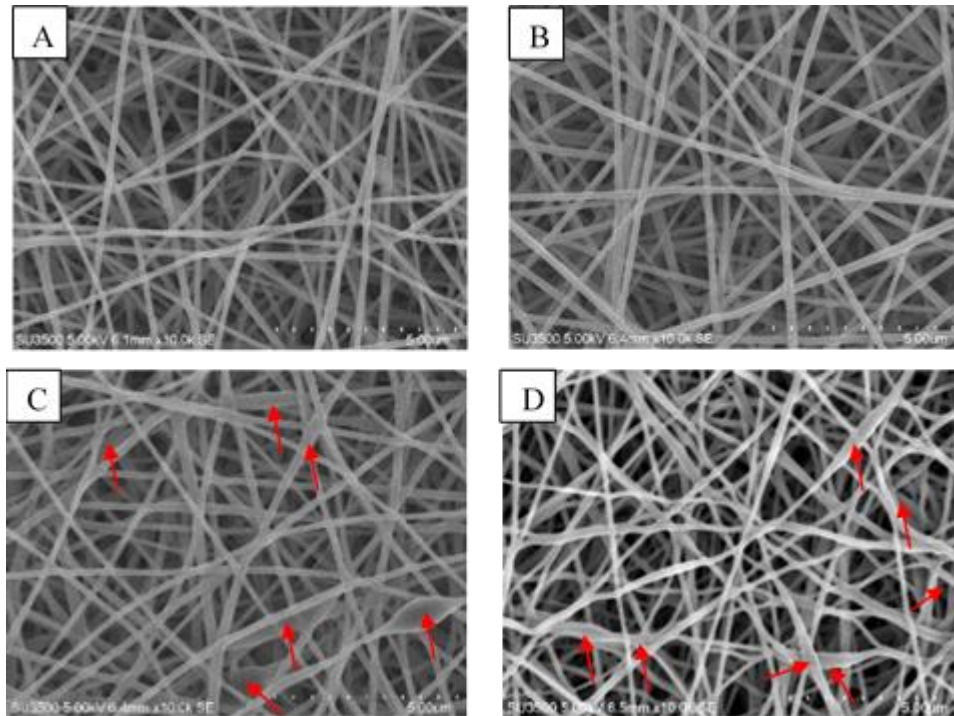
Pengamatan morfologi membran serat nano dilakukan menggunakan SEM. Gambar 4.1 dan 4.2 menunjukkan bahwa membran *nanofiber* PVA/NeCs berhasil menggunakan metode *electrospinning*. Peningkatan konsentrasi NeCs pada larutan menyebabkan timbulnya *bead* pada membran *nanofiber* 10% dan 15% (gambar 4.1 C,D dan gambar 4.2 C,D). Sedangkan pada konsentrasi NeCs 0% dan 5% (gambar 1 A,B dan gambar 2 A,B) tidak ditemukan *bead* pada membran *nanofiber*.



