

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Kolagen merupakan salah satu protein yang penting dalam tubuh manusia akibat kontribusinya terhadap struktur kulit, jaringan pengikat, tendon, tulang, dan tulang rawan (Sandhu *et al.*, 2012). Kolagen bertanggung jawab terhadap kekuatan dan *tensile strength* kulit manusia (Baumann, 2007), penyembuhan luka pada kulit, memberikan kekuatan struktur pada tulang, tendon, dan ligamen (Sandhu *et al.*, 2012). Kolagen dapat disintesis dan didegradasi dalam tubuh manusia akan tetapi studi yang dilakukan oleh Sivan *et al.*, (2008) menunjukkan bahwa laju sintesis atau produksi kolagen dalam tubuh menurun seiring dengan pertambahan usia. Selain itu, kolagen pada kulit manusia yang bertanggung jawab terhadap kekuatan kulit juga mengalami penurunan setiap unit area dari permukaan kulit sekitar 1% per tahun (Baumann, 2007).

Kolagen selain dalam tubuh manusia dapat ditemukan di beberapa jenis jaringan hewan seperti tendon, jaringan pengikat, tulang, dan kulit dari sapi, domba, babi, ayam, bebek, hingga hewan laut seperti ikan, gurita, cumi-cumi, dan lain sebagainya (Lopez *et al.*, 2019). Konsumsi kolagen yang diekstraksi dari jaringan hewan dapat menjadi solusi untuk meningkatkan sintesis kolagen dalam tubuh manusia (de Paz-Lugo *et al.*, 2018; Khatri *et al.*, 2021). Akan tetapi, kolagen merupakan protein suku tinggi dengan berat molekul kolagen yang sangat besar yaitu 300.000 gram per mol (Sorushanova *et al.*, 2019). Akibatnya, kolagen menjadi sulit dicerna, diserap, dan diedarkan dalam sistem sirkulasi tubuh manusia (Aguirre-Cruz *et al.*, 2020; Skov *et al.*, 2019). Untuk mengatasi masalah tersebut maka perlu adanya pemutusan ikatan peptida kolagen untuk menghasilkan peptida kolagen dengan berat molekul yang lebih rendah agar lebih mudah dicerna dan diserap oleh tubuh manusia.

Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa kolagen yang telah dipecah menjadi bentuk peptida dengan berat molekul rendah (3-6 kDa) memiliki *bioavailability* yang lebih tinggi sehingga lebih cepat dan lebih mudah dicerna dan diserap oleh tubuh manusia secara oral (Aguirre-Cruz *et al.*, 2020; Lopez *et al.*, 2019; Skov *et al.*, 2019). Berbagai macam metode untuk menghasilkan peptida kolagen juga telah dilakukan yaitu melalui metode hidrolisis enzimatis baik melalui enzim yang diekstraksi dari jaringan hewan hingga mikroba (Abuine *et al.*, 2019). Metode hidrolisis kolagen dibuktikan dapat

memutus ikatan peptida kolagen menjadi rangkaian asam amino yang beragam dengan komposisi asam amino terbesar yaitu glisin, prolin, dan hidroksiprolin dengan berat molekul yang berkisar antara 1-10 kDa (Khiari *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2019). Namun analisis mengenai perbandingan hasil hidrolisis kolagen dengan berbagai macam metode enzimatik dan efisiensi penyerapan hasil hidrolisis kolagen tersebut belum banyak dikaji.

Oleh sebab itu, penelitian yang mengkaji tentang efektivitas metode hidrolisis kolagen yang berkembang serta penyerapan hasil hidrolisis kolagen dengan berat molekul rendah perlu dilakukan. Metode hidrolisis kolagen yang akan dikaji adalah hidrolisis kolagen secara enzimatik. Hidrolisis asam/basa tidak dikaji dikarenakan metode tersebut membutuhkan kondisi yang ekstrim serta memerlukan purifikasi untuk memisahkan solven yang cenderung membahayakan lingkungan.

