



Kolagen dari Limbah Tulang Ayam (*Gallus gallus domesticus*) terhadap Aktivitas Anti Aging secara *In Vitro*

Eka Budiarti^a, Perlambang Budiarti^a, Manggar Arum Aristri^a, Irmanida Batubara^{a,b,*}

^aDepartemen Kimia, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Gedung Departemen Kimia Wing 2 Level 1, Jalan Tanjung No. 3 Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680 telp. (0251) 8624567

^bPusat Studi Biofarmaka Tropika, LPPM IPB, Jalan Taman Kencana No 3 Bogor 16128 telp (0251) 8373561

* Corresponding author

E-mail: imebatubara@apps.ipb.ac.id

DOI: 10.20961/alchemy.15.1.23046.44-56

Received 19 August 2018, Accepted 30 November 2018, Published 01 March 2019

ABSTRAK

Limbah tulang ayam meningkat seiring dengan peningkatan konsumsi ayam. Namun, belum banyak penelitian yang memanfaatkan limbah tulang sebagai sumber kolagen. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh ukuran kolagen terhadap aktivitas anti aging berupa aktivitas antioksidan, antiglikasi, dan inhibitor tirosinase secara *in vitro* dan mendapatkan teknik isolasi kolagen *anti aging* optimum dari tulang ayam. Isolasi kolagen dilakukan dengan variasi konsentrasi NaOH, yaitu 0,05 M; 0,10 M; dan 0,20 M, dilanjutkan dengan perendaman menggunakan asam asetat 1 M. Kolagen yang diisolasi dengan NaOH 0,10 M merupakan kolagen dengan ukuran partikel, rendemen, dan antiglikasi terbesar (berturut-turut 2,34 μm , 12,59%, 61,06%) dan memiliki spektrum inframerah yang paling sesuai dengan kolagen standar. Kolagen ini kemudian diaduk dengan kecepatan 1000 rpm selama 6 dan 8 jam untuk pengecilan ukuran. Kolagen dengan pengadukan 6 jam mempunyai ukuran partikel lebih kecil (1,34 μm) dibandingkan dengan pengadukan 8 jam (1,80 μm). Kolagen dengan ukuran 1,34 μm menunjukkan aktivitas terbaik yaitu aktivitas antioksidan terhadap 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) sebesar 24,70% dan inhibitor tirosinase sebesar 26,77%. Berdasarkan aktivitas antioksidan, antiglikasi, dan antitirosinase, kolagen dengan perendaman NaOH 0,10 M dan pengadukan selama 6 jam memiliki sifat anti aging yang paling baik.

Kata kunci: antiglikasi, antioksidan, inhibitor tirosinase, kolagen, ukuran partikel.

ABSTRACT

In Vitro Anti-Aging Activity of Chicken (*Gallus gallus domesticus*) Bone Waste Collagen. Chicken bone waste increases with increasing chicken consumption. However, study on utilizing chicken bone for collagen source has not been widely explored. This study aims to determine the effect of collagen size on their anti aging activity, and to obtain the optimum condition to produce the chicken (*Gallus gallus domesticus*) collagen in the high yield and the best activity. Collagen isolation was carried out in various NaOH concentrations of 0.05 M, 0.10 M, and 0.20 M, followed by the maceration on acetic acid 1 M. The isolation in NaOH 0.10 M produced the collagen with particle size of 2.34 μm in yield of 12.59% and anti-glycation of 61.06%. The revealed infrared spectrum of the isolated collagen is almost the same with the spectrum of the standart collagen. The collagen in 2.34 μm was further stirred at a 1000 rpm for 6 and 8 hours to reduce the size. Collagen stirred in 6 hours has a smaller particle size (1.34 μm) compared with that of stirred in 8 hours which has a particle size of 1.80 μm . The collagen with size of 1.34 μm showed the best activity, which revealed the antioxidant activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) of 24.70% and

tyrosinase inhibitors of 26.77%. Based on antioxidant activity, anti-glycation, and anti-tyrosinase, the collagen which was isolated in 0.10 M NaOH and was stirred in 6 hours has the best anti-aging property.

Keywords: anti-glycation, antioxidant, collagen, particle size, tyrosinase inhibitor

