

## FORMULASI DAN BIOAKTIVITAS SUPLEMEN TABLET BERBASIS *Spirulina* DAN HIDROLISAT KOLAGEN KULIT IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

Mirza Gulam Ahmad\*, Iriani Setyaningsih, Wini Trilaksani

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor,  
Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat Indonesia

Telepon (0251) 8622909-8622906, Faks. (0251) 8622915

\*Korespondensi: mirzaahmad0209@gmail.com

Diterima: 27 Agustus 2019/Disetujui: 06 Desember 2019

**Cara sitasi:** Ahmad MG, Setyaningsih I, Trilaksani W. 2019. Formulasi dan bioaktivitas suplemen tablet berbasis *Spirulina* dan hidrolisat kolagen kulit ikan nila. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 22(3): 453-463.

### Abstrak

*Spirulina* adalah salah satu mikroalga yang dikenal sebagai *super food*, tinggi kandungan protein dan digunakan dalam industri kosmetik, makanan, dan suplemen. Hidrolisat kolagen merupakan hasil hidrolisis kolagen dengan penambahan enzim protease. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas antioksidan dan penghambat tirosinase dari *Spirulina*, hidrolisat kolagen, dan tablet yang diformulasikan dengan kombinasi *Spirulina* dan kolagen hidrolisat. Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap, yaitu : 1) ekstraksi dan hidrolisis kolagen kulit ikan nila, 2) kultivasi dan pemanenan *Spirulina*, 3) formulasi tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen dilanjutkan pengujian aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase pada tablet yang terpilih berdasarkan karakteristik fisik. Formulasi tablet yang digunakan meliputi tiga formula dengan perbandingan *Spirulina* dan hidrolisat kolagen yang berbeda yaitu formula A (25%: 53,75%), formula B (28,125%: 50,625%), formula C (31,25%: 47,5%) dan bahan tambahan seperti vitamin C (12,5%), talk (1,25%), magnesium stearat (0,625%), aerosil (1,875%), serta avicel (5%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa formula A merupakan formula terpilih yang memenuhi persyaratan DEPKES RI berdasarkan karakteristik fisik tablet. Aktivitas antioksidan tablet A adalah 843 ppm dan penghambatan tirosinase adalah 163,56 ppm.

Kata kunci: aktivitas antioksidan, tablet, penghambatan tirosinase.

### ***Bioactivity and Tablet Formulation from Spirulina and Collagen Hydrolysate of Tilapia (Oreochromis niloticus) Skin***

#### Abstract

*Spirulina* is a microalga known as a superfood which contains high protein and is used in cosmetics, foods, and supplements industry. Collagen hydrolysate is the result of hydrolysis of collagen by protease. This study was aimed to determine the antioxidant activity and inhibition of tyrosinase from *Spirulina*, collagen hydrolysate and tablet formulated by combination of *Spirulina* and collagen hydrolysate. This research was conducted in three stages. The first stage was the extraction and hydrolysis of tilapia skin collagen, while the second stage was culturing and harvesting of *Spirulina*, and the third stage was determination of tablet formulation based on *Spirulina* and collagen hydrolysate followed by analysis of the antioxidant activity and inhibition of tyrosinase by selected tablet. Three formula with different ratio between *Spirulina* and collagen hydrolysates namely formula A (25%:53.75%), formula B (28.125%:50.625%), formula C (31.25%:47.5%) and additive such as vitamin C (12.5%), talk (1.25%), magnesium stearate (0.625%), aerosil (1.875%), avicel (5%) were developed. The result showed that formula A was the selected formula meeting the requirements of Ministry of Health based on the physical characteristics. The antioxidant activity of tablet A was 843 ppm and the tyrosinase inhibition was 163.56 ppm.

Keywords: antioxidants activity, tablets, tyrosinase inhibition.

## PENDAHULUAN

*Spirulina* merupakan *cyanobacteria* yang dijuluki sebagai *super food* berbentuk spiral, memiliki pigmen hijau-biru sehingga dapat melakukan fotosintesis untuk membuat makanannya sendiri. Kandungan protein *Spirulina* sekitar 55–62%, lemak 4-6%, karbohidrat 17-25% dan memiliki aktivitas antioksidan yang berperan dalam menangkal radikal bebas (Christwardana *et al.* 2013). Beberapa pigmen yang terdapat pada *Spirulina* diantaranya fikosianin, klorofil A, dan klorofil B. Fikosianin pada *Spirulina* dapat berperan sebagai antioksidan, antiinflamasi, mampu menekan pertumbuhan sel kanker pada manusia serta antipenuaan (Yong *et al.* 2013). Soni *et al.* (2015) menyatakan *C-phycoerythrin* pada *Spirulina* dapat berperan menghambat biosintesis melanin dengan cara menghambat kerja enzim tirosinase. Hasil penelitian Fahleny *et al.* (2014) menyatakan tablet hisap *Spirulina* memiliki aktivitas antioksidan dengan IC<sub>50</sub> sebesar 288.68 ppm. Hasil penelitian Adiba *et al.* (2011) kombinasi kurma dan *Spirulina* sebagai tablet memiliki beberapa keunggulan di antaranya dapat dikonsumsi oleh semua kalangan konsumen, dapat diberikan pada pasien yang sulit mengunyah atau menelan makanan, berperan sebagai *carrier* obat alami dan lebih ekonomis.