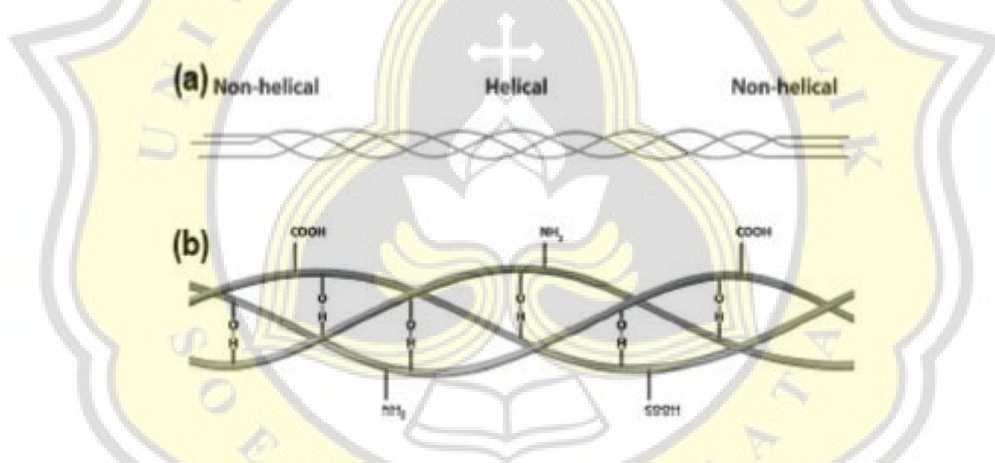
Penelitian ini akan mengulas tentang analisa penyerapan hidrolisat kolagen dengan berbagai berat molekul (BM) yang berbeda dan metode pembuatan hidrolisat kolagen yakni hidrolisis enzimatik kolagen dari penelitian-penelitian yang telah ada. Fokus dari penelitian ini adalah mengkaji efisiensi penyerapan peptida kolagen dengan BM tertentu yang dikonsumsi secara oral hingga terserap ke plasma darah serta menentukan metode hidrolisis kolagen secara enzimatik yang efektif dan menghasilkan BM rendah serta memenuhi karakteristik peptida kolagen yang dapat diserap ke dalam tubuh secara efisien. Hipotesis dari penelitian ini adalah metode hidrolisis enzimatik kolagen yang berbeda memberikan pengaruh terhadap efektivitas dari metode hidrolisis serta berat molekul dari peptida kolagen sehingga berpengaruh terhadap efisiensi penyerapan peptida kolagen dalam tubuh.

## **1.2. Tinjauan Pustaka**

### **1.2.1. Kolagen**

Kolagen merupakan salah satu protein utama dalam matriks ekstraseluler yang banyak dimanfaatkan dalam industri pangan, kosmetik, farmasi, dan biomedis (Lopez *et al.*, 2019). Kolagen adalah protein yang meliputi golongan glikoprotein dan memiliki 3 karakteristik tertentu. Karakteristik pertama adalah adanya rangkaian asam amino berulang yaitu  $[Gly-X-Y]_n$  dengan atau tanpa adanya interupsi. Karakteristik kedua

adalah posisi X dan posisi Y yang umumnya berupa prolin dan hidrokisprolin secara berturut-turut. Karakteristik ketiga adalah struktur molekul dari kolagen yang terbentuk dari 3 *left-handed polypeptide* rantai  $\alpha$  dengan panjang yang sama dan terikat satu sama lain menjadi suatu rangkaian *triple-helix* sehingga membentuk struktur seperti tali (*rope-like structure*). Struktur *triple-helix* kolagen terdiri dari 1 area *triple-helix* dan 2 area *non-helix* pada ujung-ujungnya. Struktur kolagen mengandung ikatan hidrogen intramolekuler yang berfungsi untuk menstabilkan bentuk *triple-helix* dari kolagen. Terdapat 2 ikatan hidrogen setiap triplet kolagen, yang pertama terletak diantara gugus amina dari residu glisil dan gugus karboksil di posisi kedua serta yang kedua berupa molekul air yang berpartisipasi dalam pembentukan ikatan hidrogen tambahan dengan bantuan gugus hidroksil dari hidrokisprolin di posisi ketiga. Molekul kolagen memiliki berat molekul sekitar 300.000 gram per mol, panjang sebesar 280 nm, dan diameter sepanjang 1,4 nm (Sorushanova *et al.*, 2019).



