

4. PEMBAHASAN

Karakteristik fungsional kolagen, baik dalam bentuk ekstrak maupun hidrolisat, sangat bergantung pada berat molekulnya (Zhang *et al.*, 2017). Karakteristik fungsional dari kolagen akan menentukan penggunaannya dalam bidang pangan. Hidrolisat kolagen memiliki beberapa kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak kolagen, secara khusus disebabkan oleh penurunan yang drastis pada berat molekul kolagen akibat pemecahan ikatan hidrogen polipeptida protein kolagen (León-López *et al.*, 2019). Dalam hal aplikasi sebagai suplemen, hidrolisat kolagen dipilih karena fleksibilitasnya sebagai zat tambahan pangan yang tidak menambahkan perubahan yang kuat terhadap bahan pangan lainnya, karena adanya perbaikan pada beberapa karakteristik, meliputi kelarutan, viskositas, dan bioavailabilitasnya. Selain itu, dengan berat molekul yang lebih kecil hidrolisat kolagen lebih mudah dicerna dan diserap oleh tubuh, untuk mencapai tujuan suplementasi, yang dalam hal ini adalah untuk memperbaiki sel-sel dan penampilan kulit.

4.1. Kelarutan Hidrolisat Kolagen dan Pengaruh pH terhadap Kelarutan

Kelarutan merupakan salah satu karakteristik yang dapat diperbaiki melalui proses hidrolisis. Dalam proses hidrolisis, molekul protein di dalam kolagen mengalami penataan ulang dan pemecahan. Distribusi muatan pada permukaan molekul kolagen berubah dan meningkatkan gaya saling tolak antar molekul hidrolisat, sehingga dapat meningkatkan kelarutannya (Zhang *et al.*, 2017). Persentase kelarutan kolagen dihitung sebagai persen distribusi protein di dalam pelarut dibandingkan dengan kandungan protein total larutan. Secara umum, hidrolisat kolagen memiliki kelarutan yang lebih tinggi pada larutan dengan kisaran pH yang beragam, dibandingkan dengan ekstrak kolagen. Perbedaan ini berkaitan erat dengan berat molekul kolagen yang dilarutkan.

Pepsin Soluble Collagen (PSC) atau ekstrak kolagen hasil ekstraksi dari sumber kulit dorsal *Thunnus albacares* (Woo *et al.*, 2008) dan byssus *Mytilus sp.* (Rodriguez *et al.*, 2017) dengan bantuan enzim pepsin (Lampiran 3 dan Lampiran 4) menunjukkan bahwa kelarutan maksimal PSC dapat tercapai bila pelarut yang digunakan cenderung bersifat asam, yang berada di antara pH 2 dan 4, lalu pada pH di atas 4 akan mengalami penurunan yang drastis hingga kelarutan yang terendah di antara pH 6 dan 8, sebelum akhirnya menjadi stabil. Kedua jenis ekstrak kolagen dapat mencapai kelarutan yang

paling baik hingga lebih dari 90% pada pH 2-4, namun di luar kisaran pH tersebut kelarutannya dapat mencapai titik terendah $\leq 20\%$. Hasil serupa ditemukan pada *Acid Soluble Collagen* (ASC) dan PSC yang diekstrak dari ikan *Lutjanus vitta* (terlampir), dimana kelarutan tertinggi ($\pm 100\%$) didapatkan pada pH pelarut 3 dan 4, lalu mengalami penurunan hingga kelarutan yang terendah ($\pm 0-10\%$) pada pH 7, dan meningkat sedikit hingga mencapai pH 10.

Penemuan yang ditinjau pada Tabel 2 menunjukkan adanya peningkatan kelarutan, dimana kelarutan hidrolisat yang paling rendah masih lebih tinggi dibandingkan dengan kelarutan ekstrak kolagen, yaitu $56,72 \pm 2,74\%$ pada pH 7 yang netral (Li *et al.*, 2013). Persentase kelarutan yang lebih tinggi membuktikan bahwa proses hidrolisis dapat memperbaiki kelarutan ekstrak kolagen maupun gelatin. Namun tetap ditemukan pengaruh pH yang kuat terutama pada hidrolisat dengan berat molekul yang lebih tinggi. Hidrolisat dari *Sphyrna lewini* dengan berat molekul 255,42 kDa menunjukkan karakteristik kelarutan yang serupa dengan ASC dan PSC, dimana pada pH yang asam kelarutannya dapat mencapai $96,86 \pm 0,11\%$, kemudian mengalami penurunan saat mendekati pH 7 dan mencapai kelarutan terendah yaitu $56,72 \pm 2,74\%$, lalu mengalami kenaikan kembali hingga $72,65 \pm 1,86\%$ pada pH 10 (Li *et al.*, 2013). Hasil serupa terlihat pada hidrolisat dengan berat molekul 143,95 kDa dari bahan yang sama, dimana kelarutan terbaik ada pada pH 4 dan menurun pada pH 7 (Chi *et al.*, 2016). Secara keseluruhan untuk hidrolisat dengan berat molekul yang lebih tinggi, kelarutan yang paling baik ada saat hidrolisat dilarutkan dengan pelarut yang cenderung asam (pH 4), hingga mencapai lebih dari 89%, dan akan mengalami penurunan pada pH 7, kemudian kembali meningkat pada pH 10 (Chi *et al.*, 2016,2014; Li *et al.*, 2013).

Pengaruh pH dan berat molekul rata-rata hidrolisat terhadap persentase kelarutannya digambarkan dalam Grafik 1. Berdasarkan grafik tersebut, semakin tinggi berat molekul sampel hidrolisat, pengaruh pH terhadap kelarutan semakin kuat, dengan ditemukannya penurunan persentase kelarutan yang besar pada pH 7 dan 10, dan penurunan yang kecil pada pH 4. Sampel kolagen berat molekul tinggi memiliki kelarutan tertinggi hanya pada pH 4, dan memiliki kelarutan terendah pada pH 7 (Chi *et al.*, 2016; Chi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013). Kuatnya pengaruh pH dikarenakan sifat hidrolisat masih menyerupai ekstrak kolagen apabila berat molekul hidrolisat masih berada di kisaran

yang lebih tinggi, meskipun hidrolisat telah mengalami proses denaturasi dan hidrolisis. Sehingga kelarutannya dalam suatu kisaran pH mengikuti pola kelarutan ekstrak kolagen pada kisaran pH tersebut (Li *et al.*, 2013).

Pengaruh pH terhadap kelarutan kolagen ditentukan oleh titik isoelektriknya. Titik isoelektrik (pI) merupakan nilai pH molekul kolagen pada muatan atau *net charge* 0, yang ditentukan oleh proporsi residu asam amino yang asam dan residu amino yang basa (Fuentes-Jiménez *et al.*, 2019). pH larutan mempengaruhi muatan pada gugus samping residu yang bersifat asam atau basa tersebut, sehingga bila pH larutan mendekati titik isoelektriknya, protein maupun hidrolisat akan menunjukkan sifat kelarutan yang rendah (Gbogouri *et al.*, 2004). Saat pH larutan lebih tinggi atau lebih rendah dari pI kolagen, gaya saling tolak antar muatan residu molekul protein meningkat, sehingga di luar pI-nya kelarutan protein akan meningkat. Sebaliknya, di dalam larutan dengan pH yang mendekati atau tepat pada pI kolagen, interaksi antar gugus hidrofobik dalam protein meningkat, sehingga terjadi agregasi dan presipitasi karena protein memiliki muatan 0 (Jongjareonrak *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2017; Woo *et al.*, 2008). Kondisi pH yang mendekati titik isoelektrik protein, dimana muatan atau *net charge* protein berada pada tingkat yang paling rendah mengakibatkan interaksi antar molekul protein lebih banyak terjadi dibandingkan dengan interaksi molekul protein dan air, sehingga menurunkan kelarutannya dalam larutan *aqueous* (Foh *et al.*, 2011).

Titik isoelektrik ekstrak kolagen berada pada kisaran pH 7-8,6 (Highberger, 1939; León-López *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2006). Maka ekstrak kolagen akan memiliki kelarutan terendah pada kisaran pH tersebut karena protein kolagen mengalami presipitasi atau agregasi. Begitu juga dengan hidrolisat kolagen dengan berat molekul yang semakin tinggi dengan sifat serupa dengan ekstrak kolagen, meskipun tidak akan menimbulkan presipitasi atau agregasi (Li *et al.*, 2013). Oleh karena itu, untuk mengaplikasikannya ke dalam produk suplementasi dan memastikan tercapainya kelarutan tertinggi, formulasi produk perlu dilakukan di luar kisaran pH yang merupakan titik isoelektrik protein kolagen. Ekstrak kolagen dan hidrolisat kolagen dengan berat molekul tinggi membutuhkan kondisi pengolahan yang asam atau sangat basa.

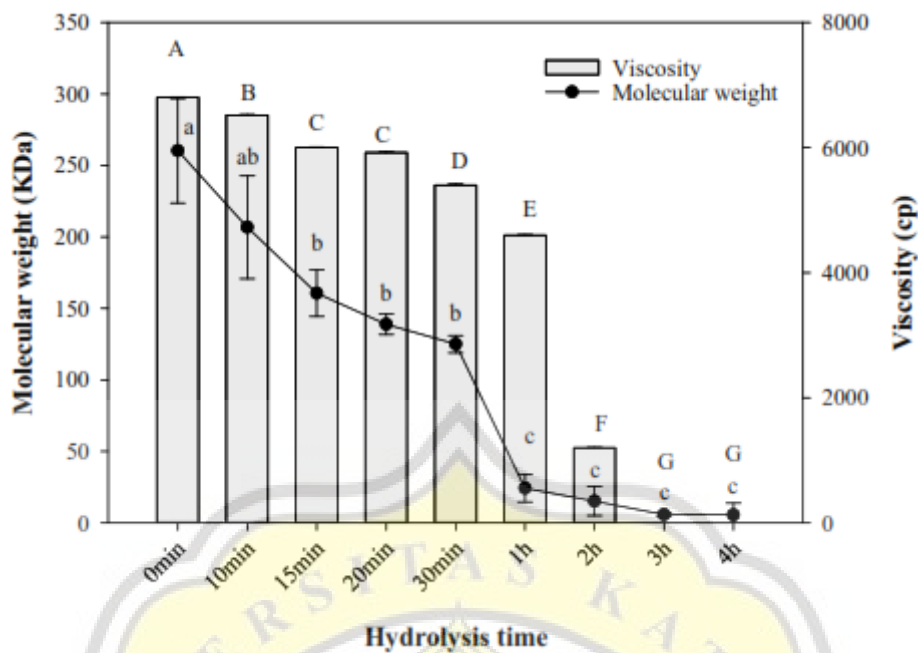
Kelarutan hidrolisat dengan berat molekul yang lebih rendah pada hasil penelitian yang ditinjau pada Tabel 2 dan Grafik 1 menunjukkan karakteristik yang berbeda dengan hidrolisat berat molekul tinggi yang telah dibahas sebelumnya. Pada tabel dan grafik tersebut terlihat bahwa penelitian yang menggunakan pelarut dengan pH 4, 7, dan 10 (Chi *et al.*, 2016, 2014; Li *et al.*, 2013) untuk melarutkan hidrolisat berat molekul rendah (1-11,79 kDa) menghasilkan kelarutan yang cenderung seragam, yaitu mencapai lebih dari 90%. Tingginya persentase kelarutan menunjukkan lemahnya pengaruh pH terhadap kelarutan, seiring dengan penurunan berat molekul hidrolisat kolagen. Penelitian lain oleh Alolod *et al.*, (2019) yang ditinjau pada Tabel 3, mengamati lebih dekat pengaruh pH yang lebih bervariasi (1, 3, 5, 7, 11) terhadap kelarutan hidrolisat kolagen dengan berat molekul rendah. Kelarutan paling baik sebesar 97,12% dapat dicapai pada pelarut yang asam dengan pH 1, lalu mengalami penurunan yang tidak banyak dan mencapai kelarutan paling rendah pada pH 5, yaitu sebesar 79,38%, yang nilainya masih lebih besar dibandingkan dengan kelarutan terendah hidrolisat berat molekul tinggi.