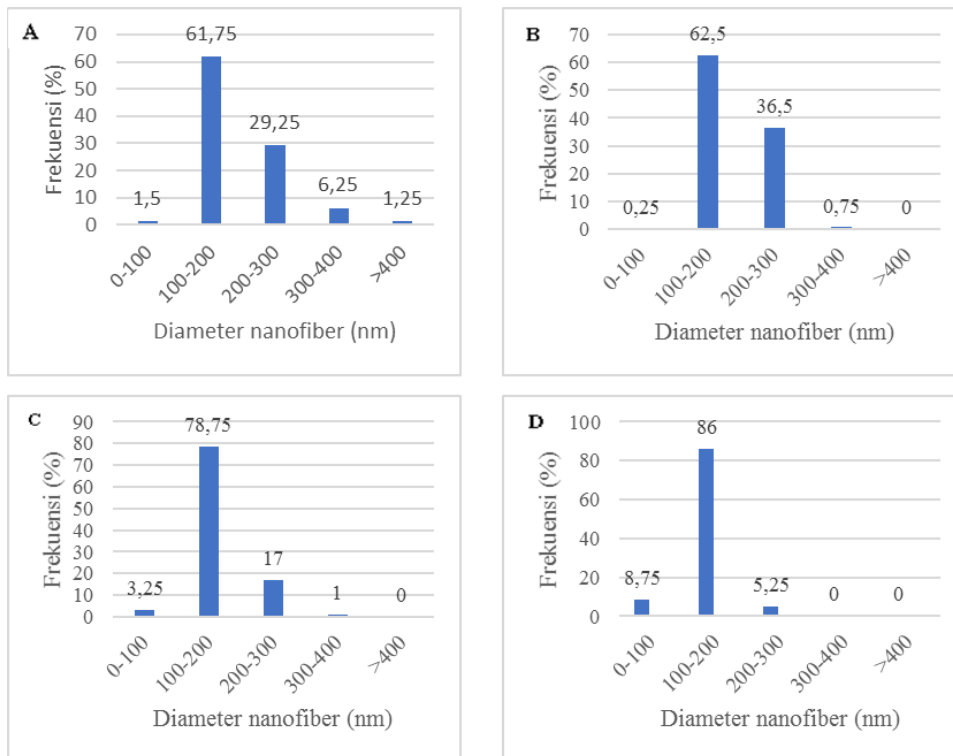
Gambar 1. Hasil foto SEM membran *nanofiber* PVA/NeCs (A) 0%, (B) 5%, (C) 10%, (D) 15% perbesaran 2000 kali

Pada gambar 2A membran *nanofiber* PVA/NeCs 0% memiliki diameter serat yang belum seragam. Penyebab dari hal ini adalah larutan memiliki DHL yang rendah, sehingga *nanofiber* masih kurang merata ukurannya (Herdiawan dkk., 2013). Hasil SEM membran PVA/NeCs 5% (gambar 2B) menunjukkan mulai terbentuknya *nanofiber* yang seragam. Hal ini menunjukkan bahwa dengan penambahan 5% NeCs dapat menyeragamkan ukuran *nanofiber*. Pada membran PVA/NeCs 10% (gambar 2C) *nanofiber* yang terbentuk semakin seragam dan ukurannya menjadi lebih kecil dari sebelumnya. Sedangkan pada membran PVA/NeCs 15% (gambar 2.D) bentuk morfologinya tidak berbeda jauh dengan membran PVA/NeCs 10% dengan ukuran *nanofiber* yang lebih kecil lagi.