Gambar 1. (a) Struktur kolagen *triple-helix* (b) Ikatan hidrogen dalam ikatan *triple-helix* (Sorushanova *et al.*, 2019)

Berdasarkan komposisi rantai  $\alpha$ , panjang dan pengulangan rangkaian asam amino Gly-X-Y, dengan atau tanpa interupsi, serta asam amino yang menempati posisi X dan Y, kolagen dapat dibagi menjadi berbagai tipe, sebanyak 29 tipe kolagen telah diidentifikasi. Dari 29 tipe kolagen, kolagen dapat dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kolagen *fibrillar* dan kolagen *non-fibrillar* (kolagen pembentuk jaringan). Kolagen *fibrillar* terdiri dari tipe I, II, III, V, XI, XXIV, dan XXVII. Sedangkan kolagen *non fibrillar* terdiri dari FACIT (*fibril associated collagens with interrupted triple helices*), MACIT (*membrane associated collagens with interrupted triple helices*), dan MULTIPLEXIN (*multiple triple-helic domains and interruptions*). Dari kedua kelompok kolagen tersebut, kolagen

*fibrillar* merupakan jenis kolagen yang paling banyak ditemukan pada vertebrata dan manusia dan berkontribusi dalam bentuk, properti mekanik dari jaringan, *tensile strength* pada kulit, serta resistensi terhadap daya tarik pada ligamen. Kolagen tipe I banyak ditemukan dalam kulit, gigi, tendon, ligamen, dan organ. Kolagen tipe II banyak ditemukan dalam tulang rawan, sedangkan kolagen tipe III banyak ditemukan dalam kulit, otot, dan pembuluh darah (Lopez *et al.*, 2019; Soroushanova *et al.*, 2019).

### 1.2.2. Peptida Kolagen

Peptida kolagen atau *hydrolyzed collagen* merupakan hasil hidrolisis atau penguraian dari *native collagen* atau kolagen yang berstruktur *triple-helix*. Peptida kolagen memiliki karakteristik yang sangat berbeda dengan *native collagen*. Salah satunya adalah penurunan berat molekul menjadi 3-6 KDa yang sangat signifikan dibandingkan dengan berat molekul *native collagen* yang mencapai 285-300 KDa (Lopez *et al.*, 2019). Penurunan berat molekul ini disertai dengan pengecilan ukuran molekul sehingga peptida kolagen dapat dengan mudah diserap oleh kulit maupun pencernaan manusia dan dapat didistribusikan dengan cepat dalam tubuh manusia (Aguirre-Cruz *et al.*, 2020; Lopez *et al.*, 2019; Skov *et al.*, 2019). Pengukuran berat molekul peptida kolagen tersebut dapat dilakukan dengan berbagai macam metode, yaitu SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*), dan SEC (*Size Exclusion Chromatography*) seperti GPC (*Gel Permeation Chromatography*), GFC (*Gel Filtration Chromatography*), serta HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Abdollahi *et al.*, 2018; Chi *et al.*, 2016; Cuevas-Acuña *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2014).

Proses penguraian *native collagen* juga mampu menyebabkan perubahan distribusi muatan pada permukaan molekul akibat adanya perubahan bentuk molekul. Perubahan distribusi muatan ini menyebabkan peptida kolagen memiliki gaya elektrostatis yang sangat besar dan saling bertolakbelakang sehingga mampu meningkatkan sifat solubilitasnya (Zhang *et al.*, 2017). Peptida kolagen tidak berwarna, tidak berbau, transparan, dapat digunakan sebagai *emulsifier* atau *stabilizer*, tidak dapat membentuk lapisan film, memiliki viskositas yang rendah, dan alergenitas yang rendah (Lopez *et al.*, 2019).