Penurunan kelarutan pada pH tersebut sesuai dengan teori bahwa saat berada di pH yang sama dengan pI hidrolisat kolagen, akan terjadi reduksi gaya tolak antar molekul hidrofobik kolagen, sehingga pembentukan ikatan hidrogen dengan air berkurang (Jongjareonrak *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2017; Woo *et al.*, 2008). Perlakuan suhu tinggi dan hidrolisis dalam kondisi basa pada proses produksi hidrolisat meningkatkan jumlah gugus karboksil hasil hidrolisis gugus samping amida kolagen, sehingga jumlah asam amino yang bersifat asam meningkat dan menurunkan pI hidrolisat kolagen (Fuentes-Jiménez, *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2009). Hidrolisat kolagen memiliki pI pada kisaran pH yang lebih asam dari pI protein kolagen, yaitu 3,68-5,7 (Kodous, 2020; Fuentes-Jiménez, *et al.*, 2019; León-López *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2006), sehingga saat diuji oleh Alolod *et al.*, (2019) dengan pelarut pH 5, menghasilkan kelarutan paling rendah. Namun, jika dibandingkan dengan ekstrak kolagen, aplikasi hidrolisat kolagen dengan berat molekul kecil lebih fleksibel dalam produk suplementasi, karena kelarutannya masih terbilang tinggi bahkan pada pH formulasi pelarut yang senilai dengan pI hidrolisat kolagen.

Kemudahan aplikasi hidrolisat kolagen berat molekul rendah dilihat dari kelarutannya yang tinggi diduga disebabkan juga karena ukuran partikelnya. Selain berat molekul yang lebih kecil, hidrolisat juga memiliki ukuran molekul yang lebih kecil dibandingkan dengan ukuran molekul protein kolagen. Peptida dengan ukuran lebih kecil memiliki gugus polar yang lebih banyak, sehingga kemampuannya untuk berikatan dengan hidrogen di dalam air lebih baik (Gbogouri *et al.*, 2004). Pemecahan pada proses hidrolisis juga meningkatkan sifat hidrofilik peptida dengan membuka jalur bagi gugus amino dan karboksil yang dapat menerima muatan, kemudian asam amino akan membentuk ikatan dengan air melalui ikatan hidrogen dan interaksi elektrostatik (Alolod *et al.*, 2019). Dengan kata lain, proses hidrolisis enzimatik terbukti efektif untuk meningkatkan kelarutan dan menurunkan pengaruh pH terhadap kelarutan hidrolisat kolagen seiring dengan penurunan berat molekul. Sehingga, aplikasi hidrolisat kolagen sebagai suplementasi dalam produk pangan lebih banyak ditemukan, dibandingkan dengan kolagen *native* maupun ekstrak kolagen (Li *et al.*, 2013).

4.2. Viskositas Hidrolisat Kolagen

Berbeda dengan kelarutan, produk suplementasi berkolagen biasanya memerlukan kolagen dengan viskositas yang cukup rendah untuk memastikan kemudahan aplikasinya dan meminimalkan perubahan sensori pada bahan pangan. Viskositas merupakan karakteristik fisikokimia kolagen yang berkaitan erat dengan berat molekul (Zhang *et al.*, 2017). Proses hidrolisis yang memecah polipeptida kolagen dan menghasilkan peptida akan menurunkan berat molekul bersama dengan viskositasnya. Hasil penelitian yang meneliti viskositas hidrolisat kolagen telah ditinjau dan disajikan pada Tabel 4. Karakteristik ini diukur dengan bantuan viskometer dan dinyatakan dalam satuan *centipoise* (cP). Berdasarkan hasil tersebut, perbedaan berat molekul hidrolisat menunjukkan adanya perbedaan pada viskositasnya. Hidrolisat atau peptida kolagen dengan berat molekul terkecil (5,62 kDa) menunjukkan viskositas yang terendah hingga mendekati 0 saat diuji, yaitu 0,5 cP. Fuentes-Jiménez, *et al.* (2019) menggambarkan proses hidrolisis hidrolisat tersebut pada Gambar 6.



Gambar 6. Hubungan antara berat molekul dan viskositas kolagen *ovine* selama proses hidrolisis (Fuentes-Jiménez *et al.*, 2019)

Gambar di atas menunjukkan adanya hubungan antara berat molekul dan viskositas peptida dengan lama waktu hidrolisis. Proses hidrolisis dilakukan terhadap ekstrak kolagen kulit domba selama 4 jam dan diamati setiap suatu satuan waktu. Sumber kolagen yang digunakan (menit ke-0) menunjukkan berat molekul yang besar yaitu 260,33 kDa, dengan viskositas yang tinggi pula yaitu 6800 cP. Setelah 4 jam hidrolisis, didapatkan hidrolisat kolagen dengan berat molekul 5,62 kDa. Penurunan berat molekul ini berlangsung bersama dengan penurunan viskositas, hingga 0,5 cP yang terhitung sangat rendah dibandingkan dengan viskositas kolagen *native* awal. Hidrolisis lebih lanjut yang dilakukan pada gelatin menghasilkan hidrolisat kolagen dengan viskositas yang serupa, yaitu 0,7 cP. Penurunan ini didapati setelah 30 menit hidrolisis enzimatis gelatin yang awalnya memiliki viskositas sebesar 1 cP mengalami penurunan menjadi 0,7 cP setelah 30 menit proses hidrolisis (Tauntong *et al.*, 2014).

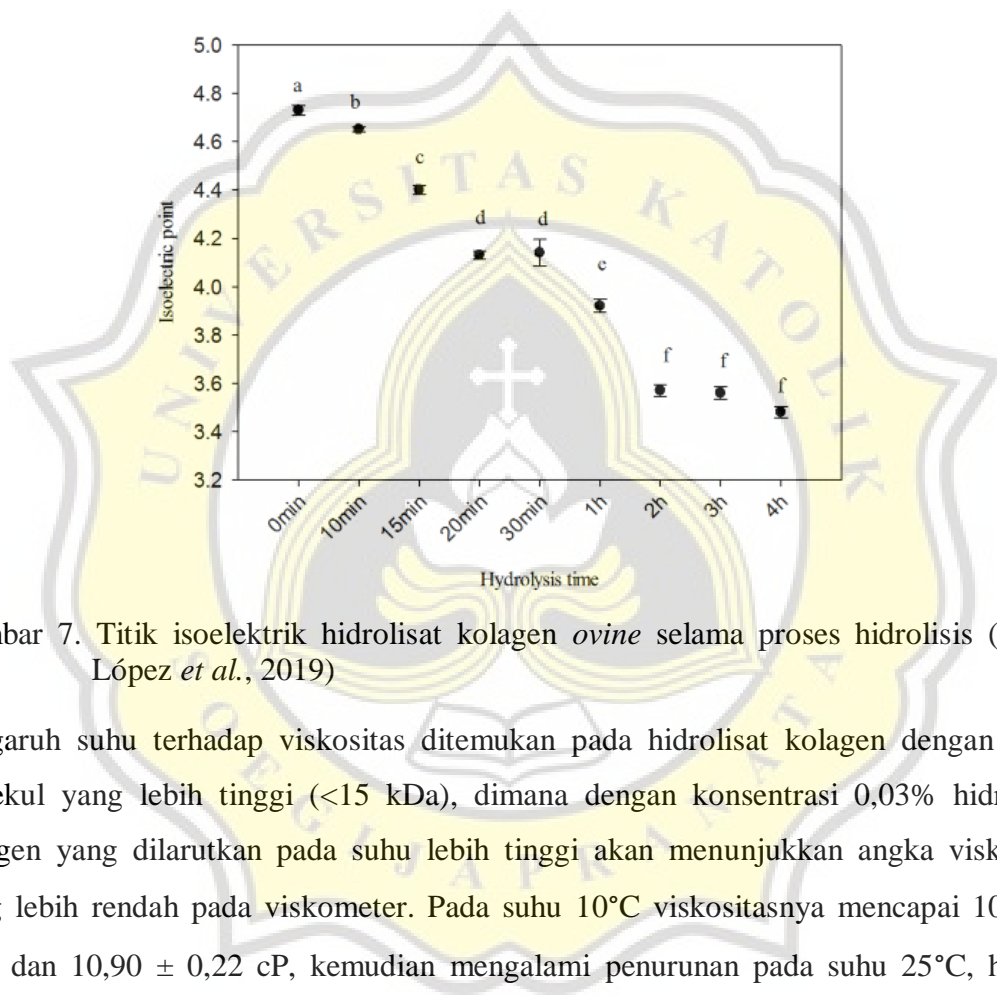
Pengaruh berat molekul terhadap viskositas juga ditemukan antar hidrolisat kolagen dengan berat molekul yang bervariasi, seperti pada hidrolisat dengan berat molekul <10 kDa yang masih memiliki viskositas yang rendah, yaitu 2,27-2,54 cP (Mohammad *et al.*, 2015), namun lebih tinggi dibandingkan dengan viskositas hidrolisat dengan berat molekul 5,62 kDa. Hidrolisat dengan berat molekul tertinggi (<15 kDa) dari penelitian

yang ditinjau menunjukkan viskositas yang tertinggi pula, dengan kisaran $7,48 \pm 0,42 - 10,90 \pm 0,22$ cP (Schmidt *et al.*, 2020). Penemuan-penemuan tersebut membuktikan bahwa viskositas hidrolisat kolagen dipengaruhi oleh nilai berat molekulnya dengan hubungan yang berbanding lurus. Semakin rendah berat molekul hidrolisat, viskositas yang dihasilkan akan semakin rendah pula. Rendahnya viskositas hidrolisat kolagen dibandingkan dengan kolagen *native* dan gelatin dapat meningkatkan fleksibilitas aplikasi hidrolisat kolagen dalam produk pangan sebagai suplementasi. Sebab, dalam perannya sebagai suplemen, hidrolisat kolagen tidak diaplikasikan untuk mengubah karakteristik reologi pangan, melainkan untuk mendapatkan manfaat kesehatan dari konsumsi hidrolisat kolagen (Hashim *et al.*, 2015).

Penurunan viskositas diduga terjadi karena pada saat kolagen mengalami denaturasi selama proses ekstraksi dan hidrolisis. Pemanasan dapat memecah ikatan hidrogen antar rantai polipeptida yang menstabilkan struktur *triple helix* kolagen bersama dengan pemecahan molekul, sehingga mengubah strukturnya menjadi *random coil* (Pan *et al.*, 2018). Ekstrak kolagen (ASC dan PSC) memiliki komponen rantai yang berikatan silang (*cross-linking*) dalam bentuk rantai dimer β - dan trimer γ - yang berat molekulnya tinggi dalam rasio yang besar (Ogawa *et al.*, 2004). Pemecahan pada proses hidrolisis dapat mengubah susunan rantai tunggal α -, dimer β - dan trimer γ - untuk membentuk susunan dengan kepadatan lebih rendah, sehingga dapat menurunkan viskositas (Pan *et al.*, 2018). Hidrolisis parsial akan menghasilkan gelatin dengan komposisi utama rantai α -, dilengkapi dengan rantai β - dengan jumlah sedang dan rantai γ - dengan jumlah sedikit (Mohammad *et al.*, 2015). Hidrolisis lebih lanjut akan mengubah komponen rantai tersebut, membentuk rantai tunggal atau dimer saja (Schmidt *et al.*, 2020), atau dipecah hingga akhirnya menjadi peptida berukuran lebih kecil lagi (Liu *et al.*, 2015), sehingga viskositasnya akan semakin kecil. Pemecahan ikatan dan perubahan susunan rantai kolagen juga akan memperlemah gaya tolak elektrostatis antar rantai kolagen yang ditemukan lebih kuat pada kolagen *native* atau kolagen dengan berat molekul tinggi, sehingga akan menurunkan viskositasnya (Zhang *et al.*, 2009).

