

3. HASIL PENELITIAN

3.1. Karakteristik Hidrolisat Kolagen

Kolagen hasil ekstraksi, baik dengan bantuan larutan asam, basa, enzim, maupun dengan pemanasan dapat diolah lebih lanjut dengan metode hidrolisis untuk menghasilkan senyawa dengan berat molekul yang lebih rendah, dengan sifat hidrofilik, yang dikenal sebagai hidrolisat kolagen atau peptida kolagen. Terdapat berbagai jenis metode hidrolisis, namun metode yang paling utama digunakan untuk mendapatkan hidrolisat dengan berat molekul rendah adalah metode hidrolisis enzimatik (Hong *et al.*, 2019). Hidrolisis enzimatik protein dilakukan dengan enzim proteolitik, yang tidak membutuhkan suhu tinggi, dan dapat memecah ikatan peptida yang spesifik, sehingga dapat digunakan untuk memproduksi peptida kolagen dengan profil tertentu yang sudah terstandarisasi (Marcet *et al.*, 2016). Jenis enzim komersial yang dapat digunakan meliputi enzim papain, alkalase, *α -chymotrypsin*, neutrase, pepsin, *flavourzyme*, tripsin, pronase E, kolagenase, dan bromelin.

Proses hidrolisis enzimatik protein perlu diawali dengan perlakuan pendahuluan seperti melarutkan atau homogenisasi ekstrak kolagen dalam larutan asam, basa, ataupun garam pada suhu yang terkontrol untuk mencapai pH dan suhu optimal yang spesifik pada masing-masing jenis enzim. Perlakuan pendahuluan dilakukan untuk mengkondisikan ekstrak kolagen. Hasil hidrolisis dipengaruhi secara positif maupun negatif oleh kondisi proses, meliputi pH, suhu, dan durasi hidrolisis (Chi *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2019), sehingga umumnya hidrolisis enzimatik dilakukan dalam kondisi yang terkontrol (Coppola *et al.*, 2020).

3.1.1. Kelarutan Hidrolisat Kolagen dan Pengaruh pH terhadap Kelarutan Hidrolisat Kolagen

Penelitian yang telah dilakukan untuk mengukur kelarutan hidrolisat kolagen yang diuji pada pH pelarut 4, 7, dan 10 dapat dilihat pada Tabel 2. Sementara, penelitian yang telah dilakukan untuk mengukur kelarutan hidrolisat kolagen yang diuji pada pH pelarut 1, 3, 5, 7, dan 11 dapat dilihat pada Tabel 3. Hidrolisat didapatkan dari proses hidrolisis enzimatik menggunakan enzim tripsin (Chi *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2013), pepsin (Chi *et al.*, 2014), dan protease (Alolod *et al.*, 2019) yang diambil dari sumber hewan air (*marine*). Sebelum dilakukan hidrolisis, bahan yang digunakan diberi perlakuan

pendahuluan berupa homogenisasi menggunakan larutan asam asetat untuk mencapai pH yang dibutuhkan dalam proses hidrolisis. Peptida hasil penelitian hidrolisis enzimatis kolagen yang ditinjau memiliki kisaran berat molekul rata-rata antara 1,07 – 255,42 kDa.

Pengukuran kelarutan hidrolisat kolagen oleh Chi *et al.* (2016), Li *et al.* (2013), dan Chi *et al.* (2014) dilakukan menggunakan metode Tsumura *et al.* (2005), yaitu dengan melarutkan 200 mg sampel hidrolisat kolagen *freeze dried* ke dalam 20 ml air destilasi deionasi, lalu pH larutan diatur dengan menambahkan HCl atau NaOH hingga mencapai pH 4 atau 7 atau 10. Pengaturan pH dilakukan untuk meninjau kelarutan hidrolisat kolagen dalam pelarut yang memiliki pH tertentu, sehingga dipilih kisaran pH yang luas. Larutan kemudian diaduk secara magnetik selama 30 menit pada suhu ruang ($25\pm 1^\circ\text{C}$) dan disentrifugasi pada 10.000 g selama 15 menit, lalu diencerkan.

Berdasarkan metode-metode tersebut, dapat diketahui bahwa hidrolisat kolagen memiliki kelarutan yang baik dan tergolong tinggi ($56,72 \pm 2,74\%$ – $98,61\%$). Kelarutan yang terendah ($56,72 \pm 2,74\%$) ditemukan pada sampel hidrolisat kolagen *Sphyrna lewini* yang diuji pada pH 7 yang netral (Li *et al.*, 2013). Hidrolisat tersebut termasuk dalam hidrolisat berat molekul tinggi dibandingkan dengan hasil lain yang ditinjau, yaitu 255,42 kDa. Kelarutan hidrolisat yang tertinggi ($98,61\%$) diperoleh dari hidrolisat kolagen Kulit *S. nipponius* pada pH pengujian yang lebih asam yaitu 4, dan memiliki berat molekul rata-rata yang lebih rendah yaitu sebesar 5,04 kDa (Chi *et al.*, 2014). Hasil tersebut menunjukkan bahwa berat molekul memiliki pengaruh terhadap kelarutan, dimana berat molekul hidrolisat yang semakin kecil akan memiliki kelarutan yang lebih baik.

