

## Penurunan Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) Fibroblas dengan Nano Kitosan Kumbang Tanduk (*Xylotrupes gideon*)

Komariah<sup>1\*</sup>, Cynthia Priscilla<sup>2</sup>, Rahman Wahyudi<sup>3</sup>, Pretty Trisfilha<sup>3</sup>, Didi Nugroho<sup>4</sup>,

<sup>1</sup> Program Studi Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi sub-divisi Histologi, Universitas Trisakti, Jakarta Barat, DKI Jakarta, Indonesia

<sup>2</sup> Program Studi Profesi Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti, Jakarta Barat, DKI Jakarta, Indonesia

<sup>3</sup> Program Studi Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi sub-divisi Patologi, Universitas Trisakti, Jakarta Barat, DKI Jakarta, Indonesia

<sup>4</sup> Program Studi Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi sub-divisi Farmakologi, Universitas Trisakti, Jakarta Barat, DKI Jakarta, Indonesia

Email: komariah@trisakti.ac.id

### ABSTRAK

Fibroblas berperan dalam proses penyembuhan luka dengan pembentukan pembuluh darah, pergerakan serta proliferasi, deposit matriks ekstraseluler dan remodeling jaringan. Pada penyembuhan luka, netrofil dan makrofag akan mengalami peningkatan penggunaan oksigen sehingga memproduksi ROS, peningkatan produk ini akan menyebabkan stres oksidatif pada fibroblas yang akan mempengaruhi proses migrasi dan proliferasi selama proses penyembuhan luka. Kandungan gugus amino (-NH<sub>2</sub>) dan gugus hidroksil (-OH) pada nano kitosan mampu mengurangi stres oksidatif fibroblas. Penelitian bertujuan untuk mengetahui kemampuan nano kitosan *X. gideon* dalam menurunkan produksi ROS fibroblas. Penelitian terbagi menjadi enam kelompok terdiri dari kontrol negatif (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), kontrol pembanding, kontrol asam askorbat, nano kitosan konsentrasi 200, 400, dan 600 µg/mL. Produksi ROS dilihat menggunakan *probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate* (H<sub>2</sub>DCF-DA). Produksi fibroblas diperlihatkan dengan intensitas fibroblas terfluoresen hijau dihitung menggunakan *software image J*. Rerata produksi ROS pada kelompok nano kitosan 200, 400, dan 600 µg/mL berbeda signifikan dengan kontrol negatif (p<0,05), sedangkan yang diberikan asam askorbat tidak signifikan (p>0,05) dengan perlakuan 200 dan 600 µg/mL, namun signifikan dengan nano kitosan 400 µg/mL. Nano kitosan *X. gideon* mampu menurunkan produksi ROS fibroblas pada konsentrasi 400 µg/mL.

**Kata Kunci:** Nano Kitosan, *X. gideon*, ROS, Fibroblas, Fluoresen

## ABSTRACT

*Fibroblasts play a role in wound healing by forming blood vessels, mobilizing and proliferation, depositing extracellular matrix and tissue remodelling. In wound healing, neutrophils and macrophages will experience an increase in oxygen use, resulting in ROS production. An increase in these products will cause oxidative stress in fibroblasts, affecting the migration and proliferation processes during the wound healing process. The content of amino groups (-NH<sub>2</sub>) and hydroxyl groups (-OH) in nano chitosan can reduce fibroblast oxidative stress. This study aimed to determine the ability of *X. gideon* nano chitosan to reduce fibroblast ROS production. The study was divided into six groups: negative control (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), control control, ascorbic acid control, and nano chitosan concentrations of 200, 400 and 600 µg/mL. ROS production observes using the 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) probe. The intensity of greenfluorescent fibroblasts calculated using Image J software showed the production of fibroblasts. The mean ROS production in the 200, 400, and 600 µg/mL nano-chitosan groups was significantly different from the negative control ( $p < 0.05$ ), whereas those given ascorbic acid were insignificant. ( $p > 0.05$ ) with 200 and 600 µg/mL treatments, but significant with 400 µg/mL nano chitosan. *X. gideon* nano chitosan reduced fibroblast ROS production at 400 µg/mL concentration.*