### 1.2.3. Absorpsi Peptida Kolagen dalam Tubuh Manusia

Proses absorpsi peptida merupakan suatu proses penyerapan molekul hasil pencernaan peptida yang berlangsung di saluran pencernaan manusia ke dalam plasma darah. Peptida yang berukuran  $>600$  Da dapat melewati sel membran usus akan tetapi hanya dalam jumlah yang kecil. Umumnya, peptida yang berukuran besar akan membentuk fagolisosom untuk memecah peptida yang berukuran besar dengan enzim peptidase. Hasil pemecahan peptida adalah peptida dengan ukuran yang lebih kecil yang dapat berbentuk rangkaian asam amino atau asam amino tunggal (Miner-Williams *et al.*, 2014; Newey & Smyth, 1959). Tidak hanya peptida berukuran besar, peptida dengan berat molekul rendah juga akan mengalami degradasi protease namun dengan tingkat degradasi yang lebih rendah sesuai dengan rangkaian peptidanya (Shen & Matsui, 2017). Hasil degradasi peptida yang berukuran kecil kemudian dapat diserap oleh membran usus melalui sistem transportasi peptida yang spesifik. Salah satu *transporter* peptida adalah PepT1 yang ditemukan pada tahun 1994 dari kloning usus kelinci. PepT1 dapat mendeteksi peptida yang memiliki 2 atau 3 ikatan peptida (2 atau 3 asam amino) sehingga dapat memfasilitasi penyerapan dari dipeptida dan tripeptida (Miner-Williams *et al.*, 2014; Shen & Matsui, 2017). Peptida tersebut kemudian akan masuk ke dalam aliran darah yaitu pada plasma darah dan didistribusikan ke seluruh tubuh manusia (Shen & Matsui, 2017).

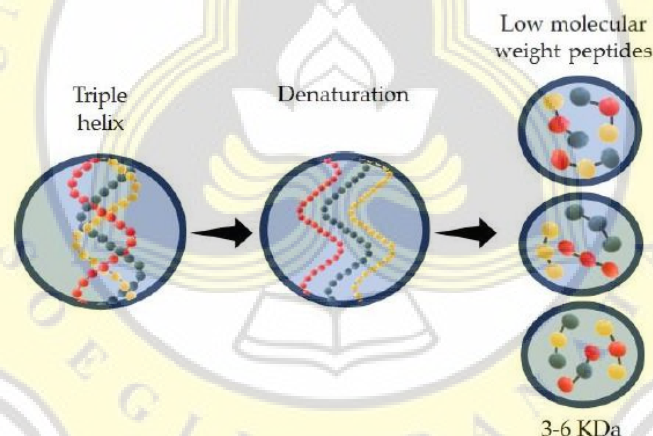
### 1.2.4. Identifikasi Peptida Kolagen dalam Plasma Darah Manusia

Penyerapan peptida kolagen yang dikonsumsi secara oral dapat diidentifikasi dalam plasma darah manusia dalam bentuk peptida ataupun asam amino bebas. Beberapa penelitian mengidentifikasi peptida kolagen yang telah dikonsumsi secara oral dan yang terserap ke plasma darah manusia dalam bentuk asam amino bebas Hyp (*free form* Hyp) dan peptida yang mengandung asam amino Hyp (*peptide form* Hyp) (Iwai *et al.*, 2005; Ohara *et al.*, 2007; Shigemura *et al.*, 2017; Shigemura *et al.*, 2014; Taga *et al.*, 2014). Penelitian-penelitian tersebut menggunakan desain studi yang melibatkan manusia sebagai subjek penelitian dengan *range* umur dan berat badan tertentu. Setiap subjek penelitian diharuskan untuk berpuasa selama 12 jam tanpa makan dan hanya diperbolehkan mengonsumsi air putih. Pada hari penelitian, subjek mengonsumsi peptida kolagen dalam jumlah tertentu yang telah dilarutkan ke dalam air. Darah vena diambil dari masing-masing subjek penelitian setelah beberapa waktu tertentu. Darah kemudian

dideproteinisasi dengan menggunakan etanol. Analisa identifikasi peptida kolagen dalam plasma darah kemudian dilakukan dengan menggunakan HPLC. Identifikasi jumlah *peptide form* Hyp dilakukan dengan pengekstraksian asam amino bebas Hyp dari total yang teridentifikasi (Iwai *et al.*, 2005).