Telah dijelaskan sebelumnya bahwa seiring dengan penurunan berat molekul kolagen selama proses hidrolisis, titik isoelektrik hidrolisat juga akan mengalami penurunan hingga mencapai angka 3,68-5,7 (Fuentes-Jiménez *et al.*, 2019; Kodous, 2020; León-

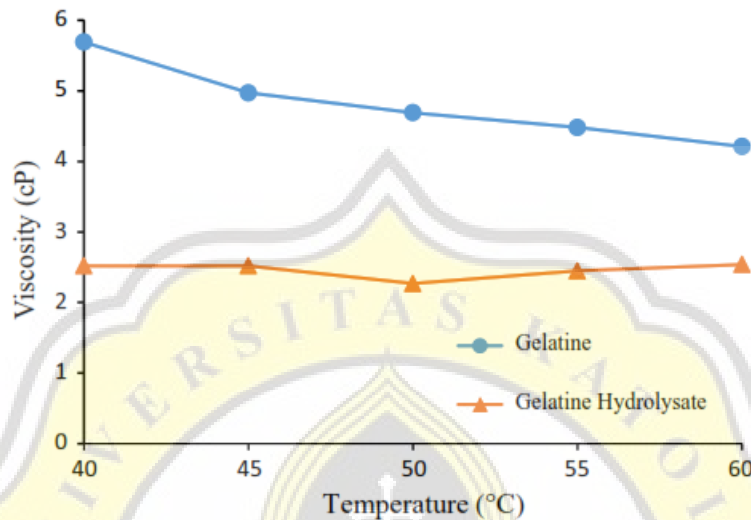
López *et al.*, 2019; Z. Zhang *et al.*, 2006). Gambar 7 menunjukkan adanya penurunan nilai titik isoelektrik kolagen selama proses hidrolisis dari 4,61 pada menit ke-0 hidrolisis, hingga 3,68 pada akhir hidrolisis, dengan hidrolisat berviskositas paling rendah yaitu 0,5 cP. Sehingga, ditemukan bahwa kolagen dengan berat molekul dan pI yang tinggi menunjukkan viskositas yang paling tinggi. Sedangkan hidrolisat kolagen dengan berat molekul dan pI yang lebih kecil akan menunjukkan viskositas yang paling rendah (Fuentes-Jiménez *et al.*, 2019).



Gambar 7. Titik isoelektrik hidrolisat kolagen *ovine* selama proses hidrolisis (León-López *et al.*, 2019)

Pengaruh suhu terhadap viskositas ditemukan pada hidrolisat kolagen dengan berat molekul yang lebih tinggi (<15 kDa), dimana dengan konsentrasi 0,03% hidrolisat kolagen yang dilarutkan pada suhu lebih tinggi akan menunjukkan angka viskositas yang lebih rendah pada viskometer. Pada suhu 10°C viskositasnya mencapai $10,30 \pm 0,24$ dan $10,90 \pm 0,22$ cP, kemudian mengalami penurunan pada suhu 25°C, hingga viskositas terendah pada suhu 50°C, yaitu $7,48 \pm 0,42$ dan $8,67 \pm 0,60$ cP (Schmidt *et al.*, 2020). Karakteristik ini diduga disebabkan karena berat molekul rata-rata hidrolisat masih lebih tinggi dibandingkan dengan hasil hidrolisis kolagen lainnya dengan berat molekul <10 kDa (León-López *et al.*, 2019; Mohammad *et al.*, 2015), sehingga hidrolisat tersebut memiliki karakteristik yang mirip dengan PSC yang digunakan bahan dasar hidrolisat (Li *et al.*, 2013). Terlihat dari karakteristik fisikokimia yang ditunjukkan oleh PSC itu sendiri, dimana pada suhu 10°C viskositasnya berada pada

angka $14,43 \pm 0,59$ cP, kemudian mengalami penurunan pada suhu 25°C menjadi $12,35 \pm 0,34$ cP, hingga viskositas terendah pada suhu 50°C , yaitu $8,83 \pm 0,56$ cP (Schmidt *et al.*, 2020). Ketiga hasil ini kurang lebih mendekati hasil yang ditunjukkan oleh viskositas hidrolisatnya.



Gambar 8. Viskositas hidrolisat gelatin dan gelatin pada berbagai tingkat suhu (Mohammad *et al.*, 2015)

Hasil penelitian Mohammad *et al.* (2015) yang dijabarkan lebih lanjut pada Gambar 8 menunjukkan perbedaan viskositas gelatin dan hidrolisat kolagen yang diuji pada tingkatan suhu yang sama. Dari grafik tersebut, viskositas gelatin dengan berat molekul 34-260 kDa mencapai dua kali viskositas hidrolisat gelatin, dan seiring dengan peningkatan suhu, viskositas gelatin akan menurun. Penemuan ini memperkuat teori bahwa pemanasan dapat memecah ikatan yang menstabilkan struktur kolagen, dan memperlemah gaya tolak elektrostatis antar rantai sehingga menurunkan viskositasnya (Pan *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2006). Pengaruh suhu tidak ditemukan secara signifikan pada viskositas hidrolisat kolagen yang memiliki kisaran antara 2,27-2,54 cP karena rantai *triple helix* yang dapat terpecah akibat suhu tinggi hanya tersisa sangat sedikit atau tidak ada sama sekali, dibandingkan dengan struktur gelatin (Zhang *et al.*, 2006). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa pengaplikasian hidrolisat kolagen berat molekul lebih rendah dapat dilakukan untuk produk yang memerlukan proses pengolahan suhu tinggi maupun suhu rendah, karena kemungkinan hidrolisat kolagen untuk mengubah viskositas produk lebih kecil.

4.3. Bioavailabilitas Hidrolisat Kolagen sebagai Suplemen Oral *Anti-Aging*

Dalam pengaplikasian hidrolisat kolagen sebagai suplemen *anti-aging*, senyawa makanan tersebut harus memiliki kemampuan untuk melewati saluran pencernaan dan saluran darah, hingga ke jaringan yang dituju, dalam hal ini adalah kulit, untuk mencapai tujuan suplementasi. Bioavailabilitas digunakan oleh beberapa peneliti sebagai upaya untuk menjelaskan apakah zat gizi atau bahan pangan fungsional dapat diserap dari saluran pencernaan ke dalam tubuh, disebarkan ke jaringan tubuh, mengalami proses metabolisme hingga akhirnya dikeluarkan dari tubuh (León-López *et al.*, 2020), serta dalam jumlah dan bentuk apa saja (Zague, 2008). Bioavailabilitas didefinisikan sebagai jumlah relatif suatu senyawa bioaktif yang dikonsumsi, yang dapat melewati sistem pencernaan di dalam usus hingga terdistribusi dalam sirkulasi darah untuk fungsi metabolik atau disimpan di dalam jaringan atau organ sasaran, yang dalam hal ini adalah kulit. Setelah senyawa tersebut berhasil masuk ke dalam darah, baru dapat dikatakan bahwa suplemen tersebut dapat bekerja secara aktif (Richelle *et al.*, 2006). Penelitian-penelitian yang ditinjau memiliki definisi bioavailabilitas yang berbeda, dengan metode penelitian yang berbeda pula, namun hasil yang diberikan secara keseluruhan mengindikasikan bahwa suplementasi hidrolisat kolagen berguna bagi perbaikan kondisi kulit.

Kolagen dalam bentuk protein *native* bila dikonsumsi, sebelum dapat diserap harus mengalami degradasi melalui pencernaan enzimatis protease sehingga dapat diubah menjadi peptida berukuran lebih kecil atau asam amino yang mudah diserap oleh tubuh. Peptida kemudian baru dapat diedarkan dari usus dalam bentuk asam amino dan dipeptida atau tripeptida. Wang *et al.* (2015) meneliti bioavailabilitas suplementasi kolagen secara oral pada subjek hewan tikus (*in vivo*) menggunakan kolagen dengan berat molekul rata-rata 300 kDa, sebanyak 4 g/kg berat badan subjek. Bioavailabilitas dihitung dengan rumus (Lampiran 5), berdasarkan hasil parameter farmakokinetiknya, dan menghasilkan bioavailabilitas relatif (F_r) sebesar 57,8% dan bioavailabilitas absolut (F_s) sebesar 49,6% (C_{max} 40,4 ± 5,46 µg/ml, T_{max} 2 jam). Sementara, penelitian lain yang dilakukan oleh (Wang *et al.*, 2014) untuk mengamati bioavailabilitas suplementasi menggunakan gelatin pada subjek hewan tikus dengan dosis yang sama menunjukkan persentase bioavailabilitas yang lebih tinggi. Terdapat peningkatan pada F_r menjadi 74,12% dan F_s menjadi 85,97% (C_{max} 57,11 ± 5,46 µg/ml, T_{max} 4 jam). Sehingga dapat

diduga bahwa molekul hidrolisat kolagen dengan berat molekul rata-rata relatif lebih kecil dari kolagen dan gelatin akan memiliki kemampuan untuk dicerna dan diserap oleh tubuh lebih baik. Penggunaan hidrolisat kolagen dapat memudahkan penerimaan kolagen ke dalam tubuh karena kolagen telah terlebih dahulu diolah secara enzimatis sehingga menghasilkan peptida berukuran kecil dengan berat molekul rendah yang secara langsung diserap oleh usus (León-López *et al.*, 2020).

Studi mengenai bioavailabilitas kolagen dan gelatin dengan subjek hewan (Wang *et al.*, 2014, 2015) membuktikan bahwa kolagen yang didapatkan melalui konsumsi suplemen berkolagen dapat terdeteksi di dalam darah, dilihat dari adanya peningkatan jumlah peptida dan asam amino hidroksiprolin (Hyp). Pemberian kolagen pada subjek hewan tikus (Lampiran 6) terbukti menghasilkan peningkatan tingkat asam amino hidroksiprolin (Hyp) dalam plasma darah, dari jumlah yang dapat diabaikan menjadi $40,4 \pm 5,46 \mu\text{g/ml}$, 2 jam setelah konsumsi (Wang *et al.*, 2015). Hasil serupa didapatkan dengan pemberian gelatin pada subjek hewan tikus (Lampiran 7), yang terbukti meningkatkan kadar Hyp di dalam plasma darah hingga konsentrasi maksimum $557,84 \pm 22,58 \mu\text{g/ml}$ dalam waktu 4 jam setelah konsumsi (Wang *et al.*, 2014). Kedua hasil tersebut juga mengindikasikan bahwa kolagen dan gelatin dapat dicerna dan diserap ke dalam tubuh. Komponen Hyp dapat memudahkan proses penerimaan hidrolisat kolagen di dalam tubuh karena bersama dengan asam amino Pro, asam amino ini dapat langsung diserap oleh saluran pencernaan setelah konsumsi (Sontakke *et al.*, 2016).

4.3.1. Bioavailabilitas Suplementasi Hidrolisat Kolagen di dalam Tubuh Manusia

Pengamatan terhadap bioavailabilitas suplementasi oral hidrolisat kolagen pada manusia dilakukan berdasarkan pada penemuan yang telah dihasilkan pada subjek hewan (Wang *et al.*, 2014, 2015) dengan mengamati peningkatan tingkat peptida dan asam amino Hyp di dalam darah. Dua hal yang menjadi pokok pengamatan adalah konsentrasi maksimum (C_{max}) Hyp di dalam darah dan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai kadar maksimum (T_{max}). Penelitian yang ditinjau dilakukan secara klinis pada subjek manusia dengan usia 25-37 tahun. Pemberian hidrolisat kolagen dilakukan dalam bentuk bubuk yang telah dilarutkan di dalam sejumlah air, kemudian plasma darah diambil setiap satuan waktu dan diuji kadar Hyp setelah konsumsi peptida (Iwai *et al.*,

2005; Ohara *et al.*, 2007; Shigemura *et al.*, 2011, 2014). Hasil pengujian klinis yang ditinjau ditampilkan pada Tabel 5.