**Keywords:** Nano Chitosan, *X. gideon*, ROS, Fibroblasts, Fluorescent

### I. PENDAHULUAN

Fibroblas merupakan sel yang umum ditemukan dalam jaringan ikat (Gabbott dan Sun, 2018), serta memiliki kemampuan untuk memproduksi substansi protein serat dan substansi dasar yang penting dalam proses penyembuhan luka (Kurniawati *et al.*, 2015). Selama penyembuhan luka, fibroblas berperan dalam proses fibroplasia, yang melibatkan pembentukan pembuluh darah baru, migrasi dan proliferasi fibroblas, deposisi matriks ekstraseluler, serta organisasi jaringan fibrous (Masir *et al.*, 2012). Fibroblas bertanggung jawab dalam memproduksi matriks ekstraseluler yang membentuk jaringan ikat dan berperan penting pada proses penyembuhan luka (Gabbott dan Sun, 2018).

Luka terjadi akibat terputusnya kontinuitas jaringan baik oleh trauma akibat benda, suhu, bahan kimia, ledakan, aliran listrik ataupun gigitan hewan (Yuslianti *et al.*, 2015; Gonzales *et al.*, 2016). Pada bidang kedokteran gigi, luka dapat terjadi akibat tindakan seperti pencabutan, pembedahan, dan pembersihan karang gigi (Ekmekcioglu dan Unur, 2017). Selain itu, luka dapat pula ditimbulkan akibat adanya perubahan patologis, seperti ulkus dekubitalis, ulkus traumatikus, periodontitis, dan gingivitis (Anura, 2014). Sebagai respon terhadap luka, tubuh mengalami proses penyembuhan (Gonzales *et al.*, 2016).

Ada empat fase dalam penyembuhan luka yaitu, fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *maturation*

(Patil dan Leipzig, 2018). Fase inflamasi terjadi hampir bersamaan dengan fase hemostasis, terjadi proses pembekuan darah dan infiltrasi sel-sel inflamasi. Fase proliferasi ditandai dengan proliferasi dari fibroblas, granulasi, kontraksi, dan epitelisasi. Fase terakhir adalah fase maturasi atau pemulihan jaringan yang diakhiri dengan terbentuknya jaringan parut (Gonzales *et al.*, 2016).

Selama proses penyembuhan luka, sel-sel inflamasi akan mengalami peningkatan pada penggunaan oksigen sehingga akan memproduksi ROS yaitu superoksida dan hidrogen, yang mempunyai peran sebagai bakterisidal untuk membantu membunuh patogen serta pensinyalan intraseluler seperti menginduksi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dalam meningkatkan proses angiogenesis peroksida (Arief dan Widodo, 2018). Pada jumlah yang rendah, ROS memiliki efek menguntungkan terhadap beberapa proses fisiologis tubuh seperti dalam proses penyembuhan luka, meregulasi reaksi reduksi-oksidasi, serta dapat melawan patogen yang menginvasi tubuh (Bhattacharyya *et al.*, 2014). Namun, ROS dalam kadar yang terlalu tinggi dapat menyebabkan prooksidan meningkat dan dapat mengarahkan sel untuk mengalami stres oksidatif, yaitu suatu kondisi saat terjadinya kelebihan produksi ROS dan defisiensi dari antioksidan enzimatik,

menyebabkan ketidakseimbangan antara jumlah prooksidan dan antioksidan pada sel (Phaniendra *et al.*, 2015). Keadaan ini, dapat mengganggu fungsi komunikasi antar sel dan menyebabkan terjadinya kerusakan pada jaringan sehingga mengganggu proses penyembuhan luka, seperti memperpanjang fase inflamasi dan juga menghambat proses proliferasi serta pembentukan kolagen oleh fibroblas (Pisoschi dan Pop, 2015).

Kitosan merupakan turunan kitin yang memiliki aplikasi yang luas (Sudha *et al.*, 2015). Kitosan merupakan amina polisakarida yang dihasilkan melalui proses deasetilasi kitin. Kitosan mempunyai sifat non-toksik, *biodegradable*, *biokompatibel*, dan bioaktif sehingga aman untuk diaplikasikan dalam berbagai bidang kehidupan (Sudha *et al.*, 2015), serta aplikasi kitosan secara biomedis sangat bermanfaat sebagai pengantar obat, agen antibakteri, dan antioksidan (Cheung *et al.*, 2015).