### 1.2.5. Hidrolisis Kolagen

Proses hidrolisis atau penguraian kolagen merupakan salah satu metode yang dilakukan untuk menghasilkan peptida kolagen. Proses ini dapat diawali dengan proses denaturasi kolagen *triple-helix* yang merusak struktur *triple helix* menjadi 3 rantai  $\alpha$  yang terbuka sehingga ikatan peptida menjadi rentan untuk dipecah. Selanjutnya dilakukan proses hidrolisis untuk memecah ikatan peptida yang menghasilkan peptida kolagen berupa peptida-peptida yang tersusun dari 2-20 asam amino (Abuine *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2013). Salah satu metode hidrolisis kolagen yang berkembang adalah hidrolisis enzimatis (Abuine *et al.*, 2019; Hong *et al.*, 2019).



Gambar 2. Skema pembentukan peptida kolagen dengan berat molekul rendah (Lopez *et al.*, 2019)

Terdapat beberapa metode hidrolisis yang telah berkembang yakni hidrolisis enzimatis, hidrolisis asam/basa, dan hidrolisis *subcritical water* (Abuine *et al.*, 2019; Haq *et al.*, 2020). Hidrolisis enzimatis merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk menghidrolisis kolagen dan mampu menghasilkan peptida kolagen dengan berat molekul rendah. Hidrolisis enzimatis merupakan cara yang efisien untuk menghasilkan hidrolisat protein karena tidak menimbulkan kerusakan pada asam amino (Putri *et al.*,

2020). Metode hidrolisis ini menggunakan enzim kolagenase untuk memfasilitasi pemecahan ikatan peptida dari kolagen. Beberapa contoh dari enzim kolagenase adalah enzim tripsin, pepsin, (Jia *et al.*, 2010), PP (enzim dari pankreas sapi) (Hema *et al.*, 2017), serta enzim kolagenase yang dihasilkan oleh mikroba yaitu *Alcalase* dari *Bacillus licheniformis* (Kim *et al.*, 2001), *Flavourzyme* (*Aspergillus oryzae*) (Khiari *et al.*, 2014), PS (protease dari *Streptomyces*), dan PB (protease dari *Bacillus polymyxa*) (Li *et al.*, 2007). Selama proses hidrolisis, enzim akan memfasilitasi pemutusan peptida dari kolagen dengan adanya air sehingga dapat menghasilkan hidrolisat kolagen dengan berat molekul yang rendah (Zhang *et al.*, 2013).

Hidrolisis asam basa dilakukan dengan menambahkan larutan asam seperti HCl, asam asetat, asam laktat, asam sitrat, dan asam format maupun larutan basa seperti NaOH (Abuine *et al.*, 2019; Hong *et al.*, 2019). Hidrolisis dengan asam merupakan hidrolisis yang efektif untuk menghasilkan asam amino dan peptida. Hidrolisis dengan basa juga dapat digunakan untuk mencerna berbagai jenis protein serta untuk menganalisa komposisi dari asam amino seperti triptofan. Hal ini karena triptofan akan rusak dengan adanya hidrolisis asam (Hong *et al.*, 2019).

Metode hidrolisis lainnya yang dapat digunakan untuk menghidrolisis kolagen adalah metode *subcritical water*. Metode hidrolisis ini menggunakan kombinasi perlakuan temperatur serta tekanan tinggi. Kombinasi perlakuan tersebut diaplikasikan karena temperatur yang tinggi dalam tekanan atmosfer dan tekanan yang tinggi dalam temperatur ruangan saja tidak dapat memecah ikatan peptida dari kolagen melainkan hanya dapat mendenaturasi molekul kolagen (Ahmed & Chun, 2018). Oleh karena itu, hidrolisis *subcritical water* menggunakan kombinasi perlakuan temperatur serta tekanan tinggi sehingga dapat mengubah makromolekul kolagen menjadi molekul yang lebih kecil yaitu peptida dan asam amino. Dalam waktu hidrolisis yang lebih lama, peptida kolagen dapat diubah lebih lanjut menjadi asam amino bebas (Haq *et al.*, 2020). Akan tetapi, kondisi yang tepat perlu diaplikasikan agar tidak terjadi degradasi asam organik akibat suhu yang terlalu tinggi dan waktu hidrolisis yang terlalu lama. Metode ini merupakan salah satu metode yang sedang berkembang dan telah dibuktikan dapat digunakan untuk menghidrolisis kolagen dari kulit ikan *bigeye tuna* (Ahmed & Chun, 2018; Haq *et al.*, 2020), tulang dan kulit ikan makerel (Asaduzzaman *et al.*, 2020), plasenta babi (Park *et al.*, 2015), dan tulang ikan *Gadus morhua* (ikan kod) (Melgosa *et al.*, 2021).