PENDAHULUAN

Penuaan merupakan proses yang pasti terjadi, namun penuaan dini merupakan hal yang tidak diharapkan. Penuaan pada kulit manusia ditandai dengan penipisan kulit, kulit kering, keriput, dan warna yang tidak merata (Farage *et al.*, 2016). Hal ini disebabkan oleh reaksi enzimatik seperti enzim tirosinase, yaitu enzim yang terlibat dalam reaksi pembentukan melanin, maupun non enzimatik yang terjadi di dalam tubuh melibatkan reaksi glikasi dan reaksi oksidasi. Glikasi merupakan reaksi antara gula pereduksi dengan gugus amina pada protein, lemak, dan asam nukleat melalui serangkaian reaksi membentuk basa Schiff dan produk Amadori menghasilkan AGEs (*advanced glycation end-products*). Reaksi tersebut dikenal dengan reaksi Maillard (Nagai *et al.*, 2001). Antioksidan dapat mengurangi pembentukan salah satu produk AGE dari jalur oksidatif. Selain itu, secara alamiah sedikitnya 1 % kolagen di dalam tubuh manusia hilang setiap tahunnya dan pada usia 40 tahun manusia tidak memproduksi kolagen lagi sehingga kolagen yang hilang mencapai 35-40 %. Oleh karena itu diperlukan kolagen dari luar tubuh yang memiliki aktivitas *anti aging* untuk mencegah penuaan berlangsung lebih cepat.

Ayam merupakan salah satu jenis unggas yang mengandung bahan bermanfaat, seperti kolagen yang banyak terdapat pada kulit dan tulang rawan. Kolagen merupakan salah satu jenis protein struktural yang tersusun dari beberapa asam amino. Kolagen selain dapat diaplikasikan pada produk kesehatan, juga banyak digunakan untuk kosmetika, di antaranya untuk meningkatkan kelembaban kulit dan mencegah penuaan dini (Silva *et al.*, 2014). Di Indonesia, kebutuhan kolagen umumnya masih diperoleh dari impor, sehingga diperlukan usaha untuk dapat memproduksi sendiri kolagen.

Penelitian ini memanfaatkan limbah tulang ayam sebagai bahan penghasil kolagen yang dapat menghambat terjadinya tanda penuaan di kulit. Material berukuran lebih kecil lebih mudah memasuki bagian dalam kulit dibandingkan dengan material berukuran besar (Hoet *et al.*, 2004). Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh ukuran kolagen terhadap aktivitas *anti aging* berupa uji aktivitas antioksidan, antiglikasi, dan inhibitor tirosinase secara *in vitro* dan mendapatkan teknik isolasi kolagen *anti aging* optimum dari tulang ayam.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan alat-alat kaca, *freeze-dryer*, spektrofotometer, neraca analitik, dan cawan aluminium, alat yang digunakan untuk mengukur ukuran partikel (*Particle Size Analyzer/PSA*, Delsa Nano C, Beckman Coulter), alat untuk mengidentifikasi gugus fungsi (*Fourier Transform Infrared/FTIR*, Tensor 37, Bruker), alat untuk menentukan absorbansi pada uji aktivitas antioksidan (*Enzyme-linked immunosorbent assay/ELISA Reader*), dan alat untuk menentukan intensitas fluoresensi pada uji aktivitas antiglikasi (Fluorometer, FLUOstar Omega fluorometer (BMG Labtech, USA)). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tulang ayam yang didapatkan dari Pasar Dramaga, NaOH, CH₃COOH, akuades, etanol, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), fruktosa, sukrosa, BSA (*Bovine Serum Albumin*), L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), L-Tirosin, dan buffer pH 7,4. Semua bahan yang digunakan berasal dari Sigma Aldrich.

Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan cara membersihkan tulang ayam (*Gallus gallus domesticus*), kemudian tulang ayam tersebut direbus hingga mendidih. Setelah mendidih, tulang ayam didinginkan dan dipisahkan dari daging yang masih menempel. Tulang yang sudah bersih selanjutnya dihancurkan agar memudahkan dalam proses pengeringan. Tulang dikeringkan menggunakan *Cabinet Dryer* selama 6 jam pada suhu 40 °C hingga didapatkan sampel kering melalui penentuan kadar air. Sampel kering selanjutnya diserbukkan hingga didapatkan serbuk ukuran 60-100 mesh.

Penentuan Kadar Air, Kadar Protein, dan Kadar Lemak

Penentuan kadar air sampel mengacu pada AOAC (2012) menggunakan metode pemanasan langsung. Penentuan kadar protein menggunakan metode Kjeldahl dan kadar lemak menggunakan metode Soxhlet yang dilakukan mengacu pada SNI 01-2891-1992.

Isolasi Kolagen

Isolasi kolagen dari tulang ayam dalam penelitian ini diawali dengan perendaman sampel kering tulang dengan menggunakan 3 variasi konsentrasi NaOH, yaitu 0,05 M; 0,10 M; dan 0,20 M dengan rasio 1:10 (b/v) selama 48 jam. Tulang kemudian direndam dalam larutan CH₃COOH 1 M dengan rasio 1:10 (b/v) selama 24 jam. Filtrat yang diperoleh selanjutnya disaring menggunakan kertas saring Whatman No.1. Kolagen yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan *freeze-dryer*.