Hidrolisat kolagen dihasilkan dari hidrolisis kolagen dengan bantuan enzim protease misalnya papain, bromelin dan kolagenase dalam kondisi yang terkontrol, memiliki bioaktivitas sebagai antioksidan, antimikroba, dan antihipertensi (Fan *et al.* 2013). Karakteristik hidrolisat kolagen adalah viskositas yang rendah, larut dalam air, tidak berwarna, alergenitas rendah, memiliki kemampuan memperbaiki kulit yang baik sehingga merupakan bahan yang populer sebagai suplemen *antiaging* (Iitchenco *et al.* 2017). Hidrolisat kolagen memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas tirosinase 15,44% (Hong *et al.* 2019). Bahan yang dapat menghambat aktivitas tirosinase, kolagenase dan elastase merupakan salah satu bahan penyusun kosmetik untuk pemutih kulit, antipenuaan dan antikeriput.

Penggunaan hidrolisat kolagen secara oral dapat meningkatkan *echogenicity dermis* dan elastisitas kulit dan mengurangi jumlah kerutan pada kulit (Campos *et al.* 2015).

Suplemen merupakan suatu bahan yang ditambahkan untuk memenuhi gizi di dalam tubuh, baik dalam bentuk cair, serbuk, maupun padat/tablet. Tablet merupakan bentuk sediaan yang mengandung bahan aktif dengan atau tanpa eksipien. Bentuk sediaan tablet ini paling banyak digunakan, praktis, mudah dibawa, mudah ditemukan, dan diproduksi. Kombinasi tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen dari kulit ikan nila sebagai suplemen saat ini belum banyak diinformasikan. Formulasi tablet dari hidrolisat kolagen dan *Spirulina* diharapkan mampu berperan sebagai suplemen yang memiliki aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas antioksidan dan penghambat tirosinase dari *Spirulina*, hidrolisat kolagen, dan tablet yang diformulasikan dengan kombinasi *Spirulina* dan kolagen hidrolisat.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Spirulina* sp. diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara Jawa Tengah, kulit ikan nila diperoleh dari danau Toba Sumatra Utara, Walne teknis, NaOH (Merck), akuades, CH<sub>3</sub>COOH (Merck), 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma), enzim tirosinase (Sigma), metanol (Merck), *sodium dodecyl sulfat-polyacrilamide*. Alat yang digunakan meliputi lampu neon Hannoeh 40 watt, spektrofotometer (SPECTRO UV-VIS), *waterbath* (Stuart 6L), *freeze dryer* (Eyela FDU-1200 Japan), *Fourier Transform Chromatography Spectroscopy* (Bruker Tensor 37 Germany).

### Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap, yaitu : 1) *Pretreatment* dan hidrolisis kolagen kulit ikan nila, 2) kultivasi dan pemanenan *Spirulina*, 3) formulasi tablet *Spirulina* dan

hidrolisat kolagen yang selanjutnya diuji aktivitas antioksidan serta penghambatan tirosinase pada tablet yang terpilih berdasarkan karakteristik fisik.

### Ekstraksi dan hidrolisis kolagen kulit ikan nila (Iitchenco *et al.* 2017)

*Pretreatment* kulit ikan nila menggunakan larutan alkali NaOH 0.1 M dengan rasio sampel:larutan adalah 1:10 (b/v) selama 24 jam dan dilakukan pergantian larutan setiap dua jam sekali. Sampel dicuci hingga mencapai pH netral, sampel tersebut selanjutnya ditambahkan asam asetat 0,1% selama dua jam dengan perbandingan 1:1 (b/v). Sampel setelah dua jam dicuci dengan akuades hingga pH 7,0. Proses ekstraksi kolagen dilakukan dengan metode hidrotermal, yakni dengan merendam sampel pada akuades pada rasio 1:1 (b/v) bersuhu 40°C. Hasil hidroekstraksi kemudian disaring dengan kain tipis sehingga diperoleh filtrat yang disebut kolagen.

Kolagen yang dihasilkan pada tahap sebelumnya dihidrolisis menggunakan enzim papain dengan unit aktivitas (5.000 U/mg) pada suhu 55°C selama dua jam. Hasil hidrolisis berupa hidrolisat kolagen, kemudian diinaktivasi dengan cara dipanaskan sampai suhu 95°C selama tiga menit. Sampel yang diperoleh kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer* suhu -40°C bertekanan 1 atm, sehingga diperoleh serbuk hidrolisat kolagen. Hidrolisat kolagen dianalisis gugus fungsi, aktivitas antioksidan dan inhibisi tirosinase.

### Kultivasi dan pemanenan *Spirulina* (Laing 1991)

Kultivasi *Spirulina* dilakukan dalam akuarium kapasitas 10 L yang berisi air laut 15 ppt, media Walne pada suhu 25°C dengan pencahayaan 24 jam terang dan aerasi secara terus-menerus. Pemanenan *Spirulina* dilakukan pada saat kultur mencapai puncak populasi ditandai dengan OD>0.05 dengan menyaring *Spirulina* menggunakan *nylon mess* kemudian dibilas dengan akuades dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 24 jam. Biomassa yang sudah kering dihaluskan sampai menjadi serbuk halus dan dianalisis komposisi kimia, aktivitas antioksidan dan inhibisi tirosinase.

### Formulasi tablet (Syukroni *et al.* 2017)

Hidrolisat kolagen dari kulit ikan nila dan *Spirulina* hasil kultivasi, selanjutnya diformulasikan menjadi tablet. Formulasi tablet yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Syukroni *et al.* (2017), yaitu menggunakan avicel sebagai bahan pengikat. Formulasi tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen yang digunakan dapat dilihat pada *Table 1*.

Tablet diuji berdasarkan standar pengujian yang dikeluarkan DEPKES RI (1995) yang terdiri atas uji keseragaman bobot, ukuran, kekerasan, kerapuhan, dan waktu hancur. Hasil karakterisasi tablet terpilih kemudian diuji aktivitas antioksidan dan penghambatan enzim tirosinase.