### 1.2.6. Angka Derajat Hidrolisis

Indikator keberhasilan proses hidrolisis dapat diamati melalui parameter derajat hidrolisis (*degree of hydrolysis*). Angka derajat hidrolisis mewakili proporsi atau jumlah ikatan peptida yang terpecah selama proses hidrolisis berlangsung dalam satuan persen. Oleh karena itu, semakin tinggi angka derajat hidrolisis maka proses hidrolisis berjalan dengan baik dan efektif (Putri *et al.*, 2020). Angka derajat hidrolisis dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

Dimana  $h$  merupakan angka ikatan peptida yang terhidrolisis sedangkan  $h_{tot}$  merupakan jumlah ikatan peptida total yang ada pada suatu molekul yang akan dihidrolisis (Rutherford, 2010). Walaupun demikian, tidak terdapat metode standar untuk menentukan DH dalam suatu proses hidrolisis. Akan tetapi, beberapa metode telah dikembangkan untuk menentukan angka DH. Beberapa metode tersebut adalah metode *trichloroacetic soluble nitrogen* (SN-TCA), *trinitrobenzenesulfonic acid* (TNBS), pH-stat, dan *o-phthalaldehyde* (OPA). Metode SN-TCA tidak mengukur angka DH secara langsung atau tidak mengukur ikatan peptida yang diputus, melainkan mengukur persentase *soluble nitrogen* dalam larutan TCA terhadap total nitrogen dalam sampel awal (Rutherford, 2010). Pada metode ini, sampel dilarutkan dalam larutan TCA dan dihomogenisasikan hingga terbentuk *supernatant*. *Supernatant* tersebut kemudian diukur dengan menggunakan metode Lowry untuk mengukur jumlah nitrogen (Abdollahi *et al.*, 2018). Angka DH kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$DH (\%) = \frac{\text{TCA-soluble nitrogen dalam sampel}}{\text{Total nitrogen dalam sampel}} \times 100$$

Metode TNBS menentukan angka DH dengan mengukur jumlah gugus N-terminal asam amino yang terbentuk dari proses hidrolisis. Pengukuran tersebut dilakukan berdasarkan reaksi larutan TNBS dengan dengan gugus N-terminal asam amino. Reaksi larutan TNBS dan sampel akan mengubah N-terminal asam amino bebas menjadi turunan *trinitrophenyl-amino acid*. Total gugus N-terminal asam amino menunjukkan jumlah nitrogen dalam sampel protein atau komposisi asam amino setelah hidrolisis dalam 6 M

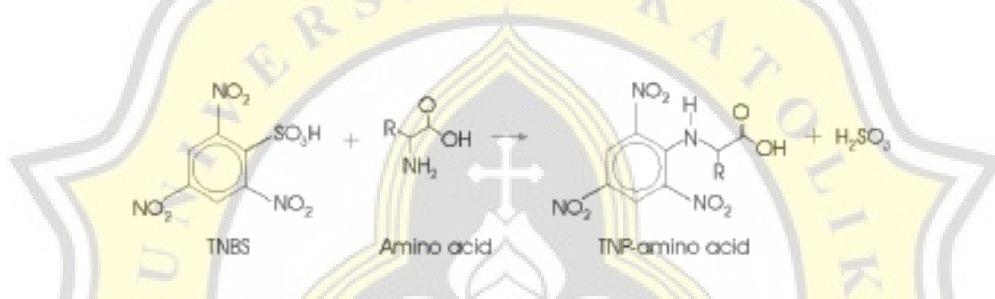


HCl pada suhu 100°C selama 24 jam. Gugus turunan *trinitrophenyl-amino acid* akan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 420 nm (Morrissey & Benjakul, 1997).