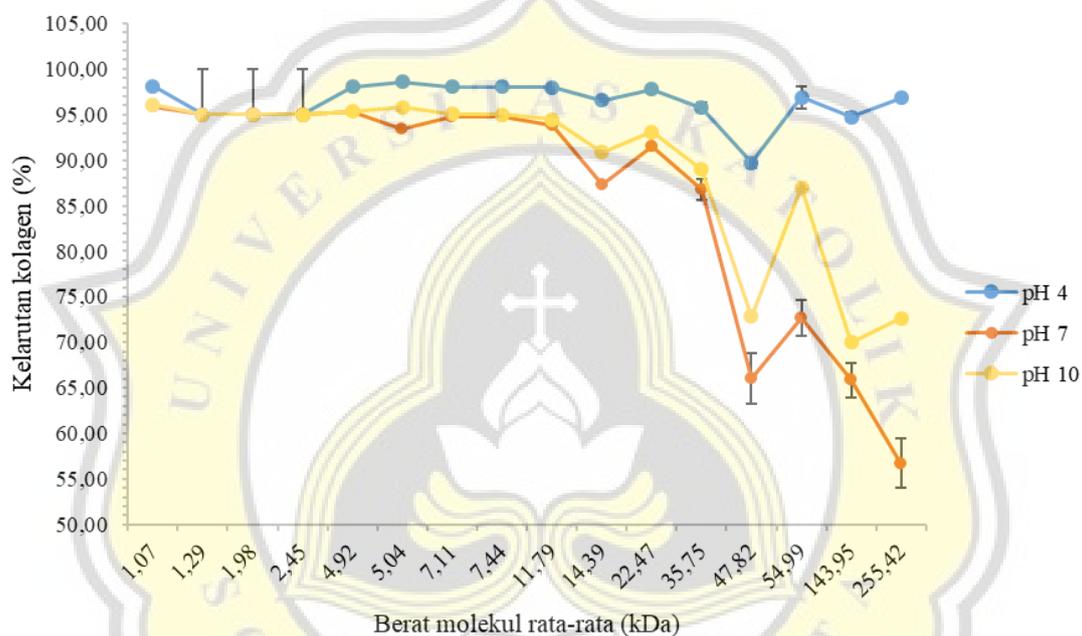
Berdasarkan Tabel 2, berat molekul juga dapat menentukan pengaruh pH pelarut terhadap kelarutan hidrolisat. Pada hidrolisat dengan berat molekul yang lebih tinggi, pengaruh pH terlihat dari adanya penurunan kelarutan dari yang tertinggi pada pH 4, hingga mencapai kelarutan terendah pada pH 7 yang terendah yaitu $56,72 \pm 2,74\%$ (Chi *et al.*, 2016; Chi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013). Kelarutan akan kembali meningkat ketika pelarut yang digunakan bersifat lebih basa dengan pH 10, menghasilkan kelarutan hidrolisat hingga lebih dari 70% (Chi *et al.*, 2014; Z. Li *et al.*, 2013). Sedangkan pada

hidrolisat dengan berat molekul yang lebih rendah, ditemukan bahwa pengaruh pH terhadap kelarutan tidak signifikan. Ditunjukkan pada hasil hidrolisis kolagen dengan berat molekul 1,07-11,79 kDa yang memiliki kelarutan lebih dari 90% pada seluruh kisaran pH yang diuji (Chi *et al.*, 2016; Chi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013).

Tabel 2. Kelarutan Hidrolisat Kolagen berdasarkan Berat Molekul Rata-rata Dipengaruhi oleh pH Pelarut (4, 7, dan 10)

No.	Bahan	Berat Molekul Rata-rata (kDa)	Kelarutan (%)			Referensi
			pH 4	pH 7	pH 10	
1	<i>Sphyrna lewini</i>	1,07	98,14	95,84	96,06	(Li <i>et al.</i> , 2013)
2	<i>Dasyatis akajeii</i>	1,29	> 95	> 95	> 95	(Chi <i>et al.</i> , 2016)
3	<i>Raja porosa</i>	1,98	> 95	> 95	> 95	(Chi <i>et al.</i> , 2016)
4	<i>Sphyrna lewini</i>	2,45	> 95	> 95	> 95	(Chi <i>et al.</i> , 2016)
5	<i>Raja porosa</i>	4,92	98,08	95,24	95,35	(Li <i>et al.</i> , 2013)
6	Kulit <i>S. niphonius</i>	5,04	98,61	93,43	95,81	(Chi <i>et al.</i> , 2014)
7	<i>Dasyatis akajeii</i>	7,11	98,05	94,78	95,06	(Li <i>et al.</i> , 2013)
8	<i>Raja porosa</i>	7,44	98,04	94,71	95,02	(Li <i>et al.</i> , 2013)
9	<i>Raja porosa</i>	11,79	97,97	93,78	94,46	(Li <i>et al.</i> , 2013)
10	Kulit <i>S. niphonius</i>	14,39	96,57	87,25	90,84	(Chi <i>et al.</i> , 2014)
11	<i>Raja porosa</i>	22,47	97,81	91,51	93,08	(Li <i>et al.</i> , 2013)
12	<i>Dasyatis akajeii</i>	35,75	95,77 ± 0,59	86,76 ± 1,13	89	(Chi <i>et al.</i> , 2016)
13	Kulit <i>S. niphonius</i>	47,82	89,71 ± 0,52	65,98 ± 2,76	72,87 ± 1,65	(Chi <i>et al.</i> , 2014)
14	<i>Raja porosa</i>	54,99	96,87 ± 1,16	72,66 ± 1,94	87	(Chi <i>et al.</i> , 2016)
15	<i>Sphyrna lewini</i>	143,95	94,76 ± 0,46	65,87 ± 1,89	70	(Li <i>et al.</i> , 2013)
16	<i>Sphyrna lewini</i>	255,42	96,86 ± 0,11	56,72 ± 2,74	72,65 ± 1,86	(Li <i>et al.</i> , 2013)