Table 1 Collagen functional groups characteristics

Ingredients	Tablet formulation		
	A (%)	B (%)	C (%)
<i>Spirulina</i>	25	28.125	31.25
Collagen hydrolysate	53.75	50.625	47.5
Vitamin C	12.5	12.5	12.5
Talk	1.25	1.25	1.25
Magnesium stearat	0.625	0.625	0.625
Aerosil	1.875	1.875	1.875
Avicel	5	5	5

Weights per tablet: ±800 mg

### Aktivitas antioksidan (Molyneux 2004)

Uji antioksidan *Spirulina*, hidrolisat kolagen dan tablet *Spirulina* menggunakan DPPH. Pembuatan larutan stok DPPH 125 µM dengan menimbang DPPH sebanyak 2.5 mg yang dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu ukur, selanjutnya larutan ditera sampai volume 50 mL. Sampel dan asam askorbat ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO sebanyak 1 mL selanjutnya disonikasi dan divortex sampai larut.

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan memasukkan sampel sebanyak 100 µL kedalam mikroplate kemudian ditambahkan DPPH sebanyak 100 µL sedangkan untuk kontrol positif ditambahkan dengan etanol p.a 100 µL, selanjutnya diinkubasi dalam suhu ruang dalam kondisi gelap selama 30 menit. Larutan blanko dibuat dengan 100 µL etanol p.a kemudian ditambahkan DPPH sebanyak 100 µL. Sampel, kontrol positif dan blanko diukur menggunakan ELISA dengan panjang gelombang 517 nm. Nilai inhibisi dihitung dengan rumus :

$$\text{Inhibisi \%} = \frac{A_0 - A_1}{A_0}$$

Keterangan A0 : absorbansi blanko

A1 : absorbansi sampel

### Penghambatan enzim tirosinase Curto *et al.* 1999 dimodifikasi oleh Batubara *et al.* 2010

Pengujian aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase dilakukan menggunakan L-DOPA sebagai substrat dan asam konjic sebagai kontrol positif. Masing-masing sampel diambil 40 µL dengan konsentrasi (125, 250, 500, 1.000, dan 2.000 ppm) dan ditambahkan 80 µL buffer fosfat (0,1 M, pH 6,8), 40 µL enzim tyrosinase (1.000 units/mL), dan 40 µL of L-DOPA (2,5 mM), selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 515 nm, dilakukan pula pengukuran terhadap blanko dan kontrol positif asam kojak. Aktivitas penghambatan enzim tirosinase dihitung sebagai IC<sub>50</sub>

### Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang diterapkan dalam pembuatan tablet yakni Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan faktor formulasi tablet yang terdiri dari 3 taraf yaitu formula A, B, dan C dengan 3 kali ulangan. Analisis data dilakukan dengan *Analysis of Variant* (ANOVA) pada selang kepercayaan 95% (α=0,05) untuk mengetahui pengaruh perlakuan, jika terdapat pengaruh terhadap respon selanjutnya diuji Duncan. Analisis data tersebut dilakukan dengan bantuan SPSS versi 22.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Rendemen Hidrolisat Kolagen Kulit Ikan Nila

Rendemen kolagen yang diperoleh adalah 19% (bk) dari bobot kulit ikan nila. Hasil hidrolisis kolagen yang disebut hidrolisat kolagen menggunakan enzim papain memiliki rendemen 4,5% (bk). Rendemen hidrolisat kolagen kulit ikan nila ini lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Wang *et al.* (2013) yakni hidrolisat kolagen dari kulit ikan nila sebesar 15% menggunakan enzim papain. Hartina *et al.* (2019) menyampaikan ekstraksi hidrolisat kolagen dari kulit ikan bandeng menggunakan enzim bromelin dengan waktu 60 menit memiliki rendemen sebesar 16,89% (bk), sedangkan menggunakan enzim alkalase dengan waktu 90 menit memiliki rendemen 16,25% (bk). Perbedaan rendemen yang diperoleh ini disebabkan perbedaan enzim, waktu, dan metode yang digunakan.

### Gugus Fungsi Hidrolisat Kolagen Kulit Ikan Nila

Hasil analisis gugus fungsi terhadap hidrolisat kolagen kulit ikan nila menunjukkan adanya puncak serapan amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III (*Figure 1*). Berdasarkan hasil analisis gugus fungsi, hidrolisat kolagen memiliki spektrum gugus fungsi yang menunjukkan puncak-puncak wilayah serapan yang khas meliputi amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III. Amida A menunjukkan adanya gugus NH dan ikatan hidrogen. Amida B menunjukkan adanya gugus NH.