Dari penelitian tersebut, ditemukan bahwa hidrolisat kolagen berhasil mencapai saluran darah dalam dua macam bentuk, yaitu asam amino Hyp bebas dan peptida yang mengandung Hyp. Peptida mengandung Hyp yang dapat terdeteksi di dalam darah setelah konsumsi hidrolisat kolagen hanya tersusun atas dua atau tiga asam amino (di-atau tripeptida). Hasil ini mengindikasikan bahwa peptida mengandung Hyp dengan rantai lebih panjang yang biasa ditemukan di dalam hidrolisat kolagen berat molekul tinggi tidak dapat diserap ke dalam darah sebelum didegradasi menjadi peptida atau asam amino yang berukuran lebih kecil di dalam saluran pencernaan (Iwai *et al.*, 2005; Ohara *et al.*, 2007; Shigemura *et al.*, 2014). Jenis peptida utama yang terdeteksi dalam plasma darah adalah Pro-Hyp, yang menempati persentase paling besar dibandingkan dengan peptida lainnya (Iwai *et al.*, 2005; Ohara *et al.*, 2007; Shigemura *et al.*, 2011). Peptida lainnya yang terdeteksi tergantung pada jenis bahan yang digunakan (Lampiran 8 dan Lampiran 9).

Suplementasi hidrolisat kolagen dapat mencapai konsentrasi maksimum di dalam darah, dalam bentuk peptida mengandung Hyp dan Hyp bebas pada periode waktu 1-2 jam setelah konsumsi berdasarkan hasil yang ditinjau. Terdapat pengecualian untuk tercapainya konsentrasi maksimum peptida mengandung Hyp dengan T_{max} yang paling singkat yaitu 15-30 menit untuk dosis hidrolisat kolagen 0,03 g/kg berat badan pada beberapa subjek penelitian. Pengecualian tersebut bergantung pada perbedaan kerja aktivitas peptidase dalam memecah molekul hidrolisat yang besar menjadi lebih kecil, pada masing-masing individu (Shigemura *et al.*, 2014).

Penelitian Shigemura *et al.* (2014) membuahkan hasil bahwa suplementasi hidrolisat kolagen sebanyak 0,15 dan 0,38 g/kg berat badan berhasil meningkatkan konsentrasi Hyp di dalam darah secara signifikan, baik dalam bentuk peptida (20,66 nmol/ml dan 41,09 nmol/ml) maupun dalam bentuk bebas (56,87 nmol/ml dan 96,72 nmol/ml). Suplementasi hidrolisat kolagen dengan dosis 0,18 g/kg berat badan (Iwai *et al.*, 2005) menghasilkan C_{max} kedua bentuk Hyp di dalam darah yang serupa dengan konsentrasi yang dapat dicapai oleh dosis suplementasi 0,15 g/kg berat badan, yaitu 25 nmol/ml untuk peptida mengandung Hyp dan 60 nmol/ml untuk asam amino Hyp. Sedangkan

pemberian hidrolisat kolagen dengan dosis 0,03 g/kg berat badan tidak memberikan efek peningkatan Hyp yang signifikan, dilihat dari C_{max} yang paling kecil dibandingkan dengan hasil penelitian lain, yaitu 13,55 nmol/ml dalam bentuk peptida mengandung Hyp dan 21,53 nmol/ml dalam bentuk Hyp bebas. Penemuan tersebut membuktikan bahwa dosis suplementasi kolagen akan berpengaruh pada bioavailabilitasnya di dalam darah. Penemuan ini didukung oleh penelitian *in vitro* (Lampiran 10) dimana peningkatan konsentrasi peptida kolagen di dalam produk suplementasi akan diikuti dengan peningkatan bioavailabilitas (León-López *et al.*, 2020). Peptida mengandung Hyp yang dapat dideteksi setelah suplementasi dengan dosis yang paling besar dari hasil yang ditinjau, yaitu 0,42 g/kg berat badan, memiliki C_{max} yang cukup tinggi yaitu ± 120 nmol/ml. Meskipun bukan nilai C_{max} yang tertinggi, dosis tersebut berhasil mencapai konsentrasi maksimum dengan waktu yang paling singkat yaitu 1 jam. Keberhasilan suplementasi kemungkinan didukung dengan kecilnya berat molekul hidrolisat yaitu 1 kDa, sehingga lebih mudah diserap oleh tubuh bahkan dalam dosis yang tinggi (Shigemura *et al.*, 2011).

Selain dipengaruhi oleh dosis, struktur dan jumlah peptida yang dapat ditemukan di dalam darah dipengaruhi oleh tipe dan sumber kolagen yang digunakan (Ohara *et al.*, 2007). Dengan dosis dan berat molekul yang sama, tiga jenis hidrolisat hasil hidrolisis gelatin dengan sumber yang berbeda, yaitu kulit ikan, sisik ikan, dan kulit babi dapat menghasilkan C_{max} yang berbeda (Ohara *et al.*, 2007). Peptida mengandung Hyp dengan C_{max} dari yang paling tinggi adalah ± 140 nmol/ml (gelatin sisik ikan), ± 80 nmol/ml (gelatin kulit babi), dan ± 60 nmol/ml (gelatin kulit ikan). Urutan yang sama didapati juga pada C_{max} asam amino Hyp bebas, yaitu dari yang tertinggi ± 120 nmol/ml (gelatin sisik ikan), ± 110 nmol/ml (gelatin kulit babi), dan ± 70 nmol/ml (gelatin kulit ikan). Dari hasil tersebut, didapatkan rasio peptida Hyp terhadap Hyp bebas sebesar 2:7-3:7.

Berdasarkan hasil yang ditinjau, didapati juga peran berat molekul tidak sekuat peran sumber kolagen yang digunakan dalam pengaruhnya terhadap konsentrasi maksimum Hyp. Percobaan dengan dosis yang sama menggunakan hidrolisat kolagen tipe I yang bersumber dari kaki ayam dengan berat molekul lebih tinggi, yaitu 12,5 kDa menghasilkan C_{max} peptida mengandung Hyp 60 nmol/ml, dan C_{max} Hyp bebas 150 nmol/ml, sehingga menghasilkan rasio 1:3. Hidrolisat ini hanya membutuhkan waktu 1

jam untuk mencapai konsentrasi maksimum Hyp di dalam darah, meskipun berat molekulnya jauh lebih tinggi dibandingkan dengan hidrolisat gelatin sisik ikan, serta kulit ikan dan babi yang membutuhkan waktu hingga 2 jam untuk mencapai C_{max} (Iwai *et al.*, 2005; Ohara *et al.*, 2007). Namun perlu diperhatikan juga faktor lain seperti keadaan masing-masing individu yang mengkonsumsi suplementasi karena terdapat perbedaan aktivitas peptidase dalam menguraikan molekul kolagen (Shigemura *et al.*, 2014).

Penurunan konsentrasi peptida mengandung Hyp mulai terlihat setelah 4 jam konsumsi hingga menjadi setengah dari konsentrasi maksimumnya (Iwai *et al.*, 2005; Shigemura *et al.*, 2011). Beberapa jenis peptida masih terdeteksi setelah 4 jam konsumsi. Pro-Hyp, yang menempati kadar peptida tertinggi di semua jenis hidrolisat dibandingkan dengan peptida Hyp lainnya, merupakan peptida yang sulit dicerna oleh peptidase sehingga ditemukan dalam bentuk utuh saat ekskresi melalui urin. Dibuktikan juga dengan penelitian *in vitro*, bahwa sebanyak 75% dari total Pro-Hyp tersisa dalam bentuk utuh setelah 24 jam berada di dalam serum darah manusia (Iwai *et al.*, 2005). Tripeptida Ala-Hyp-Gly dan Ser-Hyp-Gly yang hanya ditemukan pada hidrolisat kolagen sisik ikan masih terdeteksi di dalam darah 4 jam setelah waktu konsumsi, menjadikan konsentrasi peptida mengandung Hyp-nya paling tinggi dibandingkan dengan hidrolisat kulit ikan dan babi. Hasil tersebut menunjukkan ketahanan kedua tripeptida tersebut terhadap peptidase manusia, baik di dalam darah maupun di dalam proses pencernaan (Ohara *et al.*, 2007). Sedangkan konsentrasi Hyp bebas akan mengalami penurunan 6 jam setelah konsumsi menjadi dua pertiga konsentrasi maksimumnya (Shigemura *et al.*, 2014). Meskipun telah mengalami penurunan, konsentrasinya masih lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi asam amino Hyp sebelum suplementasi. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa peptida kolagen lebih banyak diserap oleh tubuh dalam bentuk Hyp bebas sehingga konsentrasinya tetap melebihi konsentrasi awal. Data tersebut juga dapat mengindikasikan bahwa terdapat pemecahan peptida mengandung Hyp melalui hidrolisis enzimatis di dalam tubuh, menjadi asam amino bebas sehingga proporsi Hyp bebas masih terdeteksi hingga 6 jam setelah konsumsi (Shigemura *et al.*, 2014).

Kolagen yang masuk ke dalam saluran pencernaan tubuh akan mengalami degradasi dan perubahan model pada jaringan yang rusak maupun radang, sehingga dapat digunakan

sebagai sarana untuk mencegah dan memperbaiki tanda penuaan pada kulit. Beberapa jenis peptida Hyp yang dapat terdeteksi di dalam darah memiliki peran yang penting dalam keberhasilan suplementasi sebagai stimuli kemotaktik untuk memicu produksi dan kerja sel fibroblas yang dapat memperbaiki jaringan yang rusak. Studi *in vitro* membuktikan Pro-Hyp dan Pro-Hyp-Gly dapat berperan sebagai *biological messenger* untuk memicu degradasi matriks ekstraseluler diikuti dengan perbaikan jaringan yang rusak dengan menstimulasi migrasi dan sintesis sel fibroblas sehingga dapat terbentuk serat kolagen baru pada kulit (Iwai *et al.*, 2005; Zague, 2008). Penelitian Shigemura *et al.* (2011) menambahkan bahwa dipeptida Hyp-Gly memiliki kemampuan untuk menstimulasi pertumbuhan fibroblas yang lebih baik dibandingkan dengan Pro-Hyp, sehingga keberadaannya di dalam peptida kolagen untuk suplementasi *anti-aging* berperan penting. Sehingga untuk mencapai bioavailabilitas yang baik, dapat digunakan hidrolisat yang paling tidak mempunyai komposisi ketiga jenis peptida tersebut, seperti hidrolisat yang bersumber dari sisik dan kulit ikan.

4.3.2. Penurunan Bioavailabilitas Hidrolisat Kolagen Akibat Kandungan Zat Anti Nutrisi

Suplementasi yang dilakukan dengan mengkonsumsi hidrolisat kolagen telah terbukti berhasil melalui proses pencernaan dan diserap oleh tubuh berdasarkan deteksi konsentrasi Hyp di dalam darah. Keberhasilan tersebut mendorong perkembangan berbagai macam produk suplementasi peptida kolagen untuk mendapatkan manfaat kesehatan, mulai dari serbuk peptida kolagen hingga produk makanan fungsional *nutricosmetic*. Penyusunan formulasi *nutricosmetic* perlu dilakukan dengan mempertimbangkan kemampuan produk untuk menyediakan peptida kolagen dengan jumlah maksimal ke tangan konsumen untuk mencapai tujuan suplementasi (Zanna, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Bilek dan Bayram (2015) berhasil mendemonstrasikan hambatan yang mungkin diakibatkan oleh kandungan zat nutrisi bahan lain di dalam formulasi produk suplementasi, dengan membandingkan bioavailabilitasnya.