Hasil peninjauan terhadap berbagai penelitian yang ditampilkan dalam Tabel 2 disajikan secara grafis pada Grafik 1 untuk memudahkan pengamatan pengaruh pH terhadap kelarutan hidrolisat kolagen berdasarkan berat molekulnya. Pemetaan Grafik 1 berupa penempatan berat molekul hidrolisat kolagen pada sumbu X dan persentase kelarutan protein kolagen pada sumbu Y. Berdasarkan grafik tersebut, pengaruh pH terhadap kelarutan hidrolisat kolagen semakin kuat dengan semakin besarnya berat molekul kolagen. Penurunan kelarutan yang besar terjadi pada pH 7 dan 10, sedangkan pada pH 4 kelarutan yang tinggi dapat dipertahankan pada persentase lebih dari 89%.



Grafik 1. Hubungan antara kelarutan dengan berat molekul rata-rata hidrolisat kolagen dipengaruhi oleh pH pelarut

Sementara, penelitian yang dilakukan oleh Alolod *et al.* (2019) mengamati lebih dekat pengaruh tingkatan pH yang lebih bervariasi, dibandingkan terhadap penelitian-penelitian yang ditinjau dalam Tabel 2, terhadap hidrolisat kolagen dengan berat molekul yang kecil, yaitu ≤ 10 kDa. Metode yang digunakan adalah metode Nalinanon *et al.* (2011) yang mirip dengan metode Tsumura *et al.* (2005), namun menggunakan konsentrasi hidrolisat, pH pelarut, dan kecepatan sentrifugasi yang berbeda. Hidrolisat sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 8 ml air destilasi deionasi, lalu dengan penambahan NaOH atau HCl pH diatur hingga mencapai pH 1, 3, 5, 7, 9, dan 11. Larutan kemudian diaduk dalam suhu ruang selama 30 menit dan disentrifugasi pada 5000 g selama 15

menit. Kandungan protein di dalam supernatan dan suspensi yang tersisa diukur dengan metode Lowry (Alolod *et al.*, 2019; Chi *et al.*, 2016, 2014; Li *et al.*, 2013) menggunakan serum albumin *bovine* (BSA) sebagai standard. Persentase kelarutan kolagen dihitung sebagai persen distribusi protein di dalam supernatan dibandingkan dengan kandungan protein total larutan.

Hasil penelitian Alolod *et al.* (2019) dijabarkan pada Tabel 3. Berdasarkan tabel tersebut, dapat dilihat bahwa hidrolisat kolagen dengan berat molekul rendah menunjukkan kelarutan di atas 90% pada larutan yang bersifat asam (pH 1 dan 3) dan basa (pH 11), meskipun pengaruh pH terhadap kelarutan tidak sekuat pengaruhnya yang ditemukan pada hidrolisat kolagen berat molekul tinggi. Dapat dilihat juga bahwa kelarutan terendah hidrolisat kolagen berada pada pH 5, yaitu 79,38% (Alolod *et al.*, 2019)

Tabel 3. Kelarutan Hidrolisat Kolagen Kulit *Naso thynnoides* Berat Molekul Rendah (≤ 10 kDa) Dipengaruhi oleh pH pelarut (Alolod *et al.*, 2019)

pH	Kelarutan (%)
1	97,12
3	90
5	79,38
7	± 80
9	± 80
11	96,34

3.1.2. Viskositas Hidrolisat Kolagen

Hasil penelitian untuk mengukur viskositas hidrolisat kolagen dapat dilihat pada Tabel 4. Berdasarkan tabel tersebut, hidrolisat yang diuji viskositasnya memiliki kisaran berat molekul rata-rata sebesar 5-15 kDa, dan didapatkan dari berbagai sumber hewani seperti *ovine*, *marine*, dan unggas. Berbagai bahan dasar tersebut diekstrak kolagennya dan dihidrolisis secara enzimatik, menggunakan enzim tripsin (Fuentes-Jiménez *et al.*, 2019), alkalase (Schmidt *et al.*, 2020), dan *flavourzyme* (Schmidt *et al.*, 2020) pada suhu dan waktu yang optimal, disesuaikan dengan jenis enzim yang digunakan. Hidrolisis dapat juga dilakukan dengan alat bantu reaktor membrane kontinyu menggunakan enzim alkalase (Tauntong *et al.*, 2014). Sebelum melalui proses hidrolisis, ekstrak kolagen diberi perlakuan pendahuluan yang berupa pelarutan dengan larutan basa

(NaCO₃, NaOH dan/atau H₂O₂), larutan asam (H₂SO₄ dan/atau CH₃COOH), atau *buffer* fosfat, disesuaikan dengan jenis enzim yang digunakan.