Kitosan dapat diperoleh dari hasil pengolahan limbah cangkang udang, kepiting, kapang, dan serangga (Komariah *et al.*, 2017), seperti kumbang tanduk (*Xylotrupes gideon*), yaitu serangga merugikan yang dapat dimanfaatkan menjadi produk ekonomis seperti kitosan (Komariah dan Astuti, 2012). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek

pemberian nano kitosan *X. gideon* dalam menurunkan produksi ROS fibroblas.

## II. METODE

### A. Alat dan Bahan

*X. gideon* diperoleh dari daerah Cangkurawok, Damaga, Balumbang Jaya, Bogor Jawa Barat. *X. gideon* dikeringkan dengan dijemur selama lima hari hingga kering, setelah *X. gideon* kering dilakukan proses demineralisasi menggunakan HCL 1N (v/v) (Cat No. 1.00317.2500, Merck, Jerman), deproteinisasi dengan NaOH 3N (b/v), (Cat No. 106498.0500, Merck®, Jerman), dekolorisasi NaOCl 4 % (v/v) (Cat No. 105614, Frankfurter®), dan deasetilasi NaOH 50% (b/v) (Cat No. 106498.0500, Merck®, Jerman) (Komariah, 2013). Pembuatan nano kitosan dengan menggunakan asam asetat 1-2% v/v (CAS 64-19-7, Merck®, Jerman), tween 80 0,1% v/v (CAS 9005-65-6, Merck®, Prancis), sodium tripolifosfat (CAS 7758-29-4, Sigma-aldrich®, USA). Pewarnaan flourensensi hijau ROS menggunakan 2,7-Dichlorofluorescin Diacetate (H2DCF-DA, CAS 4091-99-0, Santa cruz®, USA), *dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose* (DMEM, D5796, Sigma-aldrich®, Jerman), *phosphate Buffer Saline* (PBS, Gibco™ 10010023, Swedia), *fetal bovine serum* (FBS, Gibco™ 16000044, Swedia), hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAS 7722-84-1, Merck®, Jerman). Penelitian dilakukan di

Laboratorium Terpadu Yarsi dengan standar ISO 17025.

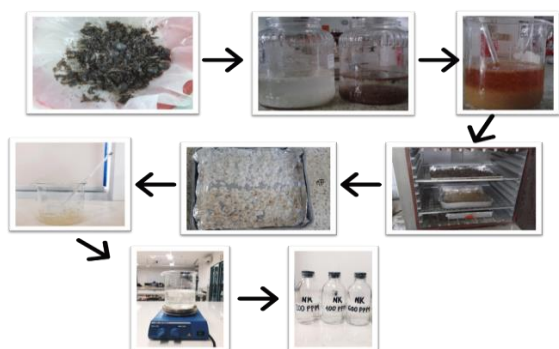
### B. Pembuatan Nano Kitosan

Gelasi ionik merupakan metode yang digunakan untuk membuat nano kitosan menggunakan *magnetic stirrer* (IKA™ RH Basic 2, Jerman). Kitosan berupa serpihan ditimbang sebanyak 1,5 g, kemudian dilarutkan dalam asam asetat 1,5% sebanyak 50-100 ml. Tambahkan aqua bidestilata hingga 500 mL dan masukkan *magnetic bar* (3 cm), lakukan pengadukan selama 2 jam lalu dimasukkan tween 80 (0,1%) sebanyak 0,1 ml, aduk kembali selama 30 menit, setelah itu dimasukkan STPP 0,1% sebanyak 100 ml tetes demi tetes, aduk larutan selama 30 jam (Komariah, 2020).

Proses terakhir dilakukan netralisasi menggunakan NaOH 10%, hingga pH netral. Pengenceran dilakukan dari larutan stok serum nano kitosan dengan konsentrasi 3000 µg/mL yang diencerkan menjadi larutan uji. Pembuatan dari kitin hingga menjadi serum nano kitosan dapat dilihat pada Gambar 1.

Fibroblas yang digunakan berasal dari kulit manusia yang diperoleh dari Biorepositori Pusat Penelitian Sel Punca, Universitas Yarsi, Indonesia. Fibroblas dari biorepositori ditanam dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Setelah 24 jam, media pertumbuhan

fibroblas digantikan dengan media yang mengandung DMEM, 10% FBS, dan antibiotik antimikotik.