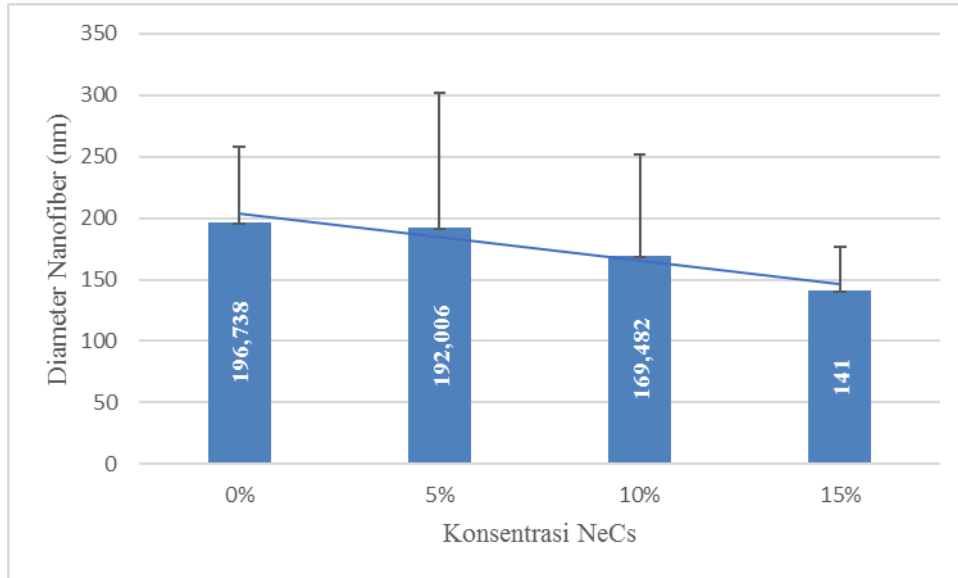
Membran PVA/NeCs 0% memiliki ukuran *nanofiber* yang belum seragam, karena ukurannya masih tersebar pada beberapa ukuran yaitu 1,5% berukuran 0-100 nm, 61,75% berukuran 100-200 nm, 29,25% berukuran 200-300 nm, 6,25% berukuran 300-400 nm dan 1,25% berukuran >400 nm (gambar 3A). Namun pada membran PVA/NeCs 5% (gambar 3B) ukuran *nanofiber* mulai seragam pada ukuran 100-200 nm (62,5%) dan 200-300 nm (36,5%). Hal yang sama juga terjadi pada membran PVA/NeCs 10% (gambar 3C) ukuran *nanofiber* seragam pada range 100-200 nm (78,75%) dan 200-300 nm (17%). Kemudian pada membran PVA/NeCs 15% (gambar 3D) *nanofiber* berukuran 100-200 nm mendominasi dengan frekuensi sebanyak 86%. Dari gambar 3 juga dapat diamati bahwa peningkatan konsentrasi NeCs akan menyebabkan diameter rata-rata nanofiber mengecil.



Gambar 2. Hasil foto SEM membran nanofiber PVA/NeCs (A) 0%, (B) 5%, (C) 10%, (D) 15% perbesaran 5000 kali



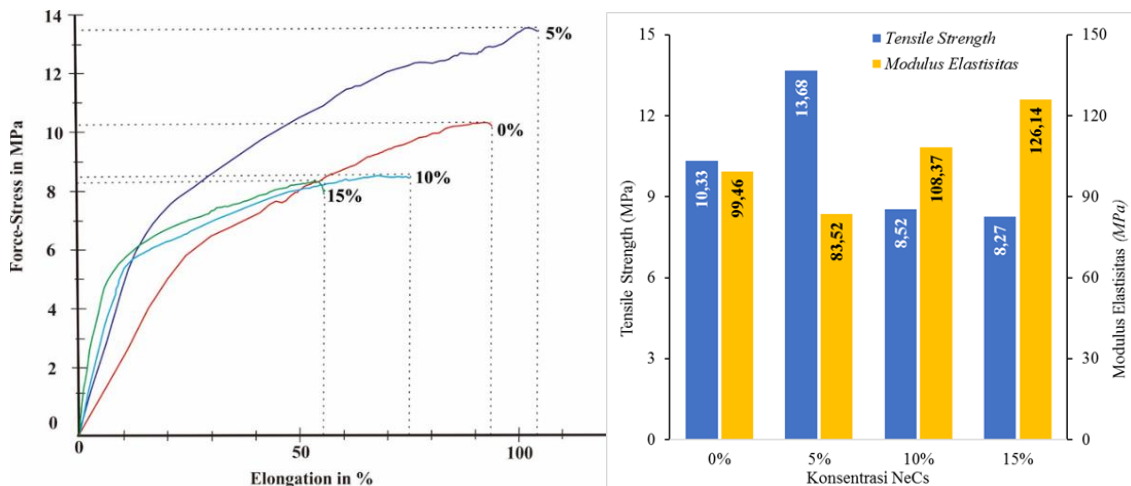
Gambar 3. Distribusi diameter nanofiber pada membran dengan konsentrasi