Seluruh penelitian mengenai viskositas hidrolisat kolagen yang tercantum pada Tabel 4 dilakukan dengan menggunakan alat bantu viskometer Brookfield. Larutan hidrolisat diletakkan di dalam tabung kaca terinsulasi pada suhu yang telah ditentukan, kemudian *spindle* dengan jenis tertentu yang berbahan logam diputar di dalam tabung larutan. Torsi yang dibutuhkan untuk memutar *spindle* lalu diukur. Viskositas hidrolisat kolagen ditentukan berdasarkan tolakan internal pada rotasi *spindle* akibat tegangan geser larutan hidrolisat, dan dinyatakan dengan satuan *centipoise* (cP) (Fuentes-Jiménez *et al.*, 2019; Hema *et al.*, 2017). Fuentes-Jiménez *et al.* (2019) menggunakan viskometer dengan kecepatan 100 rpm dengan *spindle* nomor 5, setelah semua sampel telah dikondisikan pada suhu 7°C. Mohammad *et al.*, (2015) juga menggunakan alat bantu viskometer (60 rpm, *spindle* nomor 1), setelah melarutkan 5% (w/v) hidrolisat kolagen ke dalam air destilasi pada suhu 60°C. Metode tersebut merupakan bentuk adaptasi dari percobaan yang dilakukan oleh Cho *et al.* (2006) dan Ninan *et al.* (2014) menggunakan sampel gelatin. Schmidt *et al.* (2020) menggunakan modifikasi dari metode Kittiphattanabawon *et al.* (2010) dengan melarutkan 0,03% (w/v) hidrolisat kolagen ke dalam asam asetat 0,1 M, lalu menggunakan viskometer (100 rpm, *spindle* nomor 1), viskositas larutan diukur pada suhu 10, 25, dan 50°C.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dan dirangkum dalam Tabel 4, diketahui bahwa viskositas hidrolisat kolagen yang terendah adalah 0,5 cP, yang diukur dari peptida hasil hidrolisis enzimatis tripsin kulit domba dengan berat molekul rata-rata sebesar 5,62 kDa (Fuentes-Jiménez *et al.*, 2019). Sedangkan yang tertinggi adalah 10,90 ± 0,22 cP, yang diukur dari peptida hasil hidrolisis residu produksi ayam potong dengan berat molekul rata-rata < 15 kDa (Schmidt *et al.*, 2020). Dari kedua hasil tersebut, dapat diduga bahwa berat molekul rata-rata hidrolisat kolagen mempengaruhi viskositas larutan yang dihasilkan. Dugaan ini dibuktikan juga dengan viskositas hidrolisat gelatin sisik *Oreochromis* spp., yaitu sebesar 2,27-2,54 cP dengan berat molekul rata-rata lebih besar dari hasil penelitian Fuentes-Jiménez *et al.* (2019), yaitu < 10 kDa (Mohammad *et al.*, 2015). Berdasarkan Tabel 4 juga dapat diamati adanya pengaruh suhu larutan terhadap viskositasnya. Schmidt *et al.* (2020) menemukan hasil viskositas yang berbeda

pada suhu yang berbeda pula. Semakin tinggi suhu larutan, maka viskositasnya akan semakin menurun, terbukti dengan viskositas larutan hidrolisat kolagen yang dihasilkan, yaitu sebesar $10,30 \pm 0,24$ cP pada suhu 10°C , $9,55 \pm 0,24$ cP pada suhu 25°C , dan $7,48 \pm 0,42$ cP pada suhu 50°C . Pengaruh suhu ini terlihat pada hidrolisat dengan berat molekul <15 kDa.

Tabel 4. Viskositas Hidrolisat Kolagen

No.	Bahan dasar	Berat Molekul Rata-rata (kDa)	Viskositas (cP)	Referensi
1	Kulit domba	5,62	0,5	(Fuentes-Jiménez, <i>et al.</i> , 2019)
2	Gelatin sisik <i>Oreochromis</i> spp., Residu	< 10	2,27-2,54	(Mohammad <i>et al.</i> , 2015)
3	produksi ayam potong Residu	< 15	$10,30 \pm 0,24^*$	(Schmidt <i>et al.</i> , 2020)
4	produksi ayam potong Residu	< 15	$9,55 \pm 0,24^{**}$	(Schmidt <i>et al.</i> , 2020)
5	produksi ayam potong Residu	< 15	$7,48 \pm 0,42^{***}$	(Schmidt <i>et al.</i> , 2020)
6	produksi ayam potong Residu	< 15	$10,90 \pm 0,22^*$	(Schmidt <i>et al.</i> , 2020)
7	produksi ayam potong Residu	< 15	$10,25 \pm 0,13^{**}$	(Schmidt <i>et al.</i> , 2020)
8	produksi ayam potong Kulit	< 15	$8,67 \pm 0,60^{***}$	(Schmidt <i>et al.</i> , 2020)
9	<i>Oreochromis niloticus</i>	-	0,7	(Tauntong <i>et al.</i> , 2014)

Keterangan:

* = diuji pada suhu 10°C

** = diuji pada suhu 25°C

*** = diuji pada suhu 50°C

3.1.3. Bioavailabilitas Oral Hidrolisat Kolagen

Bioavailabilitas kolagen secara tidak langsung dapat ditinjau dengan mengevaluasi bioavailabilitas *in vivo* asam amino hidroksiprolin (Hyp), yang merupakan salah satu

penyusun utama molekul kolagen, di dalam plasma darah dalam interval waktu tertentu. Penelitian klinis yang telah dilakukan menggunakan hidrolisat kolagen yang bersumber dari bagian kaki, tulang rawan, kulit, dan sisik hewan unggas, ikan (*marine*), dan babi (*porcine*), dengan kisaran berat molekul rata-rata 1-12,50 kDa. Penelitian dilakukan secara klinis dengan subjek manusia berusia 25-37 tahun. Pengambilan sampel plasma darah dilakukan dalam interval waktu tertentu setelah konsumsi hidrolisat kolagen dengan dosis 0,03-0,42 g/kg berat badan subjek. Hasil dari penelitian yang telah ditinjau tercantum di dalam Tabel 5.