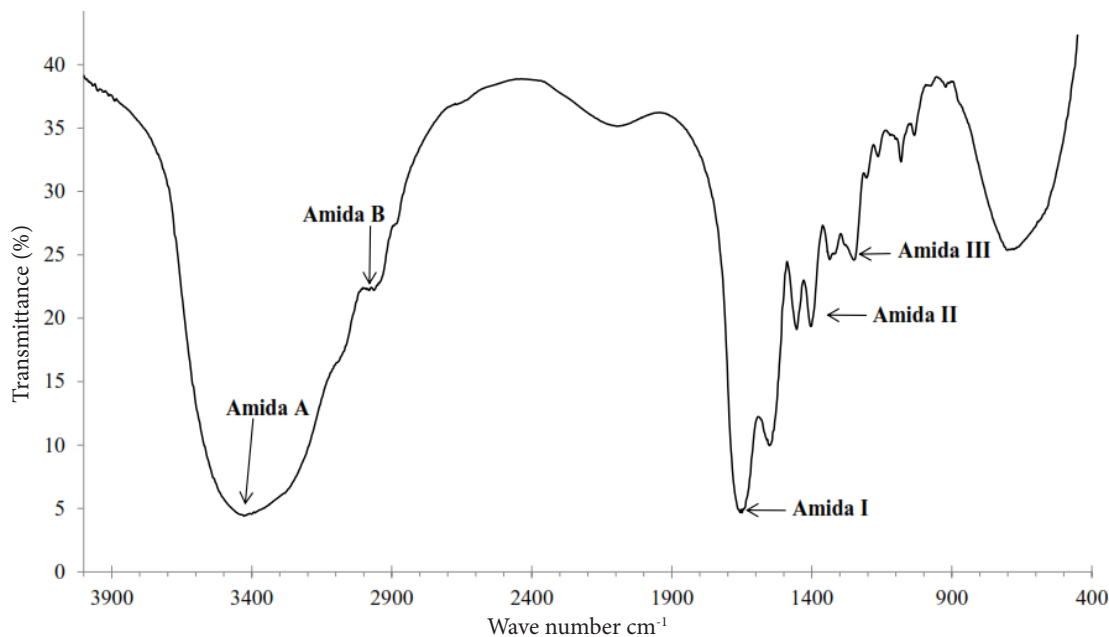


Figure 1 Spectrum of collagen hydrolysate of *Tillapia* skin

Berdasarkan hasil analisis gugus fungsi, hidrolisat kolagen memiliki spektrum gugus fungsi yang menunjukkan puncak-puncak wilayah serapan yang khas meliputi amida A, amida B, amida I, amida II dan amida III. Amida A menunjukkan adanya gugus NH dan ikatan hidrogen. Amida B menunjukkan adanya gugus NH.

Amida I hidrolisat kolagen kulit ikan nila berada pada bilangan gelombang  $1651,64\text{cm}^{-1}$ . Amida I memiliki empat komponen struktur sekunder protein yaitu  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn dan *random coil* (Muyongga *et al.* 2004). Kong dan Yu (2007) menyatakan bahwa setiap komponen sekunder protein memiliki wilayah serapan yang berbeda yaitu  $\alpha$ -helix berada pada wilayah serapan  $1654\text{ cm}^{-1}$  dan  $1658\text{ cm}^{-1}$ ,  $\beta$ -sheet pada  $1624\text{ cm}^{-1}$  dan  $1642\text{ cm}^{-1}$ ,  $\beta$ -turn  $1666\text{cm}^{-1}$ ,  $1672\text{ cm}^{-1}$ ,  $1680\text{cm}^{-1}$ ,  $1688\text{ cm}^{-1}$  dan *random coil*  $1648\pm 2\text{ cm}^{-1}$ . Hasil bilangan gelombang amida I menunjukkan bahwa hidrolisat kolagen kulit ikan nila memiliki struktur sekunder  $\alpha$ -helix. Gomez-Guillén *et al.* (2011) menyatakan perubahan rantai triple helix menjadi  $\alpha$ -helix menunjukkan bahwa kolagen telah terhidrolisis menjadi hidrolisat kolagen.

Amida II dan amida III merupakan intensitas rasio struktur *triple helix* yang merupakan penciri kolagen. Amida II

hidrolisat kolagen kulit ikan nila memiliki bilangan gelombang  $1461,77\text{ cm}^{-1}$  dan amida III  $1250,02\text{ cm}^{-1}$ . Menurut Kong dan Yu (2007) Amida II memiliki wilayah bilangan gelombang  $1480\text{-}1575$  yang menunjukkan adanya gugus N-H *bending* (40-60%) dan C-N *stretching* (18-40%) sedangkan amida III berada pada wilayah serapan  $1229\text{-}1301\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan CN *stretching* dan N-H *bending*.

### Aktivitas Antioksidan dan Penghambatan Tirosinase Hidrolisat Kolagen Kulit Ikan Nila

Hidrolisat kolagen dianalisis kandungan bioktivitasnya yang meliputi aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan pada hidrolisat kolagen diperoleh  $\text{IC}_{50}$  sebesar  $788\text{ }\mu\text{g/mL}$ . Aktivitas antioksidan hidrolisat kolagen yang diukur dengan  $\text{IC}_{50}$  dikategorikan sangat lemah. Menurut Molyneux (2004) antioksidan dikatakan sangat kuat jika nilai  $\text{IC}_{50}$  kurang dari 50 ppm, kuat 50-100 ppm, sedang 100-150 ppm, lemah 101-150 ppm dan sangat lemah lebih dari 200 ppm. Fauzi (2018) melaporkan hidrolisat kolagen dari kulit ikan tuna sirip kuning menggunakan enzim alkalase memiliki aktivitas antioksidan 251,23 ppm dan penghambatan tirosinase 52,91%.

Aktivitas antioksidan yang terbilang sangat lemah pada hidrolisat kolagen diduga karena bobot molekulnya terbilang masih tinggi. Chi *et al.* (2014) menyatakan semakin tinggi aktivitas antioksidan pada peptida berkorelasi positif dengan bobot molekulnya yang semakin rendah. Hong *et al.* (2019) menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan pada peptida dapat dipengaruhi oleh sekuens asam amino, jumlah asam amino, tingkat hidrolisis serta bobot molekul yang rendah. Je *et al.* (2007) menyatakan hidrolisat dengan bobot molekul yang rendah memiliki sifat antioksidan yang lebih kuat dibandingkan hidrolisat dengan bobot molekul yang tinggi.