Gambar 4 Diameter rata-rata membran nanofiber PVA/NeCs

3.3 Sifat Tarik Membran Nanofiber PVA/NeCs

Sifat tarik membran nanofiber PVA/NeCs dapat dilihat pada gambar 5. Kuat tarik membran nanofiber PVA/NeCs memiliki nilai 8,27 MPa (PVA/NeCs 15%) sampai 13,68 MPa (PVA/NeCs 5%). Pada gambar 4.6 nilai kuat tarik membran nanofiber PVA/NeCs meningkat pada penambahan konsentrasi NeCs 5% dan menurun setelah penambahan NeCs 10% dan 15%. Hal ini terjadi karena pada penambahan NeCs telah melewati batas optimum yang menyebabkan membran nanofiber bersifat kaku (brittle)¹⁹. Selain itu, menurunnya nilai kuat tarik dari membran nanofiber PVA/NeCs 10% dan 15% disebabkan karena munculnya *bead* pada kedua membran tersebut (gambar 4.1 dan 4.2). *Bead* yang terbentuk akan mempengaruhi ikatan antar nanofiber sehingga menyebabkan turunnya kuat tarik membran. Berdasarkan hasil nilai kuat tarik ini, membran nanofiber PVA/NeCs ini sudah masuk pada standar *tensile strength native skin*, yaitu antara 5,0 – 30 MPa³.



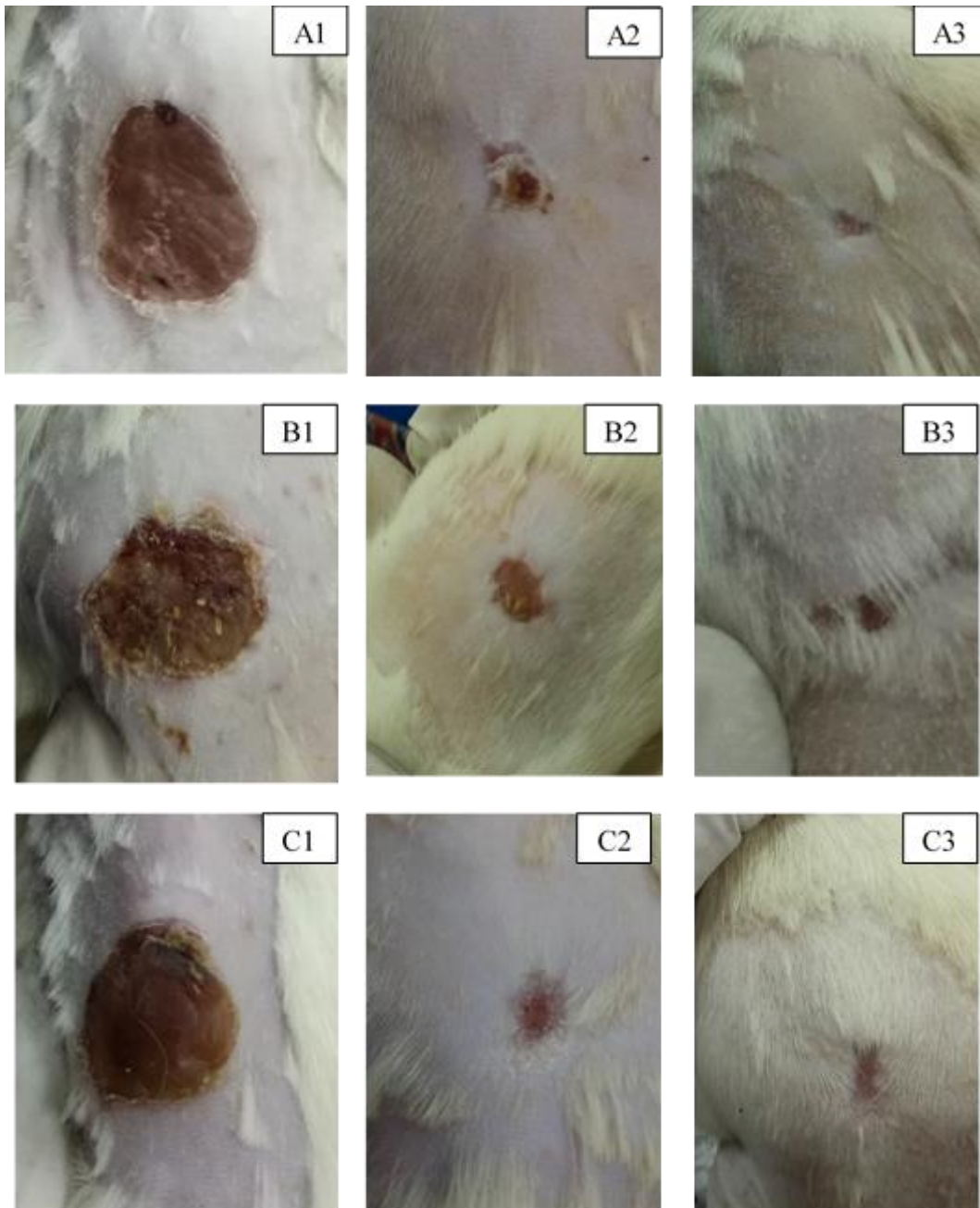
Gambar 5. Sifat Mekanis membran nanofiber PVA/NeCs