Berdasarkan tabel tersebut, diketahui bahwa hidrolisat kolagen dapat diketahui keberadaannya di dalam plasma darah ditandai dengan keberadaan asam amino Hyp dalam bentuk bebas (Iwai *et al.*, 2005; Ohara *et al.*, 2007; Shigemura *et al.*, 2014) dan dalam bentuk peptida, baik dipeptida maupun tripeptida yang mengandung Hyp (Iwai *et al.*, 2005; Ohara *et al.*, 2007; Shigemura *et al.*, 2011, 2014). Analisis dilakukan dengan menggunakan fenilisotiosianat (PITC) dan dilanjutkan dengan HPLC untuk menentukan kadar asam amino Hyp bebas di dalam darah (Bidlingmeyer *et al.*, 1984; Sato *et al.*, 1992). Sedangkan kadar peptida yang mengandung Hyp diestimasi dengan selisih konsentrasi asam amino Hyp bebas dengan konsentrasi Hyp seluruhnya di dalam hidrolisat HCl dari fraksi plasma darah awal yang telah melalui proses deproteinasi menggunakan etanol (Iwai *et al.*, 2005; Ohara *et al.*, 2007; Shigemura *et al.*, 2011, 2014). Bioavailabilitas hidrolisat kolagen dilihat dari konsentrasi maksimum (C_{max} , nmol/ml) Hyp baik dalam bentuk bebas maupun dalam bentuk peptida, serta waktu yang dibutuhkan untuk mencapai konsentrasi maksimum (T_{max} , jam) tersebut untuk membuktikan kemampuan penyerapan peptida kolagen.

Dari hasil yang telah ditinjau, didapatkan bahwa untuk mencapai konsentrasi Hyp maksimum di dalam darah, dibutuhkan waktu sekitar 1-2 jam setelah konsumsi suplemen hidrolisat kolagen, kecuali pada hidrolisat kolagen bersumber dengan dosis paling kecil, yaitu 0,03 g/kg berat badan, yang hanya membutuhkan waktu 15 menit hingga 2 jam untuk mencapai konsentrasi maksimum (Shigemura *et al.*, 2014). Keseragaman T_{max} untuk kedua bentuk Hyp mengindikasikan bahwa perbedaan berat molekul hidrolisat tidak mempengaruhi waktu penyerapan secara signifikan. Pengecualian pada penelitian dengan dosis hidrolisat kolagen yang paling kecil (0,03

g/kg berat badan), menunjukkan adanya pengaruh dosis terhadap T_{max} yang signifikan. Semakin kecil dosis kolagen yang diberikan, waktu untuk mencapai konsentrasi tertinggi semakin cepat.

Selain membutuhkan waktu paling singkat untuk mencapai konsentrasi maksimum, dosis hidrolisat 0,03 g/kg berat badan juga menghasilkan C_{max} yang paling kecil pula, yaitu hanya 13,55 nmol/ml untuk peptida yang mengandung Hyp dan 21,53 nmol/ml untuk Hyp bebas (Shigemura *et al.*, 2014). Rendahnya konsentrasi Hyp mengindikasikan bahwa dosis suplemen kolagen yang diberikan akan berpengaruh terhadap konsentrasi Hyp maksimum di dalam plasma darah. Dibuktikan juga dengan penemuan-penemuan lainnya, dimana semakin besar dosis yang diberikan, semakin besar pula konsentrasi Hyp maksimum yang dapat dicapai. Konsentrasi maksimum peptida Hyp tertinggi didapati pada hidrolisat kolagen yang bersumber dari gelatin sisik ikan dengan berat molekul rata-rata 5 kDa, yaitu ± 140 nmol/ml dengan T_{max} 2 jam. Sementara konsentrasi maksimum Hyp bebas didapati pada sampel yang sama, yaitu ± 120 nmol/ml dengan T_{max} 2 jam (Ohara *et al.*, 2007). Perbedaan berat molekul hidrolisat yang digunakan tidak berpengaruh secara kuat terhadap C_{max} baik untuk peptida mengandung Hyp maupun asam amino Hyp. Nilai C_{max} hidrolisat dengan berat molekul 12,50 kDa masih dapat mencapai nilai C_{max} hidrolisat kolagen berat molekul 5 kDa dengan dosis yang sama.

Tabel 5. Bioavailabilitas Peptida dan Asam Amino Hidroksiprolin Berdasarkan Hasil Pengujian Klinis Suplementasi Oral Hidrolisat Kolagen

No.	Sumber Hidrolisat Kolagen	Berat Molekul Rata-rata (kDa)	Dosis (g/kg berat badan)	C_{max} (nmol/ml)	T_{max} (jam)	Referensi
Peptida mengandung Hyp						
1	Kaki ayam	12,50	0,38	60	1,00 \pm 0,00	(Iwai <i>et al.</i> , 2005)
2	Tulang rawan ayam	12,05	0,18	25	2,00 \pm 0,00	(Iwai <i>et al.</i> , 2005)
3	Gelatin sisik ikan	1	0,42	± 120	1,00 \pm 0,00 - 2,00 \pm 0,00	(Shigemura <i>et al.</i> , 2011)
4	Gelatin sisik ikan	5	0,38	± 140	2,00 \pm 0,00	(Ohara <i>et al.</i> , 2007)