Bioavailabilitas produk dievaluasi secara *in vitro* menggunakan rangkaian enzim, dan hasilnya dapat dilihat dalam Tabel 6. Dari penelitian tersebut, Bilek dan Bayram (2015) mendapati hasil bahwa penambahan kolagen sebanyak 2,5 mg/100 ml sebagai

suplementasi minuman sari buah dapat mencapai bioavailabilitas *in vitro* lebih dari 80% pada keempat macam sari buah. Angka tersebut mengindikasikan bahwa minuman sari buah berkolagen formulasi dalam penelitian ini memiliki peluang sebagai sumber nutrisi yang baik untuk kepentingan *anti-aging*. Dari Tabel 6, dapat diamati bahwa terdapat dua macam formulasi dengan persentase bioavailabilitas terendah, yaitu 83,38% pada minuman sari buah jeruk-anggur hijau dan 86,34% pada minuman apel-anggur hijau. Rendahnya angka persentase ini diduga disebabkan oleh kandungan total fenolik yang lebih tinggi dibandingkan dengan kedua formulasi lainnya, yang berasal dari salah satu komposisi formulasi ini yaitu sari buah anggur hijau yang mengandung senyawa fenolik. Senyawa fenolik dikenal sebagai senyawa anti nutrisi karena interaksinya dengan protein dapat menghambat kemampuan cerna protein, sehingga mengakibatkan penurunan bioavailabilitas protein. Melalui interaksi tersebut, senyawa fenolik mengikat protein, mengakibatkan presipitasi atau membentuk protein yang sulit dicerna. Beberapa jenis polifenol dikenal dapat menghambat kerja enzim pemecah protein seperti fosfatase, protein fosfokinase, dan asam amino oksidase, serta menghasilkan enzim penghambat pencernaan setelah interaksi protein dan polifenol (Ferguson, 2001; Ozdal *et al.*, 2013).

Bioavailabilitas *in vitro* tertinggi didapati pada minuman formulasi dengan sari buah jeruk (95,37%) diikuti dengan sari buah apel (90,71%), dimana keduanya memiliki bioavailabilitas lebih dari 90%, yang mengindikasikan bahwa kedua jenis formulasi dapat menjadi sarana yang baik untuk hidrolisis kolagen. Namun, untuk memaksimalkan efek produk, pilihan yang terbaik adalah penggunaan sari buah jeruk. Penggunaan sari buah jeruk sebagai bahan dasar produk suplementasi kolagen yang sudah ditinjau bioavailabilitasnya dalam penelitian belum banyak dilakukan, kecuali oleh Bilek dan Bayram (2015). Penelitian lain seperti yang dilakukan oleh Kodous (2020) menggunakan bubuk esens jeruk dan Masoud (2017) menggunakan konsentrat sari jeruk untuk membantu meningkatkan penerimaan konsumen terhadap produk, karena dapat menghasilkan nilai warna, aroma, dan rasa yang lebih baik dibandingkan dengan produk hidrolisis kolagen tanpa esens jeruk.

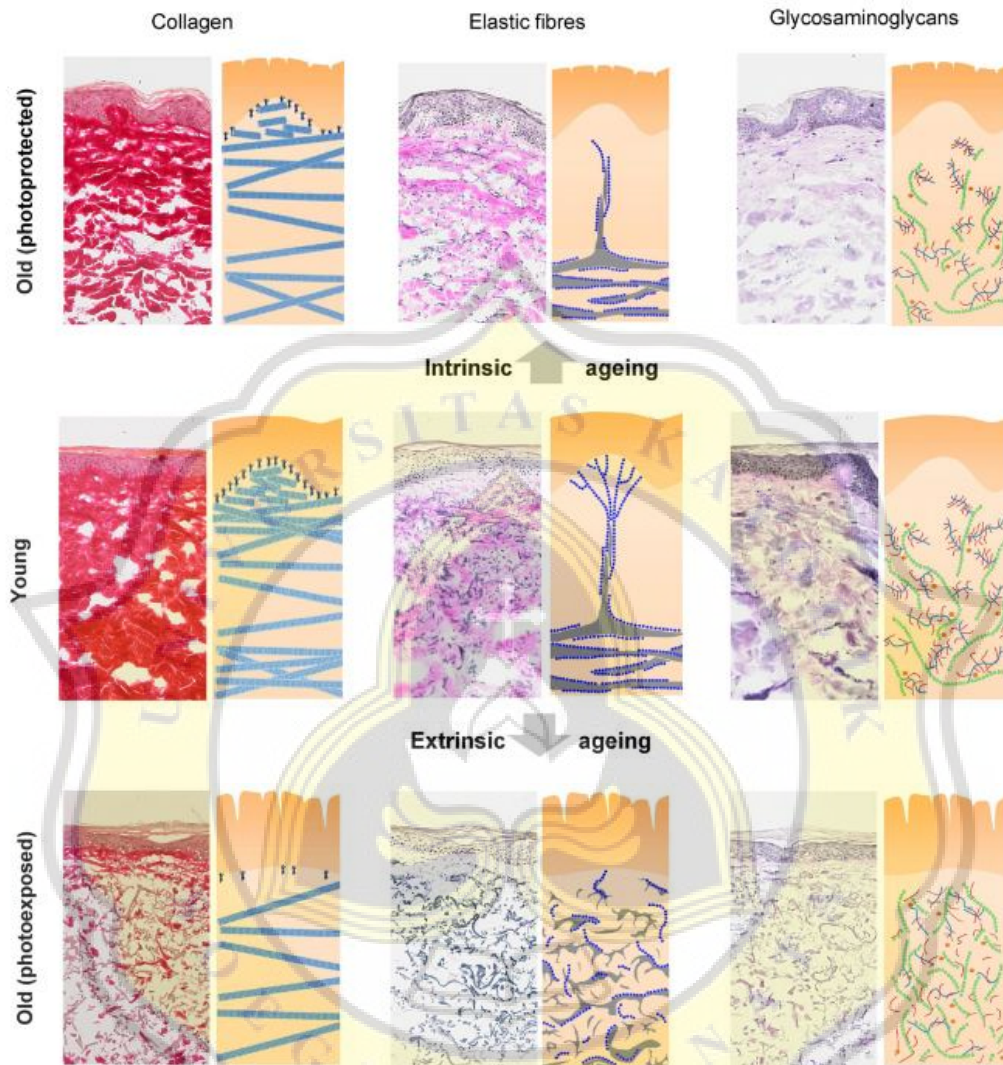
Penelitian Bilek dan Bayram (2015) juga membuktikan bahwa penggunaan hidrolisis kolagen *marine* dengan berat molekul rata-rata 2 kDa mampu memberikan efek

suplementasi yang diinginkan, dilihat dari bioavailabilitas *in vitro* yang cukup baik, yaitu lebih dari 80%. Selain untuk studi bioavailabilitas *in vitro*, peptida kolagen dari produk *marine* merupakan jenis peptida yang paling banyak digunakan pada penelitian *in vivo* yang ditinjau (Ohara *et al.*, 2007; Shigemura *et al.*, 2011, 2014). Dari penelitian klinis (Shigemura *et al.*, 2011, 2014), ditemukan bahwa pemberian peptida kolagen dengan berat molekul rata-rata rendah (1-5 kDa) dapat memberikan efek suplementasi yang diinginkan, dilihat dari peningkatan konsentrasi Hyp dan peptida mengandung Hyp di dalam darah hingga konsentrasi maksimum setelah pemberian suplemen. Hasil tersebut selaras dengan hasil penelitian *in vitro* (Bilek & Bayram, 2015) yang menyajikan persentase bioavailabilitas sebesar lebih dari 80% untuk pemberian peptida kolagen dengan berat molekul rata-rata 2 kDa. Maka, dari hasil penelitian yang telah ditinjau, untuk kepentingan suplementasi hidrolisat kolagen dengan tujuan menunda penuaan atau *anti-aging*, penggunaan peptida kolagen dengan berat molekul rendah (1-5 kDa) dapat memberikan pengaruh positif dilihat dari bioavailabilitasnya yang nyata.

4.4. Karakteristik Penuaan pada Kulit

Pada manusia, terdapat dua jenis proses penuaan kulit yang paling utama, yaitu penuaan intrinsik dan ekstrinsik. Penuaan intrinsik merupakan proses penuaan berupa degenerasi jaringan yang berjalan seiring dengan bertambahnya usia, dan tidak dapat dihindari karena merupakan suatu proses alami yang terus berjalan bersama dengan proses pertumbuhan dan perkembangan manusia. Sebaliknya, penuaan ekstrinsik merupakan proses penuaan yang disebabkan oleh paparan faktor-faktor ekstrinsik dari lingkungan sekitar pada kulit, seperti paparan sinar ultraviolet (UV) matahari yang dikenal sebagai *photo-aging*. Faktor ekstrinsik tersebut dapat menyebabkan proses penuaan kulit yang prematur atau memperburuk efek penuaan intrinsik, namun memiliki kemungkinan untuk dicegah, berbeda dengan penuaan intrinsik (Baumann, 2007; El-Domyati *et al.*, 2002; Langton *et al.*, 2010; Naylor *et al.*, 2011; Sibilla *et al.*, 2015). Kedua proses penuaan menyebabkan munculnya perubahan pada kulit, baik secara fisik yang dapat terlihat secara nyata, maupun perubahan struktural dan fungsional kulit pada serat kolagen, serat elastis, dan proteoglikan di dalam matriks ekstraseluler (ECM) kulit, sehingga didapati pula perubahan pada kekuatan tegangan (*tensile strength*), elastisitas, dan kelembaban kulit. Perubahan dari kedua jenis penuaan dapat dibedakan dilihat dari dampak yang diakibatkan (Naylor *et al.*, 2011). Perbedaan tersebut divisualisasikan

pada Gambar 9 dengan ilustrasi dan hasil *staining* pada kolagen, serat elastis, dan glikosaminoglikan (GAG).



Gambar 9. Modifikasi struktural ECM (kolagen, serat elastis, dan glikosaminoglikan) pada kulit yang telah mengalami penuaan intrinsik dan ekstrinsik (75 tahun) dibandingkan dengan kulit yang berusia lebih muda (23 tahun) (Naylor *et al.*, 2011)

Dari pengamatan histologi, penuaan intrinsik teridentifikasi dari penurunan jumlah kolagen yang disebabkan oleh degradasi komponen kolagen, disertai dengan penurunan sintesis kolagen akibat atrofi sel kulit pada lapisan dermis retikuler dan penurunan jumlah fibroblas. Lapisan pertemuan epidermis dengan dermis, yang dikenal sebagai *dermal-epidermal junction* (DEJ), mengalami penipisan akibat degradasi fibrilin,

penyusun jaringan elastis, yang membentuk serat oksitalan pada DEJ. Degradasi serat elastis juga menyebabkan penebalan dan fragmentasi jaringan elastis pada lapisan retikuler dermis yang tidak teratur secara bertahap. Sama seperti kolagen dan serat elastis, GAG juga mengalami degradasi, mempengaruhi kemampuan kulit untuk menahan kelembaban (Baumann, 2007; El-Domyati *et al.*, 2002; Naylor *et al.*, 2011). Namun, penampilan kulit yang terpapar penuaan intrinsik tergolong mulus dengan beberapa garis halus, berhubungan dengan fragmentasi serat elastis yang berlangsung secara bertahap (Naylor *et al.*, 2011; Sherratt, 2009).