Pengecilan Ukuran Kolagen

Kolagen yang diperoleh dari perlakuan perendaman larutan NaOH terbaik dilarutkan dalam akuades dengan rasio 1:2 (v/v) dan dilakukan pengubahan ukuran dengan bantuan pengaduk magnet pada kecepatan 1000 rpm dengan variasi waktu 6 dan 8 jam. Hasilnya kemudian diuji ukuran partikelnya menggunakan PSA kemudian diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), antiglikasi, dan inhibitor tirosinase.

Penentuan Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH mengacu pada Batubara *et al.* (2009). Sampel dengan konsentrasi tertentu selanjutnya diambil 100 μL , dimasukkan ke dalam *microplate 96 well* dan ditambahkan dengan DPPH 0,3 mM sebanyak 100 μL , kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap. Absorbansi sampel diukur dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan dihitung dengan persamaan 1 sebagai berikut:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan : A_0 = Absorbansi dari blanko

A_1 = Absorbansi dari standar atau sampel

Penentuan Aktivitas Antiglikasi

Metode antiglikasi mengacu pada Povichit (2010) dengan menyiapkan larutan uji seperti pada Tabel 1. Seluruh larutan uji tersebut diinkubasi pada suhu 60 °C selama 40 jam. Setelah inkubasi, larutan kemudian dipipet sebanyak 100 μL ke dalam *96-well plate*. Jumlah relatif BSA yang terglikasi diukur menggunakan fluorometer pada panjang gelombang eksitasi 370 nm dan emisi 440 nm.

Tabel 1. Komposisi larutan pada uji aktivitas antiglikasi.

Bahan yang digunakan	Larutan A (Kontrol glikasi) (μL)	Larutan B (pengoreksi kontrol) (μL)	Larutan C (sampel) (μL)	Larutan D (pengoreksi sampel) (μL)
Buffer fosfat 200 mM pH 7.4 (KH_2PO_4 0.2 M + K_2HPO_4 0.2 M dalam akuades)	200	200	200	200
BSA 20 mg/ml	80	80	80	80
Glukosa 235 mM	40	-	40	-
Fruktosa 235 mM	40	-	40	-
Ekstrak/aminoguanidin	-	-	80	80

Penentuan Aktivitas Penghambatan Tirosinase

Penentuan aktivitas penghambatan enzim tirosinase mengacu pada (Batubara *et al.* 2015). Pada pengujian aktivitas penghambatan enzim tirosinase ini digunakan L-tirosina dan L-DOPA sebagai substrat dan asam kojat sebagai kontrol positif. Sampel dilarutkan dengan DMSO sebagai larutan stok. Variasi konsentrasi dibuat dengan melarutkan kolagen menggunakan buffer fosfat pH 6,5. Sebanyak 70 μ L larutan dimasukkan ke dalam pelat 96 sumur, kemudian ditambahkan 30 μ L enzim tirosinase (Sigma, 333 Unit mL⁻¹ dalam larutan buffer fosfat), dan campuran diinkubasi selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan sebanyak 110 μ L substrat (L-tirosin 2 mM) kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Absorbans diukur pada panjang gelombang 492 nm menggunakan Spektrofotometer *Microplate Reader*.

Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini ditabulasi, kemudian dilakukan uji menggunakan metode analisis deskriptif dengan penilaian secara kualitatif maupun kuantitatif. Metode analisis deskriptif yang digunakan melalui penentuan gugus fungsi (FTIR) untuk menentukan kolagen terbaik dari pengaruh perendaman tiga variasi konsentrasi NaOH. Pemilihan hasil terbaik didasarkan pada aktivitas antioksidan, antiglikasi, dan antitirosinase. Data yang diperoleh dari tiga kali ulangan dilakukan analisis menggunakan ANOVA pada selang kepercayaan 95% dan dilanjutkan uji lanjut Duncan jika diperlukan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan Proksimat Tulang Ayam

Analisis proksimat dilakukan terhadap serbuk tulang ayam, berupa analisis kadar air, kadar lemak, dan kadar protein (Tabel 2).

Tabel 2. Kandungan proksimat sampel tulang ayam.

Kandungan	Air	Lemak	Protein
Kadar (%)	6,93	15,23	51,73

Penentuan kadar air suatu bahan perlu dilakukan untuk menghitung rendemen dalam satuan basis basah dan kering. Penentuan kadar air juga dapat digunakan untuk menentukan umur simpan sampel. Menurut Keputusan Menkes RI No. 661/MENKES/SK/VII/1994, nilai kadar air yang baik ialah kurang dari 10%. Hal ini

menunjukkan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian sudah sesuai dengan standar yang berlaku.