5	Gelatin kulit ikan	5	0,38	± 60	$2,00 \pm 0,00$	(Ohara <i>et al.</i> , 2007)
6	Gelatin kulit babi	5	0,38	± 80	$2,00 \pm 0,00$	(Ohara <i>et al.</i> , 2007)
7	Gelatin kulit <i>Gadus macrocephalus</i>	1-5	0,03	13,55	$0,25 \pm 0,00$ $- 2,00 \pm 0,00$	(Shigemura <i>et al.</i> , 2014)
8	Gelatin kulit <i>Gadus macrocephalus</i>	1-5	0,15	20,66	$1,00 \pm 0,00$ $- 2,00 \pm 0,00$	(Shigemura <i>et al.</i> , 2014)
9	Gelatin kulit <i>Gadus macrocephalus</i>	1-5	0,38	41,09	$1,00 \pm 0,00$ $- 2,00 \pm 0,00$	(Shigemura <i>et al.</i> , 2014)

Asam amino bebas Hyp

1	Kaki ayam	12,50	0,38	150	$1,00 \pm 0,00$	(Iwai <i>et al.</i> , 2005)
2	Tulang rawan ayam	12,05	0,18	60	$2,00 \pm 0,00$	(Iwai <i>et al.</i> , 2005)
3	Gelatin sisik ikan	5	0,38	± 120	$2,00 \pm 0,00$	(Ohara <i>et al.</i> , 2007)
4	Gelatin kulit ikan	5	0,38	± 70	$1,00 \pm 0,00$	(Ohara <i>et al.</i> , 2007)
5	Gelatin kulit babi	5	0,38	± 110	$2,00 \pm 0,00$	(Ohara <i>et al.</i> , 2007)
6	Gelatin kulit <i>Gadus macrocephalus</i>	1-5	0,03	21,53	$1,00 \pm 0,00$	(Shigemura <i>et al.</i> , 2014)
7	Gelatin kulit <i>Gadus macrocephalus</i>	1-5	0,15	56,87	$1,00 \pm 0,00$	(Shigemura <i>et al.</i> , 2014)
8	Gelatin kulit <i>Gadus macrocephalus</i>	1-5	0,38	96,72	$1,00 \pm 0,00$ $- 2,00 \pm 0,00$	(Shigemura <i>et al.</i> , 2014)

Keterangan:

C_{\max} = konsentrasi maksimum di dalam darah

T_{\max} = waktu yang dibutuhkan untuk mencapai C_{\max}

Penelitian lain yang telah ditinjau mengindikasikan bahwa bioavailabilitas suplemen kolagen dapat dipengaruhi juga oleh kandungan komponen anti nutrisi dalam bahan campuran dalam formulasi produk suplemen. Bilek dan Bayram (2015) mengamati kemungkinan ini dengan menguji bioavailabilitas *in vitro* produk suplemen kolagen berupa minuman sari buah pasteurisasi yang diberi tambahan hidrolisat kolagen *marine* (2 kDa) sebanyak 2,5 mg/100 ml larutan sari buah. Analisa dilakukan dengan dicampurkannya sejumlah larutan sampel sari buah dengan enzim pepsin. Sebagian dari

campuran tersebut kemudian dicampurkan dengan larutan pankreas dan asam empedu, lalu dititrasi dengan larutan NaHCO_3 0,5 M. Larutan NaHCO_3 0,5 M yang tersisa dari proses titrasi dicampurkan bersama dengan air murni ke dalam tabung dialisis untuk proses dialisis dengan larutan campuran sari buah – enzim pepsin, serta sari buah – larutan pankreas dan asam empedu. Dialisat yang dihasilkan digunakan untuk menghitung persentase bioavailabilitas hidrolisat kolagen dalam sampel dengan membandingkan jumlah kolagen di dalam dialisat terhadap jumlah kolagen total di dalam sampel (Gil-Izquierdo *et al.*, 2001).

Hasil analisa dapat dilihat pada Tabel 6. Dari analisa tersebut, diketahui bahwa sari buah dengan tambahan hidrolisat kolagen memiliki bioavailabilitas *in vitro* yang tertinggi yaitu $95,37 \pm 2,13\%$ pada minuman sari buah jeruk, dan yang terendah $83,38 \pm 0,57\%$ pada minuman campuran sari buah jeruk dan anggur hijau. Perbedaan pada setiap produk dengan bahan dasar sari buah yang berbeda, mengindikasikan bahwa pemilihan jenis bahan yang digunakan akan berpengaruh pada bioavailabilitas produk suplementasi. Namun dari keempat hasil tersebut bioavailabilitas produk masih berada di atas 80% yang dinilai cukup tinggi.

Tabel 6. Potensi Pengaruh Komponen Anti Nutrisi Fenolik di dalam Anggur Hijau terhadap Bioavailabilitas Produk Suplementasi Sari Buah dengan Kandungan Hidrolisat Kolagen (Bilek & Bayram, 2015)

Jenis sari buah	Kadar kolagen (%)	<i>In Vitro</i> (%)	Bioavailabilitas (%)
Jeruk	$2,27 \pm 0,08$	$2,08 \pm 0,10$	$95,37 \pm 2,13$
Jeruk-anggur hijau	$2,07 \pm 0,07$	$1,86 \pm 0,04$	$83,38 \pm 0,57$
Apel	$2,05 \pm 0,05$	$1,86 \pm 0,05$	$90,71 \pm 0,22$
Apel-anggur hijau	$2,19 \pm 0,14$	$1,89 \pm 0,10$	$86,34 \pm 1,05$