**Gambar 1.** Proses pembuatan kitin *X. gideon* menjadi nano kitosan

Pada uji ROS kelompok penelitian terbagi menjadi 6 kelompok yaitu, kelompok tanpa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sebagai kelompok pembanding), kelompok dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanpa perlakuan (kontrol negatif), kelompok dengan antioksidan non enzimatis asam askorbat (kontrol positif) dan kelompok perlakuan yang diberikan nano kitosan *X. gideon* konsentrasi 200, 400, dan 600 µg/mL.

Uji produksi ROS dilakukan dengan penanaman fibroblas sebanyak 10.000 sel/well dan diinkubasi selama 24 pada suhu 37°C serta 5% CO<sub>2</sub>. Setelah 24 jam, media pertumbuhan fibroblas digantikan dengan media yang mengandung DMEM, 10% FBS, dan 1% Penicillin. Lima kelompok diberikan stres oksidatif menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 100 µM dan diinkubasi kembali selama 1 jam. Kelompok yang telah diberikan stressor diberikan asam askorbat

(vitamin C), kelompok negatif tanpa diberikan nano kitosan, sedangkan kelompok perlakuan diberikan nano kitosan dengan konsentrasi 200, 400, dan 600 µg/mL, lalu diinkubasi selama 3 jam. Dilakukan pencucian dengan 1X PBS satu kali, setelah itu H<sub>2</sub>DCF-DA ditambahkan ke masing-masing media kultur dengan konsentrasi 10 µM dilanjutkan dengan inkubasi 37°C selama 30 menit dalam gelap. Kemudian pencucian kembali dengan 1X PBS dan dilihat dengan mikroskop fluoresens (mikroskop fluoresens *Zeiss Observer Z.1*, Jerman). Foto hasil pengamatan dianalisis untuk menghitung fraksi keseluruhan dari sel terfluoresensi hijau menggunakan *Image J Software* (Veronica *et al.*, 2021). Persentase sel penghasil ROS adalah sel dengan intensitas fluoresensi warna hijau dibagi dengan jumlah total sel dikalikan 100 (Gouzos *et al.*, 2020).

### C. Analisis Data

Data pengamatan dengan *Image J* dilakukan uji normalitas, jika  $p > 0,05$  dilanjut dengan uji parametrik *ONEWAY ANOVA*, jika ada perbedaan signifikan dilakukan uji *post hoc* Tukey.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji memperlihatkan kelompok fibroblas yang diberikan stressor sebagai kontrol negatif dengan

kelompok pembanding tanpa stressor ( $p < 0,05$ ) terjadi peningkatan intensitas sel yang terflouresen hijau (produksi ROS) sebesar 53,53%. Sel secara alami akan membentuk radikal bebas sebagai akibat dari reaksi enzimatik dan nonenzimatik (Nita dan Grzybowski, 2016). Produksi ROS pada kondisi normal, terbentuk dalam jumlah sedikit dibandingkan pada saat mengalami stres oksidatif, hal ini dikarenakan produksi ROS dalam jumlah normal hanya digunakan sebagai bakterisida dan fungisida serta berperan dalam mengatur pertumbuhan sel (Juan *et al.*, 2021).

Hasil induksi  $H_2O_2$  pada fibroblas terbukti mampu meningkatkan pembentukan ROS dengan tingkat intensitas sel terflouresen hijau yang tinggi.  $H_2O_2$  merupakan molekul menembus dinding sel dan bersifat reaktif dalam menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi Fenton akan mengubah  $Fe^{2+}$  atau  $Cu^+$  menjadi OH (Tsuneda dan Fenton, 2020). Stres oksidatif akibat peningkatan produksi ROS memberikan efek pada fibroblas seperti terganggunya migrasi, proliferasi, dan sintesis dari matriks ekstraseluler (Deng *et al.*, 2021).