Nilai modulus elastisitas membran nanofiber mengalami peningkatan saat penambahan konsentrasi NeCs. Kenaikan modulus elastisitas ini terjadi karena beberapa faktor yaitu (i) penurunan diameter nanofiber dapat menyebabkan nilai kekakuan naik dan modulus elastisitasnya naik¹⁸, (ii) munculnya gaya inter dan intra molekular pada saat penambahan kitosan yang menjadi penyebab peningkatan kekakuan membran¹⁷. Nilai modulus elastisitas dari membran ini masih terlalu tinggi dari nilai modulus elastisitas *native skin* (4,6 – 20MPa)³.

3.4 Analisis uji *in vivo*

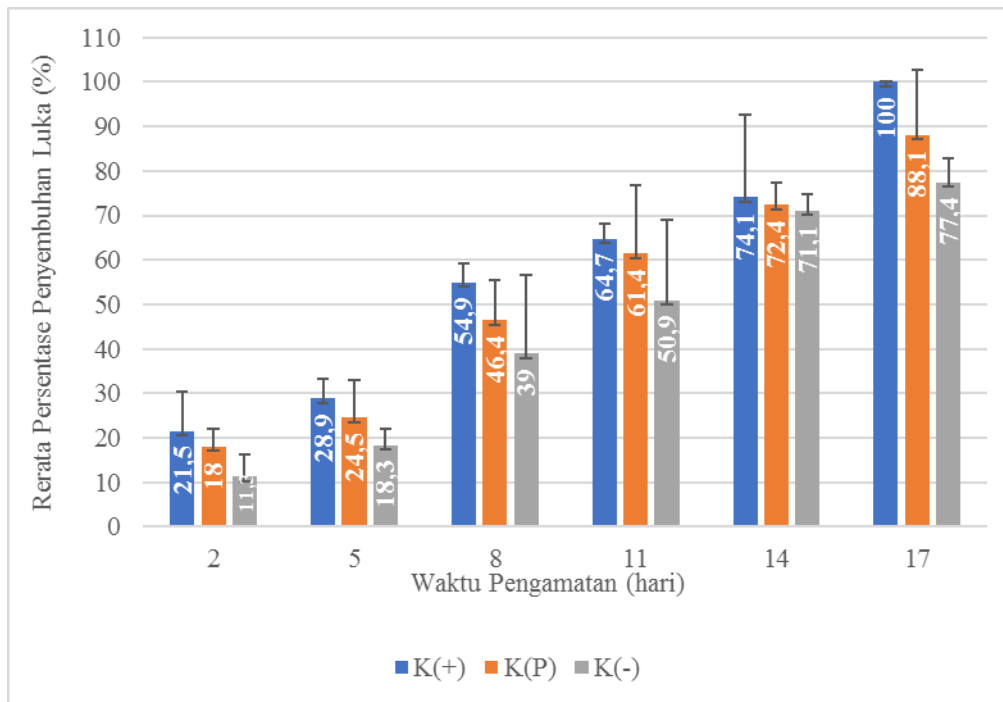
Pengaruh penggunaan membran PVA/NeCs 0%, PVA/NeCs 15% dan *Sofra-Tulle* pada luka sayat bisa dapat dilihat pada gambar 6. Rata-rata persentase penyembuhan luka sayat dinilai berdasarkan perubahan diameter luka sayat pada setiap waktu pengamatan yang ditampilkan pada gambar 7. Luka yang dibalut menggunakan membran PVA/NeCs 15% (gambar 6 A1-A3) dapat menutup pada hari ke 17 seperti pada luka yang dibalut menggunakan *Sofra-Tulle* (gambar 7 C1-C3). Sedangkan luka yang dibalut menggunakan PVA/NeCs 0% (gambar 6 B1-B3) belum menutup pada hari ke 17.