Penghambatan tirosinase oleh hidrolisat kolagen  $IC_{50}$  sebesar 102,9  $\mu\text{g/mL}$ .  $IC_{50}$  hidrolisat kolagen lebih rendah dibandingkan dengan asam konjic sebagai kontrol positif ( $IC_{50}$  73,53  $\mu\text{g/mL}$ ). Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  hidrolisat kolagen tidak memiliki efek sitotoksitas pada sel dan memiliki kemampuan dalam menghambat produksi pigmen pada sel melanosit. Curto *et al.* (1999) menyatakan suatu bahan dinyatakan memiliki aktivitas penghambatan enzim tirosinase kuat  $IC_{50} < 25 \mu\text{g/mL}$ , penghambatan pigmentasi pada sel melanosit  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ , dan tidak bersifat sitotoksik untuk sel  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  serta  $> 200 \mu\text{g/mL}$  tidak efektif dalam menghambat enzim tirosinase, pigmentasi melanosit dan sitotoksitas melanosit. Melanosit merupakan salah satu komponen penting dalam sistem pigmentasi pada kulit yang memiliki peranan dalam menghasilkan dan mendistribusikan melanin, proses ini disebut dengan melanogenesis. Pigmentasi pada kulit melibatkan melanosit, melanosome, melanin dan enzim tirosinase (Damayanti dan Listiawan 2004).

## Rendemen dan Komposisi Kimia Biomassa *Spirulina*

Pemanenan *Spirulina* dilakukan saat  $OD > 0,5$  yang ditandai dengan kultur berwarna hijau pekat. Rendemen hasil kultivasi *Spirulina* yang diperoleh 20,91% (bk). Wulandari *et al.* (2016) menyatakan *Spirulina* yang dikultur menggunakan Walne menghasilkan rendemen sebesar 22% (bk). Menurut Suminto (2009) kelimpahan biomassa *Spirulina* dipengaruhi oleh faktor-faktor antara lain suhu, pH, salinitas air, cahaya dan media yang digunakan. Pengujian komposisi kimia *Spirulina* dilakukan untuk mengetahui kandungan gizi yang terkandung dalam *Spirulina* hasil kultivasi. Hasil pengujian komposisi kimia *Spirulina* terdapat di Table 2.

*Spirulina* merupakan mikroalga yang tinggi kandungan protein dan karbohidrat tetapi rendah lemak. Kadar lemak pada *Spirulina* sangat sedikit yaitu 0,7% dan berada di bawah ambang minimal yang telah ditetapkan oleh SNI (2018) yaitu minimal 2%. Kadar abu *Spirulina* dikategorikan tinggi yaitu 8,1%, hal ini dapat berasal dari nutrien yang digunakan pada saat kultivasi *Spirulina*. Setyaningsih *et al.* (2011) menyatakan media dan nutrien kultivasi *Spirulina* yang berbeda dapat mempengaruhi kandungan kadar abu pada *Spirulina*. Richmond (1988) menyatakan dalam kultivasi *Spirulina* terdapat komponen nutrien berupa garam dan karbonat sehingga dapat terbawa pada biomassa *Spirulina*.

## Aktivitas Antioksidan dan Penghambatan Tirosinase Biomassa *Spirulina*

Hasil pengujian aktivitas antioksidan pada *Spirulina* diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 714,6  $\mu\text{g/mL}$ . Yudiati *et al.* (2011) menyatakan

Table 2 Proximate content of *Spirulina* biomass

Parameters	<i>Spirulina</i> sample (%)	Standard of dried <i>Spirulina</i> for supplement (SNI 2018)
Protein	57.3	Min. 50 %
Ash	8.1	-
Fat	0.7	Min. 2%
Moisture	5.6	Max. 10%
Carbohydrate	27.8	-

ekstrak kasar *Spirulina* menggunakan metanol memiliki  $IC_{50}$  323.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Penggunaan metode dan pelarut ekstraksi *Spirulina* yang berbeda akan menghasilkan nilai antioksidan *Spirulina* yang berbeda.

Kemampuan *Spirulina* dalam menghambat aktivitas tirosinase dinyatakan dengan nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  *Spirulina* dalam penghambatan tirosinase sebesar 1003.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Hasil pengujian aktivitas penghambatan tirosinase oleh *Spirulina* dikategorikan tidak efektif dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase sehingga tidak dapat menghambat pembentukan melanin pada kulit. Hal ini didukung hasil penelitian Amri *et al.* (2017) menyatakan *Spirulina platensis* memiliki  $IC_{50}$  sebesar 3388  $\mu\text{g}/\text{mL}$  terhadap penghambatan tirosinase. Wu *et al.* (2011) menyatakan *C-phycocyanin* (Cpc) yang merupakan jenis fikosianin utama pada *Spirulina* mampu menekan aktivitas tirosinase dalam memproduksi melanin. *C-phycocyanin* dapat menghambat biosintesis melanin dengan 2 mekanisme ganda yaitu degradasi protein MIFT melalui pengaturan jalur MAPK/ERK dan penekanan aktivitas CREB melalui jalur pAP MAPK

### Karakteristik Fisik Tablet

Hasil evaluasi karakteristik fisik tablet menunjukkan bahwa tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen memenuhi parameter syarat mutu tablet yang telah ditetapkan oleh DEPKES RI (1995) pada tablet ukuran >300 mg kecuali pada nilai kerapuhan yang dapat dilihat pada *Table 3*.