Kelompok yang diberikan asam askorbat menunjukkan nilai  $p < 0,05$  dengan kelompok yang hanya diberikan *stressor*, pemberian asam askorbat mampu menurunkan intensitas sel terflouresen

hijau sebesar 39,56%. Asam askorbat adalah antioksidan non enzimatis yang dapat mendonasi elektron serta mencegah suatu senyawa berikatan dengan radikal bebas (Wibawaa *et al.*, 2020), sehingga mampu menurunkan produksi ROS dengan intensitas sel terflouresen hijau yang menurun.

Kelompok yang diberikan nano kitosan pada konsentrasi 200, 400, dan 600  $\mu\text{g/mL}$  berbeda signifikan dengan kelompok yang diberikan *stressor* tanpa pemberian nano kitosan, pemberian nano kitosan mampu menurunkan intensitas sel terflouresen hijau berturut-turut sebesar 17,41%, 52,59% dan 37,47%. Kelompok nano kitosan konsentrasi 400  $\mu\text{g/mL}$  dan konsentrasi 600  $\mu\text{g/mL}$  tidak memperlihatkan perbedaan signifikan  $p = 0,219$ , namun konsentrasi 400  $\mu\text{g/mL}$  mampu menurunkan intensitas sel terflouresen hijau sebesar 10,99% dibandingkan dengan kelompok nano kitosan 600  $\mu\text{g/mL}$ .

Kelompok kontrol positif yang diberikan asam askorbat tidak menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan  $p = 1,000$  dengan kelompok yang diberikan nano kitosan konsentrasi 400  $\mu\text{g/mL}$ , namun pemberian nano kitosan 400  $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan peningkatan intensitas sel terflouresen hijau sebesar 8,44% dibandingkan dengan kelompok yang diberikan asam askorbat

(Tabel I).

Kitosan merupakan bahan alam yang dapat diperoleh dari beberapa hewan laut dan serangga seperti kumbang tanduk. Bentuk kitosan dapat dimodifikasi secara fisik dengan metode gelasi ionik menjadi partikel nano dengan ukuran berkisar antara 296.75-302.75 nm (Komariah, 2020). Pengecilan partikel mempermudah kitosan untuk berdifusi dalam mengantar suatu bahan aktif ke dalam sel. Kemampuan kitosan dalam menurunkan produksi ROS melalui dua gugus reaktif amino (-NH<sub>2</sub>) dan hidroksil (-OH) sebagai gugus fungsional antioksidan, sehingga mampu menurunkan aktivitas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, dan OH<sup>-</sup> melalui pengikatan ion radikal bebas (Irina dan Varlomov, 2016). Gambar 2 memperlihatkan hasil pengamatan intensitas fluoresen hijau pada fibroblas menggunakan mikroskop fluoresens *Zeiss Observer Z.1*.

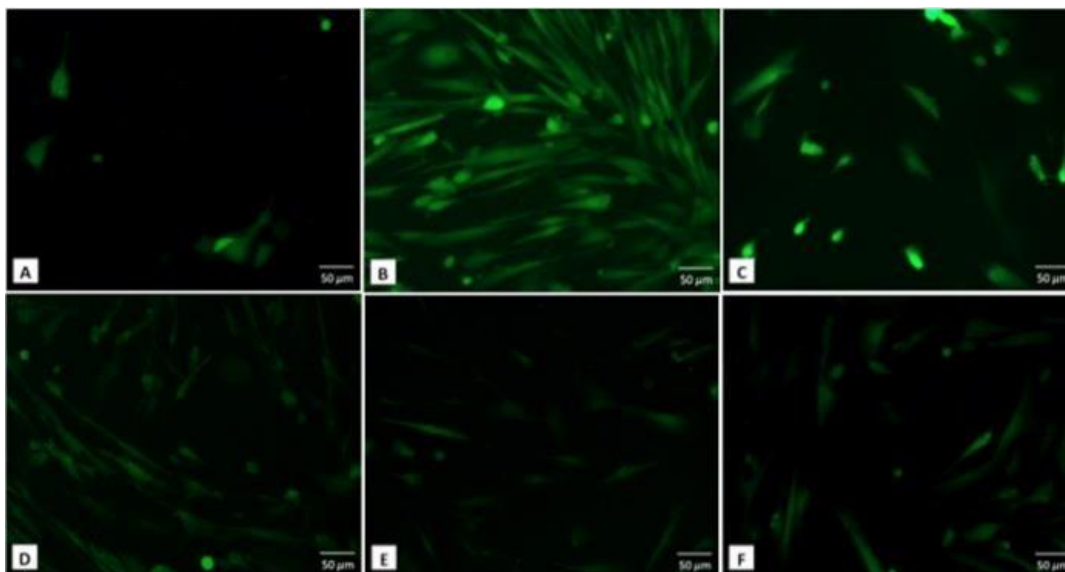
Peningkatan produksi ROS yang terlalu tinggi dapat menyebabkan