Sampel yang digunakan memiliki kadar protein lebih dari 50%. Kadar protein pada sampel tulang tersebut menentukan jumlah kolagen yang terkandung dan memiliki potensi yang baik untuk dijadikan sebagai sumber kolagen. Kadar lemak pada sampel menunjukkan kandungan lemak yang relatif tinggi (15,27%) dibandingkan dengan kadar lemak pada penelitian Putra *et al.* (2011) sebesar 1,68%, sehingga perlu dilakukan pra-perlakuan untuk mendapatkan kolagen yang bebas dari lemak. Kadar lemak yang tinggi pada bahan akan mempengaruhi efektivitas kolagen dalam aplikasinya pada berbagai produk (Shon *et al.*, 2011). Pra perlakuan untuk mengurangi kadar lemak dan bahan lainnya dilakukan dengan cara merendam serbuk tulang ayam menggunakan NaOH. Perendaman ini menyebabkan reaksi penyabunan (saponifikasi) antara Na pada NaOH dengan lemak dari sampel sehingga lemak dapat berkurang (Yuhendri, 2017).

Perolehan Kolagen

Perolehan kolagen dari hasil perendaman menggunakan berbagai konsentrasi NaOH dan CH₃COOH disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rendemen kolagen hasil isolasi dengan variasi NaOH dengan CH₃COOH 1 M

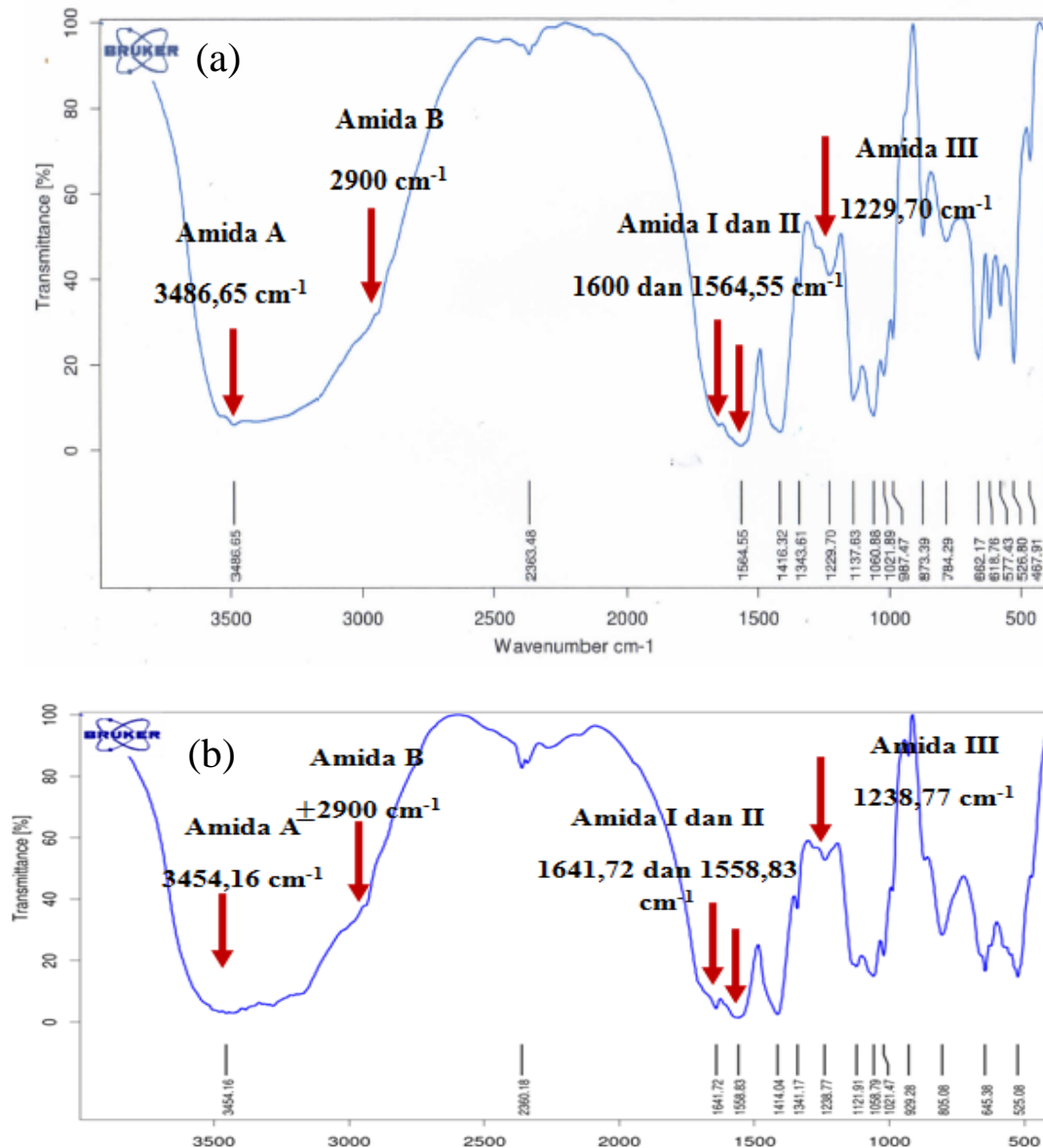
Konsentrasi NaOH (M)	Rendemen Kolagen (%)
0,05	10,42
0,10	12,59
0,20	10,94