### Keseragaman bobot dan ukuran

Keseragaman bobot pada tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen ini berkisar antara 764–792 mg dengan keseragaman ukuran diameter 1 cm dan tebal 1.15 cm. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa formulasi A berpengaruh nyata terhadap formulasi B dan C terhadap keseragaman bobot. Berdasarkan hasil uji keseragaman bobot, formula A, B dan C telah memenuhi persyaratan keseragaman bobot yang telah ditetapkan oleh Departemen Kesehatan RI (1995) yaitu tidak boleh ada penyimpangan bobot melebihi 5% dari bobot rata-rata (tidak kurang 760 mg dan tidak lebih dari 840 mg) dan tidak ada satu tablet yang penyimpangan bobotnya melebihi 10% (tidak kurang dari 720 mg dan tidak lebih dari 880 mg). Lachman *et al.* (1994) menyatakan faktor yang mempengaruhi keseragaman bobot adalah keseragaman pengisian *die* dan jumlah bahan yang diisikan ke dalam *die* dan tekanan yang diberikan pada saat mencetak tablet.

### Kekerasan dan kerapuhan tablet

Hasil sidik ragam kekerasan tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen menunjukkan formula A berbeda nyata dengan formula B dan C. Semakin keras tablet maka kerapuhannya juga semakin rendah. Beberapa hal yang mempengaruhi kekerasan pada tablet adalah ukuran, bobot, tekanan pada pencetakan serta kemampuan ikat dari bahan pengikat. Kerapuhan pada formula A telah memenuhi persyaratan kerapuhan tablet yaitu minimal tidak melebihi 1% sedangkan formula B dan C tidak memenuhi persyaratan DEPKES RI (1995).

Table 3 The characterization of spirulina and collagen hydrolysate tablet

Particulars	Formulation			Tablet Quality Requirements (DEPKES RI 1995)
	A	B	C	
Weight homogeneity (mg)	792.32±5.7 <sup>b</sup>	766.03±8.1 <sup>a</sup>	764±4.6 <sup>a</sup>	5% and 10% from weight tablets
Size homogeneity				
a. tablet diameters (cm)	1	1	1	3x tablet thickness
b. tablet thickness (cm)	1.15	1.15	1.15	$\geq D \geq 1 \frac{1}{3}$ tablet thickness
Roughness (Kp)	7.66±0.5 <sup>a</sup>	5.94±0.9 <sup>b</sup>	5.33±0.8 <sup>b</sup>	4–8 Kp
Fragility (%)	0.27 % <sup>a</sup>	2.273% <sup>b</sup>	3.079% <sup>b</sup>	< 1%
Disintegration time	0:14:16	0:11:19	0:08:13	< 15 min

### Waktu hancur

Berdasarkan hasil pengujian waktu hancur (Table 3), formula C memiliki waktu hancur yang paling cepat yaitu 8 menit dan 13 detik. Formula C memiliki nilai kekerasan yang rendah dan nilai keregesan yang tinggi jika dibandingkan dengan formula A dan B. Faktor-faktor yang mempengaruhi waktu hancur adalah bahan tambahan yang digunakan, metode pembuatan tablet, bahan pelincir yang digunakan, jenis dan konsentrasi bahan pengikat, sifat fisika kimia meliputi ukuran partikel dan stuktur molekul (Fahleny *et al.* 2014).

Berdasarkan hasil pengujian keseragaman bobot, keseragaman ukuran, kekerasan, waktu hancur dan keregesan, formula A merupakan formula tablet terpilih yang telah memenuhi persyaratan DEPKES RI (1995).

### Komposisi Kimia Tablet *Spirulina* Hidrolisat Kolagen

Pengujian komposisi kimia tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen dilakukan pada formula A yang merupakan formula terpilih berdasarkan karakteristik tablet. Hasil pengujian kandungan gizi tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen dapat dilihat pada Table 4.

Table 4 Proximate content of *Spirulina* and collagen hydrolysate tablets

Parameters	<i>Spirulina</i> and collagen hydrolysate tablets (%)
Protein	39.2
Ash	12.3
Lipid	0.2
Moisture	8.7
Carbohydrate	39.5

Berdasarkan pengujian komposisi kimia tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen, protein merupakan kandungan yang paling tinggi. Kandungan protein pada tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen sebesar 39.2%. Nilai protein ini lebih tinggi jika dibandingkan daging ikan tuna sebesar 13,6 g/100 g, ikan nila 16,1 g/100 g, udang 14,28 g/100 g, daging sapi 18,80 g/100 g (KEMENTAN RI 2019). Saputra *et al.* (2014)

menyatakan penambahan 20% *Spirulina* pada tablet hisap memiliki kadar protein sebesar 24,326%. Kadar protein yang berbeda dapat disebabkan oleh penambahan *Spirulina* yang digunakan.

Kadar abu tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen sangat tinggi. Tingginya kadar abu pada tablet ini diduga berasal dari *Spirulina* yang digunakan. Setyaningsih *et al.* (2011) menyatakan media dan nutrisi kultivasi *Spirulina* yang berbeda dapat mempengaruhi kandungan kadar abu pada *Spirulina*, selain itu Richmond (1988) juga menyatakan dalam kultivasi *Spirulina* terdapat komponen nutrisi berupa garam dan karbonat sehingga dapat terbawa pada biomassa *Spirulina*.

Kadar lemak pada tablet sangat rendah hal ini disebabkan bahan baku yang digunakan terutama *Spirulina* memiliki kandungan lemak yang rendah. Tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen ini dikategorikan sebagai tablet yang bebas lemak. BPOM (2016) tablet dengan lemak minimal 3 g dikategorikan rendah lemak, dan tablet dikategorikan bebas lemak adalah tablet yang memiliki kandungan lemaknya maksimal 0,5 g. Nicoletti (2016) menyatakan *Spirulina platensis* dan *Spirulina maxima* mengandung asam lemak yaitu asam linoleat (ALA), asam linoleat (LA), asam stearidonik (SDA), asam eicosapentaenoic (EPA), asam decosaheptaenoic (DHA) dan asam arakidonat (AA).