Berbeda dengan penampilan kulit yang mulus pada penuaan intrinsik, penuaan ekstrinsik (*photo-aging*) teridentifikasi dari penampilan kulit yang lebih kasar disertai dengan kerutan yang lebih dalam dibandingkan dengan penuaan intrinsik. Secara histologi, perubahan penampilan tersebut dikaitkan dengan kehilangan mikrofibril fibrilin dan fibulin dari lapisan dermis papiler (Naylor *et al.*, 2011; Sherratt, 2009). Dari pengamatan histologi pula, diketahui bahwa degradasi kolagen menimbulkan penurunan jumlah kolagen yang lebih besar dibandingkan dengan penuaan intrinsik. Sebaliknya, ditemukan akumulasi GAG yang terdistribusi secara tidak teratur pada serat elastis. Sementara protein serat elastis juga mengalami akumulasi yang besar dan tidak teratur di sepanjang dermis yang disebabkan oleh produksi elastin berlebihan di dalam fibroblas yang rusak akibat paparan sinar UV (El-Domyati *et al.*, 2002; Naylor *et al.*, 2011; Sherratt, 2009).

4.5. Manfaat Penggunaan Hidrolisat Kolagen sebagai Suplemen Kesehatan Kulit dan Mekanisme Kerjanya

Ketersediaan Hyp di dalam darah yang menjadi tolok ukur bioavailabilitas hidrolisat kolagen dapat membuktikan bahwa peptida kolagen dapat melewati saluran pencernaan, kemudian masuk ke dalam darah dalam bentuk peptida Hyp dan asam amino Hyp bebas setelah dilakukan suplementasi peptida kolagen secara oral. Melalui saluran darah, peptida dan asam amino tersebut dapat didistribusikan ke seluruh tubuh, hingga mencapai lapisan dermis kulit dan bertahan selama 14 hari (Sibilla *et al.*, 2015; Watanabe-Kamiyama *et al.*, 2010). Pengujian klinis sudah membuktikan bahwa Pro-Hyp dan Pro-Hyp-Gly dapat terdeteksi di dalam darah setelah konsumsi hidrolisat kolagen yang bersumber dari ayam, maupun dari sumber *marine* (Iwai *et al.*, 2005;

Ohara *et al.*, 2007). Suplementasi terbilang berhasil bila peptida tersebut dapat melewati saluran darah hingga ke kulit untuk menstimulasi migrasi dan pertumbuhan fibroblas, karena peptida kolagen memiliki peran utama sebagai *biological messenger* untuk memicu degradasi matriks ekstraseluler dan memperbaiki jaringan yang rusak, sehingga dapat terbentuk serat kolagen, serat elastis, dan *hyaluronic acid* (HA) baru pada kulit (Iwai *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2018; Zague, 2008).

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengetahui kelanjutan dan hasil konsumsi oral hidrolisat kolagen setelah suplemen tersebut mencapai jaringan sasarannya, yaitu kulit. Hal yang dievaluasi adalah pengaruh konsumsi suplementasi oral dalam jangka waktu tertentu secara rutin terhadap morfologi serta penampilan fisik kulit. Penelitian yang ditinjau ditampilkan pada Tabel 7. Penelitian dilakukan pada subjek manusia dengan kisaran usia yang luas, dari usia 21 hingga 70 tahun, dengan tujuan untuk melihat ada atau tidaknya respon yang berbeda antar usia. Hidrolisat kolagen yang digunakan untuk suplementasi berada pada kisaran berat molekul yang rendah, yaitu 0,3-8 kDa, dengan sumber beragam, yaitu *marine*, *porcine*, *bovine*, serta unggas.

Suplementasi dilakukan dengan kisaran dosis yang sudah terbukti aman dan tidak menimbulkan efek samping dalam penelitian klinis sebelumnya, serta didasarkan pada hasil penelitian bioavailabilitas *in vivo* peptida kolagen, yaitu 2-10 g. Berdasarkan hasil dengan dosis beragam, dapat ditemukan pengaruh yang positif terhadap perbaikan jaringan kulit pada seluruh tingkat dosis. Bila dilihat lebih dekat melalui salah satu penelitian dengan dua dosis berbeda, yaitu 2,5 dan 5 g peptida kolagen *porcine*, keduanya mampu memberikan efek positif yang tidak saling berbeda secara signifikan (Proksch *et al.*, 2013). Asserin *et al.* (2015) yang menggunakan dosis tertinggi dari penelitian lain yang ditinjau, yaitu 10 g peptida kolagen, juga menyatakan dalam penelitiannya bahwa sebenarnya tujuan suplementasi *anti-aging* masih dapat tercapai meskipun menggunakan dosis yang lebih rendah. Dampak perbaikan pada kulit ditemui juga di semua hasil penelitian dengan jenis dan berat molekul hidrolisat yang berbeda-beda.

4.5.1. Peningkatan Elastisitas Kulit

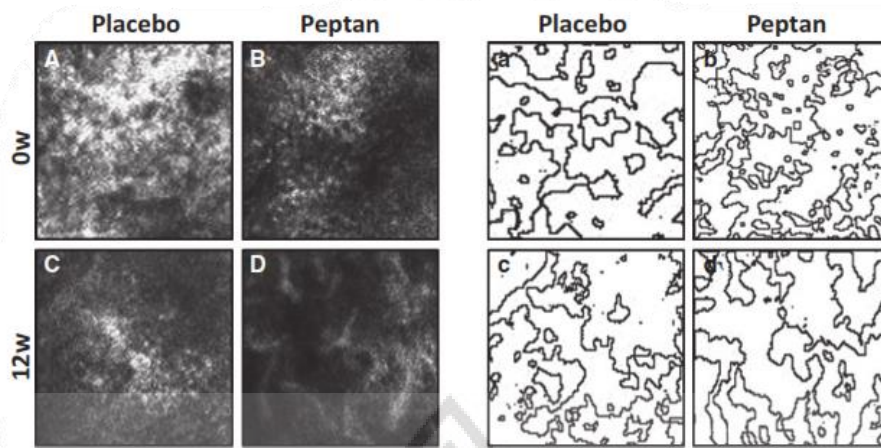
Peningkatan elastisitas kulit merupakan dampak yang paling banyak diamati pada penelitian-penelitian tersebut (Bolke *et al.*, 2019; Czajka *et al.*, 2018; Duteil *et al.*, 2016; Genovese *et al.*, 2017; Ito *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018; Koizumi *et al.*, 2017; Proksch *et al.*, 2013). Dampak tersebut dapat terlihat pada seluruh responden seluruh kisaran usia dengan pemberian dosis peptida kolagen yang beragam, yaitu 1-10 g di dalam masing-masing produk berkolagen, setelah konsumsi rutin selama 8 minggu atau 12 minggu. Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, peningkatan elastisitas tidak terlihat pada kelompok responden yang hanya mendapatkan produk plasebo. Kerja peptida kolagen dalam peningkatan elastisitas dapat dijelaskan dengan beberapa teori. Elastisitas dan kekenyalan kulit sangat dipengaruhi oleh jaringan kolagen dan serat elastis di dalam ECM dermis (Ishikawa *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2018; Naylor *et al.*, 2011). Serat elastis merupakan suatu rangkaian tidak larut air yang tersusun atas elastin dan mikrofibril fibrilin (Sherratt, 2009). Oleh karena itu, Genovese *et al.* (2017) dalam penelitiannya menduga bahwa peningkatan elastisitas dipengaruhi oleh mekanisme kerja *dual action* yang dilakukan oleh peptida kolagen di dalam dermis. Yang pertama, asam amino bebas akan menyediakan bahan dasar untuk pembentukan serat kolagen serta elastin. Yang kedua, peptida aktif akan berperan sebagai ligan untuk mengikat reseptor pada membran fibroblas dan menstimulasi proliferasi, serta produksi kolagen, elastin, dan HA yang baru (Czajka *et al.*, 2018; Genovese *et al.*, 2017; Sibilla *et al.*, 2015). Sebaliknya, pada kelompok plasebo, ditemukan adanya penurunan elastisitas kulit pada akhir masa penelitian, yang diduga diakibatkan oleh paparan sinar matahari musim panas saat periode penelitian dilakukan. Temuan tersebut memperkuat teori bahwa paparan sinar UV dapat memberikan dampak negatif terhadap elastisitas kulit (Genovese *et al.*, 2017; Langton *et al.*, 2010).

Selain mekanisme tersebut, Genovese *et al.* (2017) menduga bahwa bahan-bahan lain yang digabungkan selama proses formulasi produk minuman peptida kolagen juga memiliki pengaruh terhadap perbaikan elastisitas kulit, seperti vitamin C dan E serta campuran antioksidan yang dapat mendukung produksi atau mencegah degradasi lebih lanjut kolagen. Czajka *et al.* (2018) menjelaskan bahwa vitamin C dalam produk minuman berkolagen berperan sebagai kofaktor hidroksilasi asam amino lisin dan

prolin, dua asam amino utama yang membentuk serat kolagen, sehingga bermanfaat untuk menstimulasi produksi kolagen.

Kim *et al.* (2018) menjelaskan bahwa dalam penelitiannya, bahwa suplementasi oral hidrolisat dapat meningkatkan elastisitas kulit karena peran positif peptida kolagen terhadap regulasi komponen elastis ECM. Protein serat elastis suatu organisme secara alami dapat bertahan dan berfungsi dengan baik untuk jangka waktu yang lama. Namun, tidak menutup kemungkinan terpaparnya serat elastis terhadap kerusakan akibat proses penuaan, sehingga memiliki resiko terjadi penumpukan serat elastis yang sudah tua dan rusak. Maka, diperlukan adanya regulasi atau *turnover* untuk menggantikan serat yang sudah lama tersebut, melalui proses enzimatik dengan MMP (Sherratt, 2009). Metaloproteinase matriks (MMP) merupakan enzim endopeptidase yang pada saat awal sintesis tidak aktif, namun pemecahan domain propeptidanya oleh proteinase ekstraseluler dapat memicu aktivasi MMP (Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Beberapa jenis MMP, seperti MMP-2 dan MMP-9 dapat mendegradasi elastin yang sangat tidak larut menjadi komponen yang mudah larut. Gabungan keduanya bersama dengan MMP-13 berfungsi untuk memicu proses katabolik mikrofibril fibrilin (Langton *et al.*, 2010).

Dalam keadaan normal, jumlah dan aktivasi MMP dikendalikan oleh inhibitor protease yang dikenal sebagai TIMP (*Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase*). Namun, dengan proses penuaan ekstrinsik dari paparan sinar UV serta kebiasaan merokok, produksi MMP terpicu hingga terdapat peningkatan kerusakan komponen ECM dan menyebabkan penurunan elastisitas kulit (Langton *et al.*, 2010). Aktivasi dan jumlah berlebihan beberapa jenis MMP, seperti MMP-1 dan MMP-13 (kolagenase), MMP-2 (72 kDa gelatinase), serta MMP-9 (92 kDa gelatinase), dapat menyebabkan degradasi komponen elastis maupun komponen berkolagen pada matriks kulit, hingga pada keadaan yang paling kronis akan menimbulkan penyakit berat yang diakibatkan oleh kehilangan elastisitas jaringan penghubung dalam tubuh (Ashworth *et al.*, 1999). Peptida kolagen memiliki peran untuk menyeimbangkan jumlah elastin yang terdegradasi oleh MMP, dengan memicu sintesis elastin yang baru, sehingga struktur ECM dapat terjaga meskipun terpapar penuaan baik secara kronologis maupun secara ekstrinsik (Czajka *et al.*, 2018; Genovese *et al.*, 2017; Sibilla *et al.*, 2015).