Pembuatan kolagen diawali dengan pra-perlakuan untuk menghilangkan protein nonkolagen pada sampel sehingga hanya protein kolagen yang larut dalam ekstraksi selanjutnya. Protein jaringan ikat merupakan protein yang lebih sulit diekstraksi apabila dibandingkan dengan protein lain. Oleh karena itu pada saat pra-perlakuan diperlukan larutan NaOH untuk memisahkan protein-protein nonkolagen. Kolagen biasanya tidak dapat larut dalam larutan alkali. Penggunaan NaOH biasa digunakan dalam proses pra-perlakuan ekstraksi kolagen karena mampu meminimalkan kehilangan kolagen secara signifikan apabila dibandingkan dengan larutan alkali lain (Liu *et al.*, 2015).

Perlakuan dengan NaOH 0,10 M memberikan rendemen kolagen paling tinggi. Rendemen menunjukkan keefektifan proses ekstraksi. Perbedaan nilai rendemen pada kolagen yang dihasilkan dapat disebabkan oleh perbedaan metode ekstraksi yang

digunakan, konsentrasi larutan yang digunakan untuk menghilangkan protein non kolagen, dan jenis bahan yang digunakan (Potaros *et al.*, 2009).

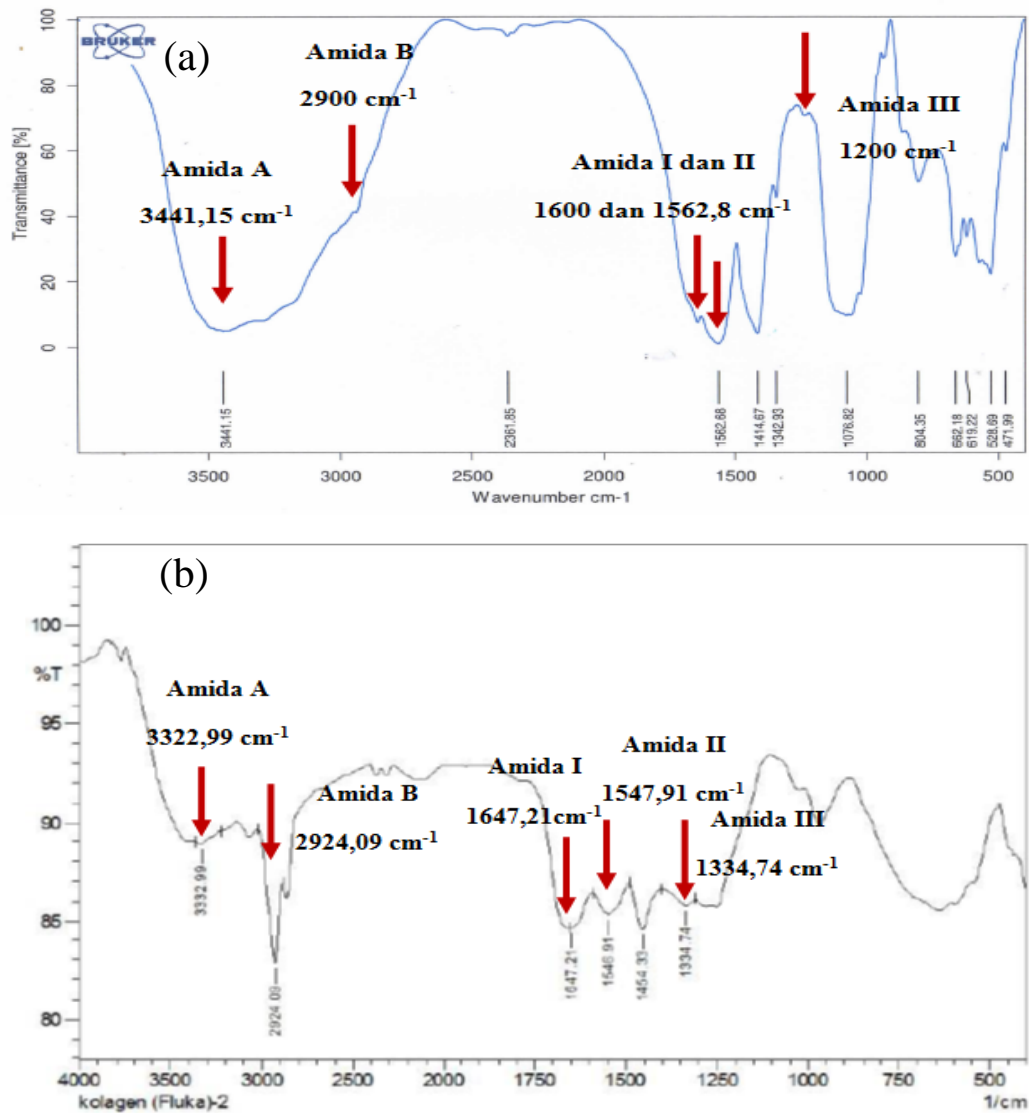
Perendaman menggunakan CH_3COOH mengakibatkan terputusnya ikatan hidrogen intramolekul yang merupakan penstabil struktur *triple helix* kolagen (Ahmad and Benjakul, 2010). Sampel yang digunakan dicuci dengan air untuk menetralkan pH. Larutan kolagen yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan *freeze-dryer* sehingga didapatkan kolagen kering (Tabel 2).