Gambar 6. Hasil penyembuhan luka pada hari ke 8 (A),



hari ke 14 (B) dan hari ke 17 (C)

Gambar 7 menunjukkan bahwa penyembuhan luka terjadi pada lima hari pertama yaitu pada fase inflamasi. Adanya perbedaan progresifitas penyembuhan luka pada hari ke-5 pada ketiga kelompok dalam penelitian ini disebabkan karena adanya perbedaan kandungan pembalut luka (PVA/NeCS 15%, PVA/NeCs 0% dan *Sofra-Tulle*). Kelompok perlakuan (PVA/NeCS 15%) menunjukkan persentase penyembuhan luka yang mendekati dengan kontrol positif. Hasil penelitian juga sesuai dengan penelitian²⁰ yang menyatakan bahwa kitosan memiliki kemampuan menginisiasi pembelahan sel fibroblast dan menstimulasi sintesis kolagen yang sangat berperan penting dalam proses penyembuhan luka. Kitosan juga telah terbukti mampu meningkatkan daya re-epitelisasi dan regenerasi dari lapisan granular pada kulit²¹.



Gambar 7. Perkembangan luka pada mencit

4. Kesimpulan

1. Penambahan NeCs kedalam larutan PVA LMw akan mempengaruhi sifat fisis dan mekanis membran PVA/NeCs.
2. Membran PVA/NeCs 15% memiliki kemampuan penyembuhan luka yang mendekati Sofra-Tulle (pembalut luka dengan antibiotik).