Gambar 10. Pengaruh suplementasi 10 g peptida kolagen pada fragmentasi jaringan kolagen dibandingkan dengan plasebo pada awal (minggu ke-0) dan akhir (minggu ke-12) penelitian (Asserin *et al.*, 2015)

Selain mengubah elastisitas dan struktur kulit, fragmentasi jaringan kolagen oleh MMP juga mempengaruhi lingkungan mikro sel fibroblas, menyebabkan lepasnya sel dari jaringan serat kolagen yang tipis, pendek, tidak beraturan, serta kekurangan stimulus untuk memicu sintesis kolagen (Varani *et al.*, 2006). Maka, aktivitas MMP dapat diamati melalui keadaan fragmentasi kolagen di dalam kulit. Suplementasi oral peptida kolagen *marine* terbukti berhasil mengurangi fragmentasi kolagen di dalam lapisan retikuler dermis yang diduga disebabkan oleh produksi inhibitor TIMP1 yang menghambat ekspresi enzim MMP1 kolagenase. Perbandingan tampilan retikuler dermis (Gambar 10) menunjukkan bahwa responden yang mengkonsumsi plasebo menghasilkan struktur kolagen yang berukuran lebih kecil serta terpecah belah pada minggu ke-12, dibandingkan keadaan awal. Sedangkan responden yang mengkonsumsi 10 g peptida kolagen selama 12 minggu menunjukkan struktur kolagen yang lebih luas dan besar dibandingkan keadaan awal, maupun hasil plasebo (Asserin *et al.*, 2015).

4.5.2. Peningkatan Tingkat Hidrasi Kulit

Dampak positif lain yang terdeteksi setelah suplementasi oral hidrolisat kolagen adalah peningkatan kelembaban kulit (Asserin *et al.*, 2015; Bolke *et al.*, 2019; Ito *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018; Koizumi *et al.*, 2017) atau penurunan tingkat kekeringan kulit dan kulit pecah-pecah (Schwartz & Park, 2012). Kelembaban atau hidrasi kulit yang berperan pada kesehatan dan penampilan kulit dipengaruhi oleh kecepatan penguapan, serta banyaknya air yang terikat pada komponen HA di dalam dermis dan epidermis

(Calleja-Agius *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2018). Peptida Pro-Hyp yang terdeteksi setelah suplementasi oral hidrolisat kolagen bila berhasil mencapai sel fibroblas di dalam kulit, memiliki kemampuan untuk memicu proliferasi sel yang terlihat dari peningkatan jumlah sel fibroblas, serta memicu sintesis HA yang selaras dengan hasil pengamatan tingkat ekspresi mRNA HAS2. Ketiganya merupakan hasil *dose-dependent* pengamatan *in vitro* dengan hasil maksimal didapati pada pemberian Pro-Hyp 200 nmol/ml, dan akan mengalami penurunan pada dosis Pro-Hyp 400 nmol/ml (Ohara *et al.*, 2010). Hasil maksimal pada dosis tersebut mendekati konsentrasi paling tinggi peptida mengandung Hyp yang dapat terdeteksi di dalam darah setelah suplementasi oral hidrolisat kolagen (Tabel 5), yaitu kurang lebih 140 nmol/ml plasma darah (Ohara *et al.*, 2007). Sehingga, konsumsi hidrolisat kolagen terbukti dapat meningkatkan produksi HA serta sel fibroblas melalui aktivitas dipeptida Pro-Hyp, sesuai dengan teori mekanisme kerjanya (Czajka *et al.*, 2018; Genovese *et al.*, 2017; Sibilla *et al.*, 2015).

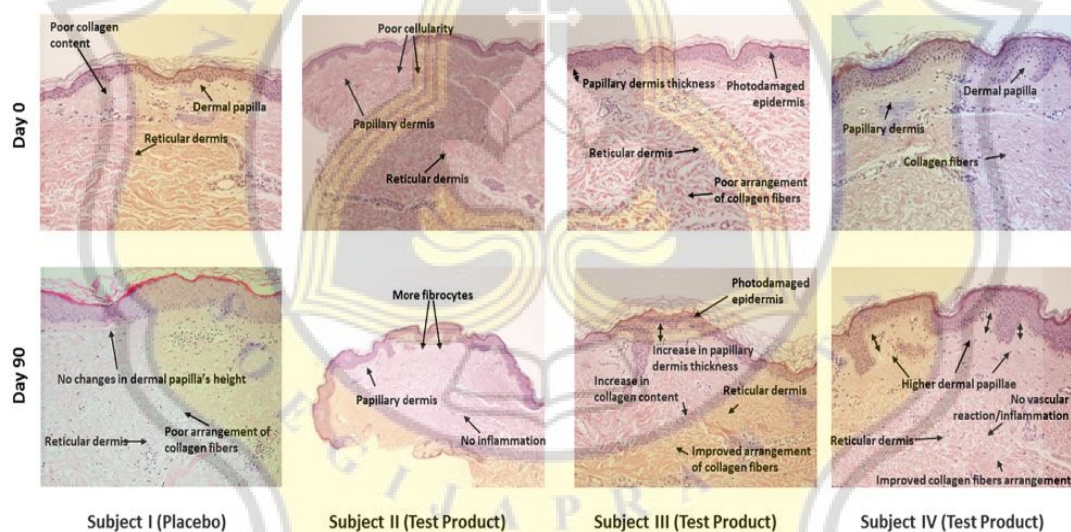
Peningkatan HA juga teramati pada studi peningkatan kadar glikosaminoglikan *ex vivo* menggunakan eksplan kulit manusia yang diinkubasi di dalam larutan peptida kolagen, karena HA merupakan salah tipe glikosaminoglikan yang dapat mengikat air di dalam kulit. Hasilnya, terdapat peningkatan level glikosaminoglikan tergantung dosis (*dose-dependent*) pada lapisan basal epidermis hingga 5,4% yang dapat dianggap sebagai peningkatan biologis yang signifikan. Sehingga, peptida kolagen terbukti dapat memberikan efek melembabkan pada kulit, dilihat dari peningkatan produksi glikosaminoglikan yang signifikan (Asserin *et al.*, 2015).

Peningkatan kelembaban sering terlihat berdampingan dengan peningkatan elastisitas kulit, setelah konsumsi hidrolisat kolagen secara oral. Kedua dampak positif ini dapat terdeteksi karena air yang diikat oleh HA dapat menghidrasi protein elastis dalam dermis. Hidrasi yang cukup dibutuhkan oleh protein elastis untuk melakukan perubahan *conformational* atau perubahan bentuk. Dengan kata lain, menciptakan protein dengan fleksibilitas yang tinggi yang memberikan efek kencang serta kenyal pada kulit (Gosline *et al.*, 2002).

4.5.3. Pengamatan Histologi Kulit setelah Suplementasi Hidrolisat Kolagen

Beberapa penelitian yang ditinjau memberikan tampilan lebih dekat pada keadaan histologi kulit setelah dilakukan suplementasi hidrolisat kolagen. Czajka *et al.* (2018)

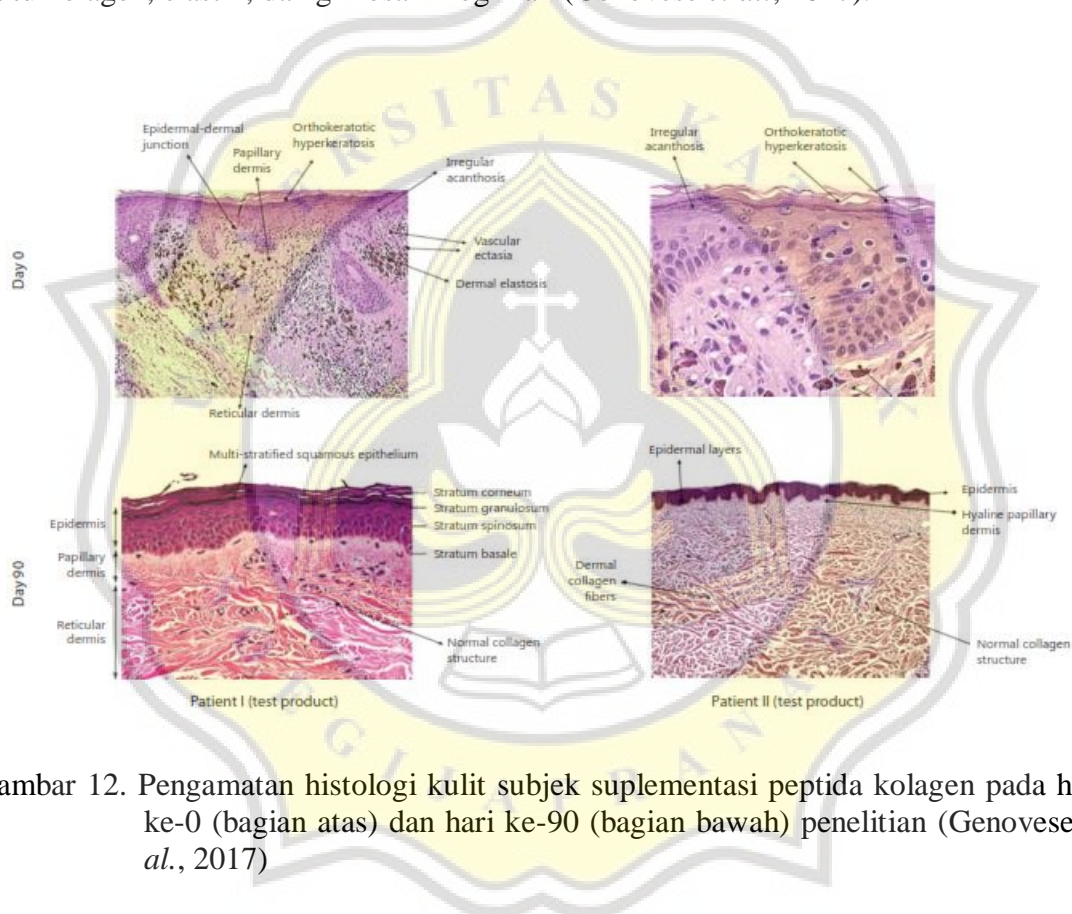
melakukan pengamatan terhadap sampel kulit lengan bagian dalam yang diperoleh melalui biopsi dari subjek yang mendapat perlakuan plasebo, serta subjek yang mendapatkan suplementasi produk hidrolisat kolagen (Gambar 11). Dari pengamatan tersebut, subjek pada hari ke-0 menunjukkan karakteristik kulit yang telah mengalami proses penuaan kronologis serta kerusakan akibat *photoaging*, yaitu ketidakteraturan susunan serat kolagen, papila dermis yang tipis, elastosis (kerusakan komponen elastis), serta kadar kolagen yang sangat sedikit di dalam lapisan kulit. Setelah suplementasi hidrolisat kolagen selama 90 hari, terlihat adanya perbaikan pada struktur dan stratifikasi lapisan epidermis, dan perbaikan susunan serat kolagen pada lapisan dermis yang ditunjukkan oleh peningkatan jumlah dan lebar serat. Selain itu, terlihat pula peningkatan ketebalan dermis papiler dan jumlah fibrosit, serta berkurangnya elastosis dan peradangan akibat *photo-damage*. Dampak positif ini tidak terdeteksi pada subjek yang hanya menerima plasebo.



Gambar 11. Pengamatan histologi kulit subjek suplementasi peptida kolagen (*Subject II-IV*), dan plasebo (*Subject I*) pada hari ke- 0 (bagian atas) dan hari ke-90 (bagian bawah) penelitian (Czajka *et al.*, 2018)

Pengamatan histologi yang dilakukan oleh Genovese *et al.* (2017) menunjukkan hasil yang serupa (Gambar 12). Hasil biopsi kulit subjek pada hari ke-0 memiliki karakteristik kerusakan kulit akibat *photo-aging*, berupa *orthokeratotic hyperkeratosis* (penebalan lapisan keratin dan penahanan keratinosit), akantosis (penebalan dan perubahan warna kulit), *vascular ectasia* (gangguan saluran darah pada dermis),

elastosis, dan penipisan lapisan pertemuan epidermis-dermis. Perbaikan kulit nampak setelah 90 hari suplementasi hidrolisat kolagen, yang terlihat dari struktur serta stratifikasi lapisan dermis yang lebih jelas dan berkurangnya kerusakan *photo-damage*, sesuai dengan hasil penelitian Czajka *et al.* (2018). Gambar 12 membuktikan bahwa suplementasi peptida kolagen berhasil mencapai kulit dan mampu memperbaiki kesehatan kulit secara histologi. Kemampuan tersebut berhubungan dengan peran peptida kolagen dalam memperbaiki ketebalan dan susunan lapisan kulit, serta menyeimbangkan proses degradasi dengan sintesis komponen penyusun fungsi kulit, yaitu kolagen, elastin, dan glikosaminoglikan (Genovese *et al.*, 2017).