Pada metode TNBS menurut Morrissey & Benjakul (1997), jumlah asam amino dinyatakan dalam bentuk L-leusin sehingga rumus untuk mengukur DH adalah sebagai berikut:

$$DH (\%) = \frac{L_t - L_0}{L_{max} - L_0} \times 100$$

dimana  $L_t$  merupakan jumlah asam amino dalam hidrolisat,  $L_0$  merupakan jumlah asam amino dalam sampel awal, dan  $L_{max}$  merupakan jumlah asam amino dalam sampel awal yang melalui hidrolisis dengan asam (HCl 6 M) (Morrissey & Benjakul, 1997).



Gambar 3. Reaksi TNBS dengan asam amino (Rutherford, 2010)

Metode pH-stat merupakan metode untuk mengukur DH berdasarkan jumlah proton yang dihasilkan pada saat pemecahan ikatan peptida yang membebaskan gugus karboksil dan gugus amino. Pengukuran tersebut dilakukan dengan mengukur jumlah basa yang digunakan untuk mempertahankan sistem pH selama proses hidrolisis berlangsung. Selama proses hidrolisis berlangsung, gugus karboksil dan amino terbebaskan dengan pemecahan rantai peptida. Pada pH netral, gugus karboksil akan terdeionisasi sehingga terjadi perpindahan proton antara gugus karboksil dan gugus amino. Sedangkan pada pH basa, gugus amina akan terdeionisasi parsial maupun secara total bergantung pada pH dari medium reaksi. Proses pembebasan proton akan menghasilkan penurunan pH dalam campuran sehingga penambahan basa diperlukan untuk menjaga pH dari reaksi yang kemudian dapat diukur untuk menentukan angka DH. Angka DH dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$DH (\%) = \frac{B \times N_b}{\alpha \times MP \times h_{tot}} \times 100$$

dimana B menunjukkan angka jumlah konsumsi basa,  $N_b$  menunjukkan normalitas dari basa,  $M_p$  menunjukkan jumlah protein (yang umumnya diukur dari jumlah nitrogen dikalikan dengan 6,25),  $h_{tot}$  menunjukkan jumlah ikatan peptida di dalam protein, dan  $\alpha$  menunjukkan rata-rata derajat disosiasi dari gugus  $\alpha$ -amino (Adler-Nissen, 1977).

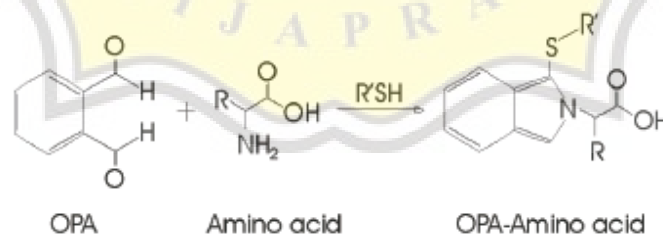
Metode OPA merupakan metode penentuan asam amino dengan menggunakan gugus thiol yang dicampurkan dengan sampel untuk menghasilkan gugus turunan berupa OPA-*amino acid*. Gugus turunan tersebut bersifat *fluorescent* sehingga dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. DH dapat diukur dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$DH (\%) = \frac{n}{N} \times 100$$

dimana n merupakan jumlah rata-rata ikatan peptida yang terhidrolisis dan N merupakan total ikatan peptida tiap molekul protein. Angka n didapatkan dari pengukuran absorbansi dengan rumus sebagai berikut:

$$n = (A_{340 \text{ sample}} - A_{340 \text{ unhydr sample}}) \times \frac{Md}{\epsilon c}$$

dimana  $A_{340}$  merupakan absorbansi sampel pada panjang gelombang 340 nm, M merupakan berat molekul dari protein dalam satuan Dalton, d merupakan faktor filusi dan dilakulasi berdasarkan jumlah sampel yang digunakan,  $\epsilon$  merupakan *extinction coefficient* dari OPA pada panjang gelombang 340 nm, dan c merupakan konsentrasi protein (Zhang *et al.*, 2013).