REFERENSI

- [1] Kartika, R.W., 2015. *Perawatan Luka Kronis dengan Modern Dressing*. Teknik, 42(7), pp.546-50.
- [2] Flowers, C., Newall, N., Kapp, S., Lewin, G., Gliddon, T., Carville, K., Martinelli, D. and Santamaria, N., 2008. *Clinician inter-rater reliability using a medical wound imaging system*. Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association, 16(1), p.22.
- [3] Miguel, S.P., Ribeiro, M.P., Coutinho, P. and Correia, I.J., 2017. *Electrospun Polycaprolactone/aloe Vera_Chitosan Nanofibrous asymmetric membranes aimed for wound healing applications*. Polymers, 9(5), p.183.
- [4] Gibson, P.W., Lee, C., Ko, F. and Reneker, D., 2007. *Application of nanofiber technology to nonwoven thermal insulation*. Journal of Engineered Fibers and Fabrics, 2(2), p.155892500700200204.
- [5] Herdiawan, H., Juliandri, Juliandri, and N. Muhammad. 2013. *Pembuatan dan Karakterisasi Co-PVDF Nanofiber Komposit Menggunakan Elektrospinning*. Prosiding Seminar Nasional Sains Dan Teknologi Nuklir PTNBR-BATAN Bandung. 110-16.
- [6] Cai, Z.X., Mo, X.M., Zhang, K.H., Fan, L.P., Yin, A.L., He, C.L. and Wang, H.S., 2010. *Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound-dressing applications*. International journal of molecular sciences, 11(9), pp.3529-3539.
- [7] Panboon, S., 2005. *Electrospinning of Poly (Vinyl Alcohol)/Chitosan Fibers for Wound Dressing Applications* (Doctoral dissertation, Thesis. King Mongkut's Institute of Technology North Bangkok, ISBN 974-19-0476-2).
- [8] Kumbar, S.G., James, R., Nukavarapu, S.P. and Laurencin, C.T., 2008. *Electrospun nanofiber scaffolds: engineering soft tissues*. Biomedical materials, 3(3), p.034002.
- [9] Kim, S.S., Park, M.S., Jeon, O., Choi, C.Y. and Kim, B.S., 2006. *Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 27(8), pp.1399-1409.
- [10] Garg, T., Rath, G. and Goyal, A.K., 2015. *Biomaterials-based nanofiber scaffold: targeted and controlled carrier for cell and drug delivery*. Journal of drug targeting, 23(3), pp.202-221.
- [11] Agarwal, S., Wendorff, J.H. and Greiner, A., 2008. *Use of electrospinning technique for biomedical applications*. Polymer, 49(26), pp.5603-5621.
- [12] Sridhar, R., Venugopal, J.R., Sundarajan, S., Ravichandran, R., Ramalingam, B. and Ramakrishna, S., 2011. *Electrospun nanofibers for pharmaceutical and medical applications*. Journal of drug delivery science and technology, 21(6), pp.451-468.
- [13] Jia, Y.T., Gong, J., Gu, X.H., Kim, H.Y., Dong, J. and Shen, X.Y., 2007. *Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method*. Carbohydrate Polymers, 67(3), pp.403-409.
- [14] Sundaramurthi, D., Vasanthan, K.S., Kuppam, P., Krishnan, U.M. and Sethuraman, S., 2012. *Electrospun nanostructured chitosan-poly (vinyl alcohol) scaffolds: a biomimetic extracellular matrix as dermal substitute*. Biomedical Materials, 7(4), p.045005.
- [15] Koosha, M. and Mirzadeh, H., 2015. *Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 103(9), pp.3081-3093.
- [16] Zhao, D., Yu, S., Sun, B., Gao, S., Guo, S. and Zhao, K., 2018. *Biomedical applications of chitosan and its derivative nanoparticles*. Polymers, 10(4), p.462.
- [17] Rafique, A., Zia, K.M., Zuber, M., Tabasum, S. and Rehman, S., 2016. *Chitosan functionalized poly (vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review*. International journal of biological macromolecules, 87, pp.141-154.
- [18] Septiaji, Ilham Dwi., 2018. *Karakterisasi Sifat Mekanis dan Fisis Electrospun Nanoemulsi Kitosan(NeCs)/Polyvinil Alkohol (PVA)*. (Skrispi, Jurusan Teknik Mesin Fakultas Teknik)
- [19] Ratnawati, A., Djoni, I.R. and Adri, S., 2013. *Sintesis dan Karakterisasi Kolagen dari Teripang-Kitosan sebagai Aplikasi Pembalut Luka*. Jurnal fisika dan Terapannya, 1(2).
- [20] Isele, O.E.A., Chhabra, R., Xu, H., Mirle, S.K. and Bond, E.B., Procter and Gamble Co, 2016. *Articles containing nanofibers for use as barriers*. U.S. Patent 9,464,369.

- [21] Azad, A.K., Sermsintham, N., Chandkrachang, S. and Stevens, W.F., 2004. *Chitosan membrane as a wound-healing dressing: Characterization and clinical application*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 69(2), pp.216-222