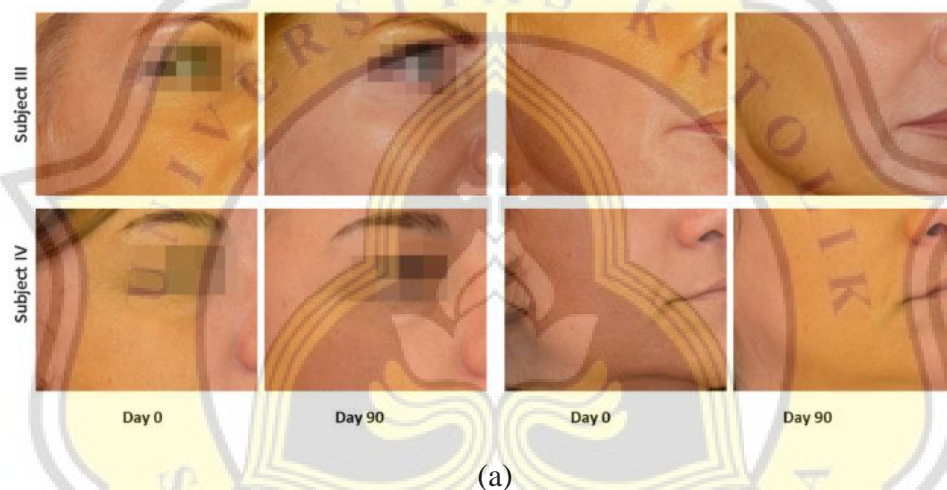


Gambar 12. Pengamatan histologi kulit subjek suplementasi peptida kolagen pada hari ke-0 (bagian atas) dan hari ke-90 (bagian bawah) penelitian (Genovese *et al.*, 2017)

4.5.4. Penampilan Fisik Kulit setelah Suplementasi Hidrolisat Kolagen

Keberhasilan suplementasi dalam perbaikan struktur kulit tidak hanya berhenti pada tingkat histologi saja, namun struktur dan susunan lapisan kulit yang baik juga dapat memberikan perbaikan pada penampilan fisik kulit. Salah satu tanda penuaan yang paling terlihat secara fisik adalah munculnya kerutan serta garis halus pada kulit. Maka, penelitian yang ditinjau menggunakan parameter tersebut untuk mengamati pengaruh suplementasi hidrolisat kolagen. Hasilnya, konsumsi hidrolisat kolagen selama 8-12

minggu secara rutin berhasil menyamarkan garis-garis halus serta kerutan pada kulit (Czajka *et al.*, 2018; Duteil *et al.*, 2016; Genovese *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018; Koizumi *et al.*, 2017; Schwartz & Park, 2012). Penelitian yang ditinjau mengamati perubahan ini melalui penampilan kerutan wajah subjek yang terdapat pada mata atau periorbital (*crow's feet*) dan lipatan nasolabial (*smile lines*) yang dapat dilihat pada Gambar 13 dan 14. Dari kedua gambar tersebut, terlihat bahwa garis halus yang terlihat pada bagian mata sebelum suplementasi secara signifikan tersamarkan setelah dilakukan suplementasi selama 90 hari, begitu juga dengan kerutan nasolabial yang ada pada area mulut dan hidung. Kulit yang bebas kerutan serta garis halus menjadikan kulit subjek terlihat lebih rata, kencang, dan muda.



(b)

Gambar 13. Penampilan garis halus pada bagian periorbital dan lipatan nasolabial pada hari ke-0 sebelum suplementasi, dan hari ke-90 setelah suplementasi hidrolisat kolagen: (a) Hasil penelitian Czajka *et al.* (2018), dan (b) Hasil penelitian Genovese *et al.* (2017)



Gambar 14. Penampilan garis halus pada bagian periorbital pada hari ke-0 dan minggu ke-12 penelitian pada subjek yang menerima plasebo (bagian atas), dan subjek yang menerima suplementasi hidrolisat kolagen (bagian bawah) (Koizumi *et al.*, 2017)

Perbaikan fisik lainnya yang terlihat adalah penyamaran tampilan pori-pori (Ito *et al.*, 2018) serta perbaikan tekstur kulit (Koizumi *et al.*, 2017). Asserin *et al.* (2015) menemukan peningkatan kepadatan kolagen di dalam dermis sebesar 9% setelah suplementasi dengan peptida kolagen, serta peningkatan jumlah kolagen sebesar 5% pada sampel kulit manusia (*ex vivo*) yang terendam dalam larutan peptida kolagen. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa pemberian peptida kolagen dapat memicu sintesis kolagen, yang kemudian dapat memperkuat lapisan dermis sehingga mengurangi penampilan garis halus serta kerutan. Genovese *et al.* (2017) memperkuat penemuan tersebut dengan menjelaskan bahwa subjek yang menerima suplementasi kolagen memiliki ketebalan dan susunan lapisan kulit yang lebih baik, sehingga dilihat dari luar, akan memiliki penampilan yang lebih merata dan lebih sedikit garis halus yang tampak. Mengingat bahwa hasil pengamatan penampilan fisik kulit pada Gambar 13b diambil dari subjek yang sama dengan hasil pengamatan histologi kulit pada Gambar 12, mengindikasikan keberhasilan hidrolisat kolagen sebagai suplementasi *anti-aging*. Subjek yang menerima plasebo tidak menunjukkan adanya perbaikan pada kerutan periorbital, bahkan garis halus lebih terlihat pada akhir masa penelitian (Gambar 14).

4.6. Pertimbangan yang Muncul selama Proses Konsumsi Suplementasi Hidrolisat Kolagen

Penelitian-penelitian mengenai suplementasi oral hidrolisat kolagen yang ditinjau menyajikan hasil yang dapat ditelusuri lebih lanjut, berkaitan dengan aktivitas suplementasi. Czajka *et al.* (2018) mengamati adanya pengaruh usia pada perbedaan elastisitas kulit, dimana pada kelompok responden usia lebih muda (21-50 tahun) menunjukkan elastisitas kulit yang lebih tinggi pada saat sebelum percobaan, dan terus meningkat pada masa suplementasi dengan hidrolisat kolagen. Sedangkan kelompok responden usia lebih tua (51-70 tahun) pada saat sebelum percobaan secara alami memiliki elastisitas kulit yang lebih rendah, dan tanpa perlakuan suplementasi atau plasebo, akan terus mengalami penurunan hingga pada akhir pengamatan berkurang 10% dari elastisitas awalnya. Perbedaan tersebut dikarenakan salah satu tanda penuaan kronologis adalah defisiensi kandungan serat kolagen dan serat elastis, bersama dengan peningkatan aktivitas elastase pada dermis (Imokawa & Ishida, 2015). Peningkatan elastisitas kulit pada kelompok responden usia lebih muda terdeteksi lebih cepat dibandingkan dengan kelompok responden usia lebih tua yang baru terdeteksi adanya peningkatan setelah 60 hari. Sehingga, suplementasi oral untuk kelompok usia 51-70 tahun perlu dilakukan selama periode waktu yang lebih lama untuk mencapai tujuan suplementasi, mempertimbangkan juga ketidaksempurnaan absorpsi mikronutrien yang ditemukan pada konsumen usia tua (Czajka *et al.*, 2018).

Selama proses suplementasi, peningkatan elastisitas kulit dapat terdeteksi pada subjek dengan atau tanpa perawatan kosmetik secara *topical*. Bahkan, pada kelompok responden yang tidak menerima perawatan kosmetik, peningkatan elastisitas lebih terlihat secara signifikan, menandakan bahwa perawatan secara *topical* saja tidak dapat meningkatkan elastisitas kulit. Namun, gabungan kedua suplementasi menghasilkan peningkatan elastisitas yang lebih besar dibandingkan suplementasi secara oral saja (+9,1%). Penemuan tersebut menandai bahwa pemberian suplementasi dapat dilakukan bersama dengan perawatan kosmetik untuk memaksimalkan hasil akhir (Genovese *et al.*, 2017). Suplementasi peptida kolagen terbukti memiliki efek fisiologis yang jangka panjang pada kulit, dilihat dari pengaruh yang diberikan. Dampak positif suplementasi hidrolisat kolagen masih dapat terdeteksi pada epidermis dan dermis, di akhir fase *washout* yang berlangsung selama 4 minggu. Berbeda dengan produk suplementasi

topical yang hanya dapat mengatasi masalah kulit dengan meningkatkan kelembaban epidermis. Sehingga saat perawatan dihentikan, perbaikan pada kulit tidak terlihat atau bertambah lagi karena kulit kembali mengalami dehidrasi (Proksch *et al.*, 2013).

Penelitian yang ditinjau (Tabel 7) membuktikan bahwa meskipun diberikan pada kisaran dosis yang berbeda, perbaikan struktural lapisan kulit dan penampilan kulit dapat terdeteksi pada seluruh responden yang menerima suplementasi hidrolisat kolagen. Sehingga, penggunaan dosis 1-10 g peptida kolagen dalam suatu produk sudah terbukti dapat memberikan manfaat untuk menyamarkan tanda-tanda penuaan serta memelihara kesehatan kulit. Diduga karena suplementasi dilakukan dalam jangka waktu yang panjang secara rutin. Namun, dengan mempertimbangkan bioavailabilitas hidrolisat kolagen berdasarkan pengujian klinis yang ditinjau, dosis yang diberikan paling tidak sebesar 0,15 g/kg berat badan konsumen. Dosis tersebut terbukti dapat meningkatkan konsentrasi Hyp di dalam darah secara signifikan (Shigemura *et al.*, 2014).

Produk formulasi maupun produk komersial yang digunakan sebagai bahan utama pengujian klinis terhadap dampak konsumsi peptida kolagen yang ditinjau menggunakan hidrolisat kolagen dengan kisaran berat molekul yang rendah (< 8 kDa). Seluruh produk, tidak memandang berat molekulnya, mampu memberikan efek positif terhadap keadaan kulit subjek. Meskipun demikian, terbukti bahwa penggunaan hidrolisat kolagen dengan berat molekul di bawah 8 kDa lebih populer di industri pangan, dibandingkan dengan hidrolisat kolagen dengan berat molekul lebih tinggi. Pemilihan jenis hidrolisat ini dilakukan diduga didasarkan pada sifatnya yang lebih mudah dicerna, diserap, dan didistribusikan oleh tubuh menuju jaringan yang menjadi target suplementasi (León-López *et al.*, 2020; Sibilla *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014, 2015). Namun mengingat hasil penelitian mengenai kelarutan dan viskositas hidrolisat kolagen yang ditinjau (Tabel 3 dan Tabel 4), hidrolisat dengan berat molekul di bawah 10 kDa terbukti memiliki karakteristik yang lebih menguntungkan dalam formulasi produk. Kelarutan hidrolisat ini tidak dipengaruhi secara kuat oleh pH pelarut, bahkan dapat melebihi 95% pada berat molekul 1-5 kDa, sehingga lebih mudah diaplikasikan pada makanan maupun minuman fungsional. Viskositas hidrolisat juga tidak melebihi 2,54 cP, sehingga meminimalisir perubahan tekstur produk suplementasi.