Gambar 1. Spektrum FTIR kolagen dengan perendaman NaOH (a) 0,05 and (b) 0,1 M

Kolagen yang dihasilkan kemudian dianalisis gugus fungsinya menggunakan FTIR, untuk memastikan kemurnian kolagen. Prinsip dari FTIR yaitu pengukuran panjang gelombang dan intensitas penyerapan radiasi inframerah oleh sampel. Penyerapan radiasi

inframerah menimbulkan getaran yang dapat mengindikasikan kelompok peptida dan rantai sampingnya, sehingga memberikan informasi mengenai struktur protein (Kong *and* Yu, 2007). Kolagen tergolong dalam protein yang memiliki ikatan peptida. Keberadaan gugus amida merupakan gugus fungsi yang paling mudah dideteksi dalam FTIR (Sjahfirdi *et al.*, 2012). Terdapat 9 jenis amida yang dapat dideteksi pada protein yaitu Amida A, B, dan Amida I-VII. Tiap jenis amida ini memberikan sinyal pada bilangan gelombang spesifik karena keberadaan gugus tertentu.



Gambar 2. Spektrum FTIR (a) kolagen dengan perendaman NaOH 0,20 M dan (b) kolagen standar (Yuhendri, 2017).

Berdasarkan spektrum FTIR kolagen dari tulang ayam menunjukkan puncak-puncak serapan pada wilayah serapan amida yang meliputi amida A, amida B, amida I, amida II, dan amida III yang merupakan gugus fungsi khas kolagen (Tabel 4 dan Gambar 1-2). Daerah amida A menunjukkan keberadaan gugus NH yang dekat keberadaan

ikatan hidrogen sehingga muncul pada bilangan gelombang 3300 – 3500 cm^{-1} . Amida B menunjukkan keberadaan gugus CH, sementara daerah amina I menunjukkan adanya gugus C=C yang merupakan struktur sekunder protein, daerah amina II menunjukkan ikatan NH dan amida III menunjukkan adanya ikatan NH pada struktur heliks kolagen (Muyonga *et al.*, 2004). Spektrum FTIR pada penggunaan konsentrasi NaOH 0,10 M menunjukkan gugus fungsi khas dari semua serapan amida yang paling terlihat pada wilayah serapan masing-masing amida, hanya pada amida B yang tidak jelas bilangan gelombangnya, namun masih menunjukkan puncak di wilayah serapannya.

Tabel 4. Karakteristik gugus fungsi kolagen hasil analisis FTIR Kolagen NaOH.

Amida	Bilangan gelombang (cm^{-1}) kolagen NaOH			Wilayah serapan (cm^{-1})*	Keterangan*
	0,05 M	0,10 M	0,20 M		
A	3486	3454	3441	3300-3500	Vibrasi <i>stretching</i> NH
B	Tidak Jelas	Tidak Jelas	Tidak Jelas	2915-2935	Asimetrikal <i>stretching</i> CH ₂
I	Tidak Jelas	1641	Tidak Jelas	1600-1690	Vibrasi <i>stretching</i> C=O
II	1564	1558	1562	1480-1575	CH <i>stretching</i> , NH <i>bending</i>
III	1229	1238	Tidak Jelas	1229-1301	CH <i>stretching</i> , NH <i>bending</i>

*Sumber: Kong *and* Yu (2007)

Ukuran Partikel Kolagen

Kolagen yang diperoleh ditentukan ukuran partikelnya menggunakan PSA. Ukuran partikel yang diperoleh berkisar 1102 hingga 2344 nm yang menunjukkan ukurannya belum nano (Tabel 5). Menurut Mohanraj *and* Chen (2006), ukuran partikel nano yaitu 10-1000 nm. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi lebih lanjut terhadap waktu dan kecepatan pengadukan untuk menghasilkan ukuran kolagen yang nano partikel. Kolagen yang dihasilkan menggunakan NaOH 0,10 M merupakan kolagen yang lebih baik berdasarkan data FTIR dan memiliki ukuran partikel paling besar berdasarkan hasil analisis PSA. Untuk meningkatkan kemampuannya diserap oleh kulit perlu diperkecil ukuran partikelnya melalui proses pengadukan.