terhambatnya fibroblas dalam membentuk matriks ekstraseluler yang mengakibatkan proses penyembuhan luka terganggu. Fibroblas pada proses penyembuhan luka berperan dalam membentuk protein berupa serat kolagen, elastin, dan retikulin serta beberapa substansi dasar seperti glikosaminoglikan dan proteoglikan yang menyusun suatu matriks ekstraseluler (Irawan, 2018). Ketidakutuhan dari matriks yang terbentuk akan menghambat terjadinya proses penyembuhan luka (Wells dan Nuschke, 2016).

Hasil penelitian memperlihatkan pemberian nano kitosan kumbang tanduk dapat menurunkan produksi ROS pada konsentrasi efektif 400 µg/mL dibandingkan dengan konsentrasi tertinggi (600 µg/mL). Konsentrasi zat yang terabsorpsi terlalu tinggi maka permukaan pori adsorben akan menjadi jenuh sehingga zat yang belum terabsorpsi akan terus berdifusi keluar pori (Padayatty *et al.*, 2022).

**Tabel I.** Intensitas sel terfluoresen hijau

Kelompok	Jumlah sampel (n)	Rerata Intensitas sel (%)	p value
Kontrol negatif	7	26.32 ± 1,90	p < 0,05
Kontrol pembanding	7	56.64 ± 1,04	
Kontrol positif	7	34.24 ± 4,57	
NK 200 µg/ml	7	46.78 ± 4,39	
NK 400 µg/ml	7	37.12 ± 1,88	
NK 600 µg/ml	7	41.20 ± 3,14	



**Gambar 2.** Pengaruh pemberian nano kitosan pada produksi ROS fibroblas, diukur menggunakan probe H2DCF-DA (hijau). Panah merah ROS fibroblas dengan intensitas fluoresensi sel berwarna hijau; A. kelompok tanpa pemberian stressor; B. Kelompok yang diberikan stressor; C. Kelompok kontrol positif; D. Kelompok dengan nano kitosan 200; E. 400; F 600 µg/mL. Pengamatan pada pembesaran 100X

#### IV. KESIMPULAN

Nano kitosan *X. gideon* dapat menurunkan produksi ROS fibroblas setelah diinduksi stressor hidrogen peroksida, pada konsentrasi efektif 400 µg/ml. Penelitian merupakan penelitian mandiri.

#### KONFLIK KEPETINGAN

Seluruh penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

Anura, A. (2014). Traumatic oral mucosal lesions: a mini review and clinical update. *Oral Health and Dental Management*, 13(2), 254-9.

Arief, H., & Widodo, M.A. (2018). Rules of oxidative stress in wound healing.

*Jurnal Ilmu Kedokt Wijaya Kusuma*, 5(2), 22-29.

Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S.E. (2014). Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*, 94(2), 329–354.

Cheung, R.C.F., Ng, T.B., Wong, J.H., & Chan, W.Y. (2015). Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*, 13, 5156-5186.

Deng, L., Du, C., Song, P., Chen, T., Rui, S., Armstrong, D.G., *et al.* (2021). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021.

Ekmekcioglu, H., & Unur, M. (2017). Eye-related trauma and infection in dentistry. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 51(3), 55-63.