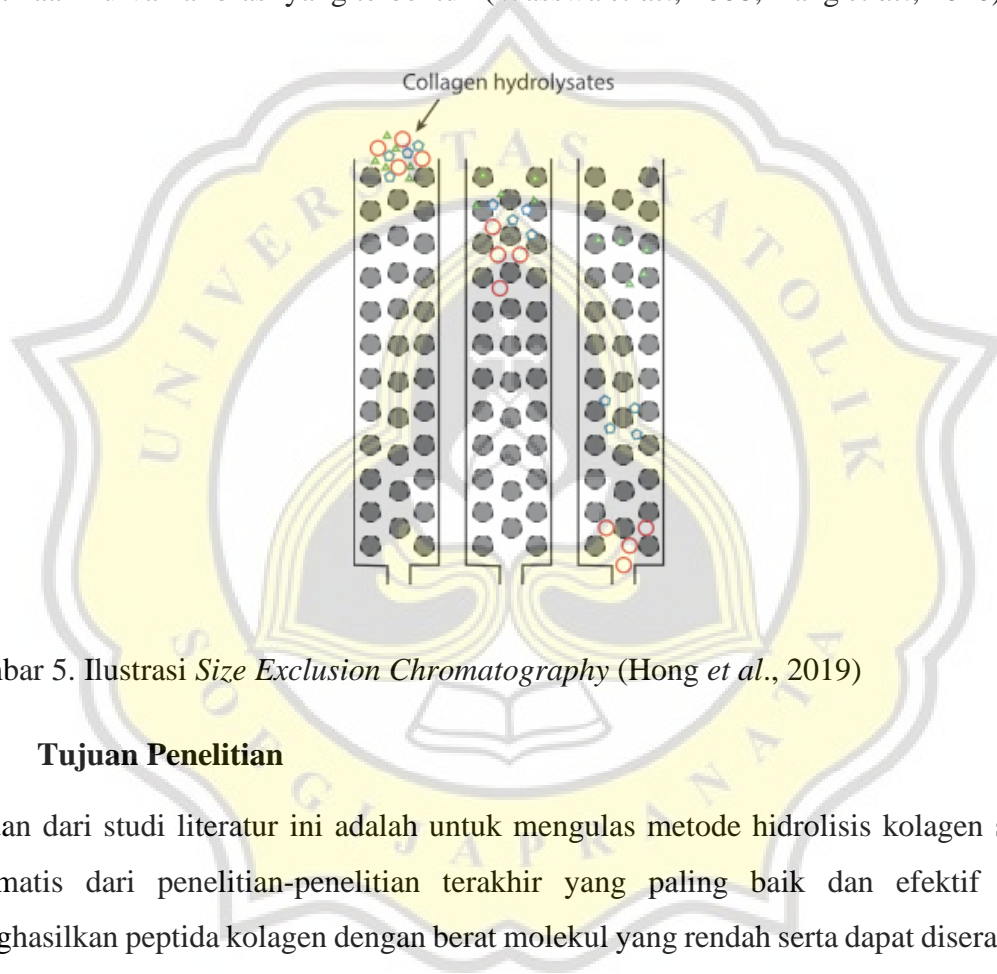


Gambar 4. Reaksi OPA dengan asam amino (Rutherford, 2010)

### 1.2.7. Metode Pengukuran Berat Molekul Peptida Kolagen

Berat molekul (BM) peptida kolagen mengalami penurunan dengan adanya pemecahan ikatan peptida kolagen selama proses hidrolisis berlangsung. Pengukuran BM dapat

diukur dengan metode *size exclusion chromatography* menggunakan alat HPLC (*high performance liquid chromatography*). Prinsip dari metode tersebut adalah memisahkan komponen berdasarkan ukuran atau BM masing-masing komponen. Oleh karena itu, campuran peptida kolagen dengan BM yang beragam dapat dipisahkan sesuai dengan BM. Peptida kolagen dengan BM lebih besar akan dielusikan lebih awal dan peptida kolagen dengan BM lebih rendah akan dielusikan terakhir (Hong *et al.*, 2019). Hasil akan ditampilkan dalam sebuah grafik dan fraksi BM dapat diukur dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi yang terbentuk (Wasswa *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2020).



Gambar 5. Ilustrasi *Size Exclusion Chromatography* (Hong *et al.*, 2019)

### 1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari studi literatur ini adalah untuk mengulas metode hidrolisis kolagen secara enzimatis dari penelitian-penelitian terakhir yang paling baik dan efektif untuk menghasilkan peptida kolagen dengan berat molekul yang rendah serta dapat diserap oleh tubuh manusia secara efisien.