Tabel 5. Ukuran Partikel serta Aktivitas Antioksidan dan Antiglikasi Kolagen.

Perlakuan Kolagen	Ukuran Partikel (nm)	Penghambatan DPPH (%)	Penghambatan glikasi (%)
NaOH 0,05 M	1102	10,42 ^b	47,85 ^a
NaOH 0,10 M	2344	7,36 ^a	61,06 ^b
NaOH 0,20 M	1871	13,72 ^b	60,47 ^b
NaOH 0,10 M 6 jam	1342	24,70 ^c	(-)
NaOH 0,10 M 8 jam	1798	10,05 ^b	(-)

Keterangan :

Penghambatan DPPH pada 1000 ppm dan glikasi pada 2000 ppm, (-) Tidak dapat ditentukan karena aktivitas terlalu tinggi, IC₅₀ asam askorbat sebagai kontrol positif = 4,61 ppm, IC₅₀ aminoguanidin = 80 ppm. Huruf dibelakang angka yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada $\alpha = 0,05$

Ukuran partikel kolagen setelah diaduk menjadi lebih kecil dua kali lipat terutama saat diaduk 6 jam sementara yang diaduk 8 jam ukurannya kembali menjadi besar akibat proses koagulasi. Oleh karena itu, pengadukan selama 6 jam cukup untuk memperkecil ukuran kolagen, namun belum mencapai ukuran nano. Menurut Mohanraj *and* Chen (2006), karena ukuran nano menurutnya adalah saat ukuran partikelnya 10-1000 nm. Untuk memperkecil ukuran partikel sebaiknya tidak melalui proses mekanik seperti pengadukan, namun dapat dilakukan melalui proses hidrolisis.

Aktivitas Antioksidan, Antiglikasi, dan Inhibitor Tirosinase

Perlakuan kolagen NaOH 0,10 M dibandingkan perlakuan konsentrasi NaOH lainnya menghasilkan ukuran paling besar, namun aktivitas antiglikasinya paling tinggi dan aktivitas antioksidannya paling rendah. Pengecilan ukuran kolagen yang dilakukan dengan pengadukan 1000 rpm dengan 6 dan 8 jam menghasilkan kolagen dengan ukuran yang lebih kecil dan aktivitas antioksidannya semakin tinggi. Persen penghambatan DPPH kolagen yang dihasilkan mirip dengan kolagen komersial yaitu IC₅₀-nya lebih besar dari 1000 ppm (Shita, 2018). Aktivitas antiglikasi pada kolagen NaOH 0,10 M dengan pengadukan 6 dan 8 jam tidak dapat ditentukan karena aktivitas yang terlalu tinggi, sehingga perlu dilakukan pengujian pada konsentrasi yang lebih tinggi, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi lagi reaksi protein dan glukosa akan lebih banyak sehingga makin sulit untuk dideteksi menggunakan fluorimetri. Aktivitas antiglikasi yang dihasilkan lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kolagen yang didapatkan pada penelitian Shita (2018) yaitu sebesar 17,74% pada konsentrasi 3000 ppm

Kolagen yang didapatkan diharapkan akan digunakan untuk produk kosmetik yang digunakan untuk kulit. Penghambatan aktivitas tirosinase dapat mengurangi produksi melanin berlebih yang menyebabkan warna hitam pada kulit. Aktivitas penghambatan tirosinase pada konsentrasi 1000 ppm disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Aktivitas Antitirosinase Kolagen pada 1000 ppm.

Kolagen	Penghambatan tirosinase dengan substrat (%)	
	L-tirosina	L-DOPA
NaOH 0,10 M 6 jam	9,17 ^a	26,77 ^b
NaOH 0,10 M 8 jam	7,95 ^a	2,72 ^a

Keterangan: IC₅₀ asam kojat: 8,90 ppm, Huruf dibelakang angka yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada $\alpha=0,05$

Aktivitas penghambatan enzim tirosinase menggunakan substrat L-tirosina dan L-DOPA menunjukkan bahwa pengadukan selama 6 jam aktivitas penghambatan enzim tirosinase yang lebih besar daripada pengadukan 8 jam. Hal ini menunjukkan aplikasi pembuatan kolagen untuk kosmetika *anti aging* cukup dengan perendaman pada NaOH 0,10 M, perendaman dengan asam asetat 1M, dan pengadukan pada 1000 rpm selama 6 jam. Pada penelitian Shita (2018), kolagen komersial tidak menunjukkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase saat pengujian pada 1000 ppm dan aktivitas penghambatan enzim tirosinase hidrolisat kolagen komersial pada penelitiannya tidak lebih baik dibandingkan dengan aktivitas dari kolagen yang diperoleh pada penelitian ini.