Gabbott, C.M., & Sun, T. (2018). Comparison of human dermal fibroblasts and HaCat cells cultured



- in medium with or without serum via a generic tissue engineering research platform. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 388-405.
- Gonzales, A.C., Costa, T.F., Andrade, Z.A., & Medrado, A.R.A.P. (2016). Wound healing: literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614-620.
- Gouzos, M., Ramenzanpour, M., Bassiouni A., Psaltis, A.J., Wormald, P.J., Vreugde, S. (2020). Antibiotics affect ROS production and fibroblast migration in an in-vitro model of sinonasal wound healing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 19(10), 110.
- Iliina, A.V., & Varlamov, V.P. (2016). Neutralization of reactive oxygen species by chitosan and its derivatives in vitro/in vivo: review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52(1), 1-14.
- Irawan, C. (2018). The effect of adsorbate concentration on the effectiveness of decreasing Fe using fly ash as adsorben. *Seminastika*, 291-293.
- Juan, C.A., Lastra, J.M.P., Plou, F.J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular*, 22(9), 4642
- Komariah, A., Laksono, W.A., Bustami, D.A., & Trenggono, B.S. (2017). Effects chitosan and calcium nanoparticles mouthwash from *Xylotrophes gideon* in the liver and kidney rat. *Res J Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 8(1), 1-9.
- Komariah, K., & Astuti, L. (2012). Preparasi dan karakterisasi kitin yang terkandung dalam eksoskeleton kumbang tanduk *Rhinoceros Beetle (Xylotrupes gideon)* dan kutu beras (*Sitophilus Oryzae L.*). Seminar Nasional IX Pendidikan Biologi FKIP UNS 2012 (SEMBIO).
- Komariah, K. (2013). Karakterisasi kitin dan kitosan yang terkandung dalam eksoskeleton kutu beras (*Sitophilus oryzae*). Seminar Nasional IX Pendidikan Biologi FKIP UNS 2013 (SEMBIO).
- Komariah, K. (2020). Proses pembuatan nano kitosan dari rhinoceros beetle dan komposisinya sebagai obat kumur antiseptik [Patent]. P00201507360. 12 Mei 2020.
- Kurniawati, Y., Adi, S., Achadiyani, Suwarsa, O., Erlangga, D., & Putri, T. (2015). Kultur primer fibroblas: penelitian pendahuluan. *Majalah Kedokteran Andalas*, 38(1), 33-40.
- Masir, O., Manjas, M., Putra, A.E., & Agus, S. (2012). Pengaruh cairan kultur filtrate fibroblast (CFF) terhadap penyembuhan luka: penelitian eksperimental pada *rattus novegicus galur wistar*. *Jurnal Kesehatan Andalas*, (3), 112-117.
- Nita, M., & Grzybowski, A. (2016). The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-23.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., *et al.* (2014). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American Nutrition Association*, 22(1), 18-35.
- Patil, P.S., & Leipzig, N.D. (2018). Fluorinated methacrylamide chitosan sequesters reactive oxygen species to relieve oxidative stress while delivering oxygen. *Journal of Biomedical Materials Research*, 105(8), 2368-2374.
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and

- Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*,30(1),11–26.
- Pisoschi, A.M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*,97:55–74.
- Sudha, P.N., Gomathi, T., & Aisverya, S. (2015). Recent research in the applications of chitin, chitosan and oligosaccharides. *Green Polymers and Environmental Pollution Control*, Chapter 10, Department of Chemistry, D.K.M. College for Women, Thiruvalluvar University, Vellore, Tamilnadu, India 303-333.
- Tsuneda, T. (2020). Fenton reaction mechanism generating no OH radicals in Nafon membrane decomposition. *Scientific Reports*,10:18144.
- Veronica, G., Komariah, K., & Maria, G.C. (2021). Microencapsulation of Lemongrass Leaves Effect on Reactive Oxygen Species (ROS) Fibroblasts. *International Conference on Health, Instrumentation & Measurement, and Natural Sciences (InHeNce)*. DOI: 10.1109/InHeNce52833.2021.9537219.
- Wells, A., Nuschke, A., & Yates, C.C. (2016). Skin tissue repair: matrix microenvironmental influences. *Matrix Biology*, 49, 1-20.
- Wibawaa, J.C., Arifin, M.Z., & Herawatia, L. (2020). Mekanisme Vitamin C Menurunkan Stres Oksidatif Setelah Aktivitas Fisik. *Journal of Sport Science and Education*,5(1),57-63.
- Yuslianti, E.R., Bachtiar, B.M., Suniarti, D.F., Sutjiatmo, A.B. (2015). Effect of topical rambutan honey pharmaceutical grade on oral mucosa wound healing based on tissue wound closure and fibroblasts proliferation in vivo. *International Journal of Pharmacology*,11(7),864-869.