3.2. Suplementasi Oral Hidrolisat Kolagen dan Dampak Positifnya pada Kulit

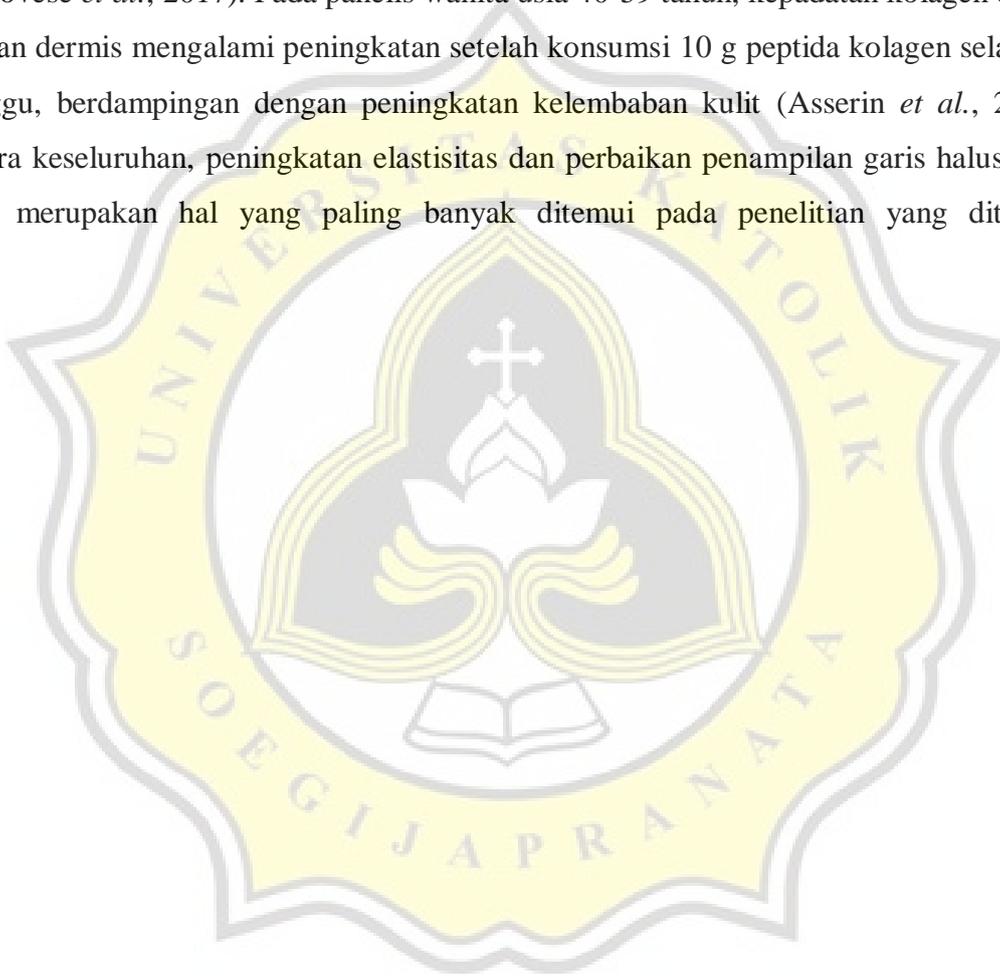
Kolagen merupakan salah satu komponen penyusun kulit yang terbesar di dalam matriks ekstraseluler (ECM) lapisan dermis, yang memiliki peran dalam menentukan penampilan kulit (Mcgrath *et al.*, 2004). Struktur, elastisitas, kekenyalan, hingga kelembaban kulit sangat dipengaruhi oleh jumlah dan siklus produksi kolagen yang terjadi di sel fibroblas (Krieg & Aumailley, 2011; Matsuda *et al.*, 2006). Seiring dengan berjalannya penuaan secara alami, maupun akibat pengaruh lingkungan seperti paparan sinar UV, jumlah dan tingkat produksi kolagen di dalam kulit akan berkurang, sehingga

proses penuaan identik dengan penampilan kulit yang kendur serta munculnya kerutan dan garis halus. Usaha yang dapat dilakukan untuk melawan penuaan adalah dengan adanya suplementasi kolagen. Suplementasi kolagen untuk fungsi *anti-aging* atau mencegah penuaan dapat dilakukan secara *topical* dan secara oral. Penelitian telah dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh konsumsi suplementasi oral dalam jangka waktu tertentu secara rutin terhadap morfologi serta penampilan fisik kulit. Penelitian-penelitian tersebut telah ditinjau pada Tabel 7.

Penelitian yang ditinjau pada tabel tersebut merupakan penelitian klinis dengan subjek manusia. Produk suplementasi yang digunakan terdiri dari 3 jenis, yaitu peptida kolagen dalam bentuk serbuk yang dilarutkan dengan sejumlah air, kapsul peptida kolagen, dan minuman formulasi peptida kolagen. Ketiganya ada yang merupakan produk formulasi untuk kepentingan penelitian dan beberapa sudah dipasarkan secara komersial. Hidrolisat kolagen yang digunakan memiliki kisaran berat molekul rata-rata yang rendah yaitu 0,3-8 kDa, yang bersumber dari bahan *marine*, *porcine*, *bovine*, dan unggas. Sejumlah penelitian menggunakan peptida hasil hidrolisis kolagen tipe I (Czajka *et al.*, 2018; Genovese *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018; Proksch *et al.*, 2013), dan tipe II (Schwartz & Park, 2012). Sedangkan pada penelitian lainnya tidak disebutkan tipe kolagen yang digunakan di dalam formulasi produk.