KESIMPULAN

Kolagen telah diisolasi dari limbah tulang ayam dengan kondisi optimum, yaitu perendaman tulang ayam pada konsentrasi NaOH 0,10 M, dilanjutkan perendaman dengan asam asetat 1 M, dan diteruskan dengan pengadukan menggunakan stirrer kecepatan 1000 rpm selama 6 jam. Kondisi optimum ini memberikan rendemen paling tinggi dan aktivitas *anti aging* terbaik berdasarkan aktivitas antioksidan, antiglikasi, dan antitirosinase. Ukuran partikel kolagen pada konsentrasi NaOH 0,10 M yang semakin kecil menyebabkan aktivitasnya semakin tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi, Kemenristek Dikti yang telah menghibahkan dana untuk pelaksanaan program PKM-PE

ini. Selain itu, tim juga mengucapkan terima kasih kepada PKM Center, Direktorat Kemahasiswaan IPB, dan seluruh pihak yang terlibat dalam kelancaran penelitian ini.

REFERENSI

- [AOAC] The Association of Official Analytical Chemist. 2012. *Official Methods of Analysis*. Ed ke-19. Washington DC (US): Association of Official Analytical Chemist.
- [MENKES] Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. No.: 661/MENKES/SK/VII/1994. Persyaratan obat tradisional.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 1992. SNI 01-2891-1992. *Cara uji makanan dan minuman*. Jakarta (ID): Dewan Standar Nasional.
- Ahmad, M. and Benjakul, S. 2010. Extraction and characterization of pepsin solubillised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monocerous*). *Food Chemistry* 120, 817-824
- Batubara, I., Mitsunaga, T. and Ohashi. H. 2009. Screening antiacne potency of Indonesian medicinal plants: antibacterial, lipase inhibition, and antioxidant activities. *Journal of Wood Science* 55, 230-235.
- Batubara, I., Julita, I., Darusman, L.K., Muddathir, A.M. and Mitsunaga, T. 2015. Flower bracts of temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) for skin care: anti-acne and whitening agents. *Procedia Chemistry*. 14, 216-224.
- Farage, M.A., Miller, K.W., and Maibach, H.I. 2016. Degenerative Change in Skin. *Textbook in Aging Skin* 15-30
- Hoet, P.H.M., Bruske, H.I., and Salata, O.V. 2004. Nanoparticles known and unknown health risks. *Journal Nanotechnology* 2(12), 1-5.
- Kong, J., and Yu, S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sinica* 39(8), 549-559.
- Liu, D., Wei, G., Li, T., Hua, J., Lu, J., Regenstein, J.M., and Zhou, P. 2015. Effects of alkaline *pretreatment* and acid extraction onditions on the acid sluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry* 172, 836-843.
- Mohanraj, V.J., and Chen, Y. 2006. Nanoparticles—A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5(1): 561-573.
- Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., and Duodu, K.G. 2004. Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult nile perch (*Latex niloticus*). *Food Chemistry* 86, 325-332
- Nagai, R., Jinno, M., Ichihashi, M., Koyama, H., Yamamoto, Y., and Yonei Y. 2012. Advanced Glycation End Products and Their Receptors as Risk Factors for Aging. *Anti-Aging Medicine* 9(4), 108-113
- Potaros, T., Raksakulthai, N., Runglerdkreangkrai, J., and Worawattanamateekul, W. 2009. Characteristics of collagen from nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods. *Kasetsart Journal* 43, 584-593.

- Povichit, N., Phrutivorapongkul, A., Suttaji, M., Chaiyasut, C., and Leelapornpisid, P. 2010. Antiglycation and antioxidant activities of oxyresveratol extracted from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. *Maejo International Journal of Science and Technology* 23(4), 454-461.
- Putra, A. B., Sahubawa, L., and Ekantari, N. 2011. Ekstraksi dan karakterisasi kolagen dari kulit ikan nila hitam (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal pascapanen dan bioteknologi kelautan dan perikanan* 8(2), 171-180.
- Shita, F. 2018. *Hidrolisat kolagen kulit ikan tuna sirip kuning (thunnus albacares) sebagai anti penuaan*. Disertasi. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Silva, T.H., Moreira-Silva, Marques, A.L.P., Domingues, A., Brayo, I., and Reis, L. 2014. Marine origin collagens and its potential applications. *Marine Drugs* 12(12), 5881-5901.
- Sjahfirdi, L., Mayangsari, and Nasikin, M. 2012. Protein identification using Fourier Transform Infrared (FTIR). *International Journal of Recent Research and Applied Studies* 10(3), 418-421
- Shon, J., Ju-Hyun, E., Hwang, S.J., and Jong-Bang, E. 2011. Effect of Processing condition on functional properties of collagen powder from Skate (*Raja kenoi*) skins. *The Journal of Food Science Biotechnology* 20(1), 99-106
- Yuhendri, V. M. 2017. *Karakterisasi dan Aktivitas Penghambat Tirosinase oleh Kolagen dari Teripang*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor: Bogor