Kadar air tablet telah memenuhi persyaratan BPOM (2015) yaitu kadar air tablet sediaan suplemen kesehatan sebesar ≤10%. Hasil penelitian Saputra *et al.* (2014) menunjukkan kadar air pada tablet hisap dengan penambahan *Spirulina* 20% adalah 2,29%. Kadar karbohidrat pada tablet terbilang tinggi, tingginya karbohidrat pada tablet diperoleh dari *Spirulina* serta bahan tambahan seperti avicel sebagai bahan pengisi.

### Aktivitas Antioksidan dan Penghambatan Tirosinase Tablet *Spirulina* dan Hidrolisat Kolagen

Oksidan merupakan molekul-molekul yang tidak stabil, memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan diorbit luarnya. Molekul-molekul ini bersifat reaktif dalam mengambil elektron yang ada pada



tubuh sehingga merusak sel-sel tubuh yang berakibat penuaan dini, penyakit kanker dan serangan jantung. Radikal bebas akan menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak berbagai komponen sel hidup seperti protein, lemak, karbohidrat dan asam nukleat. Pembentukan oksidan terjadi secara berantai dan akan menghasilkan radikal bebas yang baru dan jumlahnya akan terus bertambah. Senyawa antioksidan merupakan zat yang mampu menangkal pembentukan radikal bebas tersebut.

Aktivitas antioksidan pada tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen sebesar 843 ppm yang tergolong sangat rendah. Nilai ini lebih tinggi jika dibandingkan hasil penelitian Fahleny *et al.* (2014) yaitu antioksidan tablet hisap *Spirulina* yang diekstraksi dengan etanol 288,68 ppm. Penghambatan tirosinase oleh tablet *Spirulina* dan hidrolisat kolagen sebesar 163,6 ppm, hal ini disebabkan *Spirulina* dan hidrolisat kolagen yang merupakan bahan penyusun tablet memiliki aktivitas penghambatan pada tirosinase rendah, sehingga berpengaruh pada aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase oleh tablet.

Mekanisme pembentukan melanin yaitu tirosin dioksidasi menjadi 3,4-dihidroksi fenilalanin (DOPA) oleh enzim tirosinase dan dioksidasi kembali menjadi DOPA kuinon. Kuinon yang dihasilkan merupakan substrat untuk sintesis eumelanin (pigmen coklat tua) dan *pheomelanin* (pigmen kuning). DOPA kuinon selanjutnya mengalami siklisasi intramolekul yang menghasilkan indoline *leukodopachrome* (*cyclodopa*), pertukaran redoks antara *leukodopachrome* dengan DOPA kuinon menghasilkan dua molekul yaitu *dopachrome* dan L-3,4-*dihydroxyphenylalanine* (L-DOPA), yang juga merupakan substrat untuk TYR dan dioksidasi oleh enzim menjadi DOPA kuinon. *Dopachrome* selanjutnya terurai secara bertahap untuk menghasilkan *dihydroxyindole* (DHI) dan *dihydroxyindole-2-carboxylic acid* (DHICA). Proses selanjutnya dikatalisis oleh TRP-2 yang disebut sebagai *dopachrome* tautomerase (DCT). Proses terakhir adalah dihidroksiindol ini (DHI dan DHICA) dioksidasi menjadi eumelanin (cokelat-hitam). Mekanisme

pembentukan *pheomelanin* meliputi konversi DOPA kuinon menjadi 5-S-*cysteinyl*dopa atau *glutathionyl*dopa dengan adanya sistein atau glutationin, hasil oksidasi selanjutnya menghasilkan zat benzotiazin dan menjadi *pheumelanin* (Pillaiyar *et al.* 2017). Dari uraian ini dapat disimpulkan bahwa enzim utama dalam sintesis melanin adalah enzim tirosinase. Enzim ini berperan dalam mengkatalisis berbagai tahapan biosintesis melanin (Park dan Yard 2012). Bahan yang memiliki aktivitas penghambatan tirosinase merupakan bahan yang dapat dimanfaatkan sebagai agen pencerah kulit dan anti penuaan.

## KESIMPULAN

Aktivitas antioksidan pada hidrolisat kolagen, *Spirulina* dan tablet dikategorikan sangat lemah yaitu lebih dari 200 ppm. Aktivitas penghambatan tirosinase oleh *Spirulina*, hidrolisat dan tablet kurang efektif dalam menghambat tirosinase.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adiba BD, Salem B, Nabil S, Abdelhakim M. 2011. Preliminary characterization of food tablets from date (*Phoenix dactylifera* L.) and *Spirulina* (*Spirulina* sp.) powders. *J. Powder Technology*. 725-730.
- Amri E, Dharma A, Armaini, Tjong DH. 2017. Potency of microalgae as tyrosinase inhibitor. *RJPBCS*. 8(4): 577-581.
- Batubara I, Darusman IK, Mitsunaga T, Rahminiwati M, Djauhari E. 2010. Potency of Indonesian medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. *J. Biol. Sci.* 10(2): 138-144.
- [BPOM] Badan POM RI. 2015. *Persyaratan kadar air pada sediaan tablet dan tablet efervesen pada suplemen kesehatan*. Jakarta(ID): Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Campos PMMBG, Melo MO, Calixto LS, Fossa MM. 2015. An oral supplementation based on hydrolyzed collagen and vitamins improves skin elasticity and dermis echogenicity: a clinical placebo controlled study. *Clin Pharmacol Biopharm.* 4(3):1-6.
- Chi CF, Cao ZH, Wang B, Hu FY, Li ZR, Zhang B. 2014. Antioxidant and functional

- properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*. 19: 11211-11230.
- Chriswardana M, Nur MMA, Hadiyanto. 2013. *Spirulina platensis*: Potensinya sebagai bahan pangan fungsional. *JATP*. 2(1):1-4.
- Curto EV, Kwong C, Hermersdörfer H, Glatt H. 1999. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. 57: 663-672.
- Damayanti N, Listiawan MY. 2004. Fisiologi dan biokimia pigmentasi kulit. *Berkala Ilmu Penyakit Kulit & Kelamin*. 16(2): 156-162.
- [DEPKESRI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia* edisi IV. Jakarta(ID): Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Fahleny R, Trilaksana W, Setyaningsih I. 2014. Aktivitas antioksidan pada formula terpilih tablet hisab *Spirulina platensis* berdasarkan karakteristik fisik. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 6(2):427-444.
- Fan J, Zhuang Y, Li B. 2013. Effect of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging. *Nutrients*. (5):223-233.
- Fauzi S. 2018. Hidrolisat kolagen kulit ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) sebagai antipenuaan [tesis]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Gómez-Guillén MC, Turnay J, Fernández-Díaz MD, Ulmo N, Lizarbe MA, Montero P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloid*. 16: 25-34.
- Hartina UMR, Annuar QH, Izzraen NQMN, Hasmadi M. 2019. Properties of hydrolysed collagen from the skin of milkfish (*Chanos chanos*) as affected by different enzymatic treatments. *International Journal of Research Science Management*. 6(2): 34-41.
- Hema GS, Joshy CG, Shyni K, Chatterjee NS, Ninan G, Mathew S. 2017. Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish skin (*Epinephelus malabaricus*) using response surface methodology and its characterization. *J Food Sci Technol*. 54(2):488-496
- Hong GP, Min SG, Jo YJ. 2019. Anti-oxidative and anti-aging activities of porcine by-product collagen hydrolysates produced by commercial proteases: effect of hydrolysis and ultrafiltration. *Molecules*. 24:1-14.
- Iitchenco S, Kempka AP, Prestes RC. 2017. Profiles of enzymatic hydrolysis of different collagens and derivating over time. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. 11(1): 2165-2185.
- Je JY, Qian ZJ, Byun HG, Kim SK. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem*. 42 : 840-846.
- [KEMENTAN RI] Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2019. *Panduan Penyusunan Neraca Bahan Makanan*. Jakarta(ID): Badan Ketahanan Pangan.
- Kong J, Yu S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 39(8): 549-559.
- Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. 1994. *Teori dan Praktek Farmasi Industri II*. Jakarta(ID): UI Press. Terjemahan dari: The Theory and Practise of Industrial Pharmacy.
- Laing I. 1991. *Cultivation of marine unicellular algae*. Lowestoft(UK): Laboratory Leaflet.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radicals diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol*. 26(2): 211-219.
- Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 86: 325-332.

- Nicoletti M. 2016. Microalgae nutraceuticals. *Foods*. 5(54): 1-13.
- Park HY, Yaer M. 2012. *Biology of melanocytes* edisi ke-8. New York(US): McGraw-Hill.
- Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam. 2017. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 32(1): 403-425.
- Richmond A. 1988. *Spirulina*. Di dalam: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (Ed) *Microalgae biotechnology*. England (UK): Cambridge university Pr.
- Saputra JSE, Agustini TW, Dewi EN. 2014. Pengaruh penambahan biomassa serbuk *Spirulina platensis* terhadap sifat fisik, kimia, dan sensori pada tablet hisab (Lozenges). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 17(3): 281-291
- Setyaningsih I, Saputra AT, Uju. 2011. Komposisi kimia dan kandungan pigmen pada *Spirulina fusiformis* umur panen yang berbeda dalam media pupuk. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 14(1):63-69.
- Soni A, Dubey M, Verma M, Dhankhar R, Kaushal V, Atri R, Sabharwal R. 2015. Revisiting the role of phycocyanin in current clinical practice. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 6(1): 4950-4600.
- Suminto. 2009. Penggunaan jenis media kultur teknis terhadap produksi dan kandungan nutrisi sel *Spirulina platensis*. *JSP*. 4(2):53-61.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2018. SNI 8468 *Spirulina* spp kering- syarat mutu dan pengolahan. Jakarta(ID): Badan Standardisasi Nasional.
- Syukroni I, Trilaksani W, Uju. 2017. Recovery and valorization of snakehead fish (*Channa striata*) surimi wash water as stock albumin tablet. *International Journal of Scientific & Technology Research*. 6(11): 2277-8616.
- Wang W, Li Z, Liu J, Wang Y, Liu S, Sun M. 2013. Comparison between thermal hydrolysis and enzymatic proteolysis processes for the preparation of tilapia skin collagen hydrolysates. *J. Food Sci*. 31(1):1-4.
- Wu LC, Lin YY, Yang SY, Weng YT, Tsai YT. 2011. Antimelanogenic effect of c-phycocyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways. *J Biomed Sci*. 18(1):1-11.
- Wulandari DA, Setyaningsih I, Syafrudin D, Asih PBS. 2016. Ekstraksi fikosianin dari *Spirulina platensis* dan aktivitas antimalaria secara invitro. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(1): 17-25.
- Yong CS, Woo SC, jong HP, Jin OP, Jung KH, Hyeon YL. 2013. Stable isolation of phycocyanin from *Spirulina platensis* associated with high-pressure extraction process. *Int. J. Mol. Sci*. 14(1):1778-1787.
- Yudiati E, Sedjati S, Sunarsih, Agustian R. 2011. Aktivitas antioksidan dan toksisitas ekstrak metanol dan pigmen kasar *Spirulina* sp. *ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences*. 16 (4):187-192.