Konsumsi peptida kolagen selama 12 minggu secara rutin pada wanita usia 40-60 tahun memberikan peningkatan kelembaban dan elastisitas kulit, serta dapat mengurangi tampilan kerutan yang menonjol (Kim *et al.*, 2018). Hasil serupa juga dihasilkan setelah konsumsi 2,5 g peptida kolagen selama 12 minggu pada panelis wanita usia 35 tahun atau lebih (Bolke *et al.*, 2019), pada wanita usia 30-60 tahun setelah konsumsi 3 g peptida kolagen selama periode waktu yang sama (Koizumi *et al.*, 2017), dan pada panelis wanita usia 46-69 tahun selama 8 minggu mengkonsumsi 5 g peptida kolagen. Konsumsi 2,5 dan 5 g peptida kolagen selama 8 minggu pada wanita 35-55 tahun hanya memberikan peningkatan yang signifikan pada elastisitas kulit (Proksch *et al.*, 2013). Selain penyamaran garis halus, tampilan pori-pori kulit terlihat membaik, bersama dengan peningkatan elastisitas dan kelembaban kulit dengan suplementasi 10 g peptida kolagen selama 8 minggu konsumsi (Ito *et al.*, 2018). Dapat diketahui pula bahwa dosis suplementasi peptida kolagen 2 g, yang dikonsumsi secara rutin selama 12 minggu

dapat memberikan perbaikan nyata pada penampilan fisik kulit yang kering, pecah-pecah, dan adanya kerutan pada wanita usia 35-59 tahun (Schwartz & Park, 2012). Dilihat dari penampilan morfologi sel kulit, konsumsi 4 g peptida kolagen selama 90 hari pada panelis pria dan wanita usia 21-70 tahun dapat meningkatkan ketebalan dermis papiler dan fibrosit, serta memperbaiki susunan serat kolagen (Czajka *et al.*, 2018). Perbaikan susunan serat kolagen dermis memiliki dampak positif bagi perbaikan susunan lapisan epidermis setelah konsumsi 5 g peptida kolagen selama 90 hari (Genovese *et al.*, 2017). Pada panelis wanita usia 40-59 tahun, kepadatan kolagen dalam lapisan dermis mengalami peningkatan setelah konsumsi 10 g peptida kolagen selama 8 minggu, berdampingan dengan peningkatan kelembaban kulit (Asserin *et al.*, 2015). Secara keseluruhan, peningkatan elastisitas dan perbaikan penampilan garis halus pada kulit merupakan hal yang paling banyak ditemui pada penelitian yang ditinjau.



Tabel 7. Dampak Suplementasi Hidrolisat Kolagen untuk Kulit Berdasarkan Penelitian Klinis

No.	Sumber Hidrolisat Kolagen	Dosis (g)	Berat Molekul Rata-rata (kDa)	Dampak Suplementasi pada Kulit	Referensi
1	Kulit <i>Pangasius hypophthalmus</i>	1	-	Meningkatkan tingkat hidrasi, elastisitas dan memperbaiki kerutan pada kulit wanita usia 40-60 tahun selama 12 minggu konsumsi	(Kim <i>et al.</i> , 2018)
2	<i>Marine</i>	4	0,3-8	Meningkatkan elastisitas, ketebalan dermis papiler, fibrosit, memperbaiki susunan serat kolagen dan mengurangi peradangan <i>photo-damage</i> pada kulit wanita dan pria usia 21-70 tahun selama 90 hari konsumsi	(Czajka <i>et al.</i> , 2018)
3	<i>Porcine</i>	2,5; 5	2	Meningkatkan elastisitas kulit pada wanita 35-55 tahun selama 8 minggu konsumsi	(Proksch <i>et al.</i> , 2013)
4	<i>Marine</i>	5	2, 4	Meningkatkan kepadatan dan elastisitas kulit serta memperbaiki kerutan pada wanita usia 46-69 tahun selama 8 minggu konsumsi	(Duteil <i>et al.</i> , 2016)
5	Tulang rawan dada ayam	2	1-2,5	Mengurangi kulit kering, pecah-pecah kerutan dan garis halus pada wanita usia 35-59 tahun selama 12 minggu konsumsi	(Schwartz & Park, 2012)
6	<i>Marine</i>	5	0,3-8	Meningkatkan elastisitas kulit, memperbaiki susunan lapisan epidermis dan susunan serat kolagen lapisan dermis kulit panelis selama 90 hari konsumsi	(Genovese <i>et al.</i> , 2017)
7	Sisik ikan Tilapia	10	2-3	Meningkatkan elastisitas dan kelembaban kulit, serta mengurangi penampilan pori-pori pada pria dan wanita usia 31-48 tahun selama 8 minggu konsumsi	(Ito <i>et al.</i> , 2018)
8	<i>Marine, porcine</i>	10	2-5	Meningkatkan kelembaban kulit dan kepadatan kolagen lapisan dermis pada wanita usia 40-59 tahun selama 8 minggu konsumsi	(Asserin <i>et al.</i> , 2015)
9	Sisik ikan Tilapia	3	3	Memperbaiki kerutan periorbital, meningkatkan elastisitas dan kelembaban kulit pada wanita 30-60 tahun selama 12 minggu konsumsi	(Koizumi <i>et al.</i> , 2017)
10	Kulit <i>bovine</i>	2,5	-	Meningkatkan kelembaban, elastisitas, dan kepadatan kulit serta memperbaiki tekstur kulit wanita ≥ 35 tahun selama 12 minggu konsumsi	(Bolke <i>et al.</i> , 2019)