

3. RAGAM METODE DETEKSI GELATIN BABI PADA SARANG BURUNG WALET

SBW merupakan makanan yang sudah ada sejak dulu dan dipercaya bernilai gizi tinggi dengan manfaat sebagai terapeutik bagi kesehatan tubuh dan hanya beberapa orang saja yang dapat mencicipinya karena harga jualnya yang tinggi (Chua *et al.*, 2016). SBW dapat dipalsukan dengan kandung kemih ikan, kulit babi (dalam gelatin), karaya gum, rumput laut coralline, strip agar, dan jamur tremella (Marcone *et al.*, 2005). Namun, SBW sering kali dipalsukan dengan bahan pemalsu seperti gelatin babi untuk menambah berat bersihnya karena gelatin memiliki karakteristik fisik yang mirip dan harga ekonomis. Hal ini dapat membuat keresahan pada masyarakat karena bertolak belakang dengan nilai-nilai agama-budaya umat muslim dan berbahaya jika menggunakan gelatin babi industri. Selain itu, adanya penambahan adulteran gelatin babi pada SBW akan berdampak pada komposisi kimia, kualitas dan bahkan dapat menimbulkan bahaya bagi kesehatan (Guo *et al.*, 2018). Substitusi bahan ini sulit diketahui secara kasat mata maka dari itu untuk mendeteksi kandungan babi digunakan alat seperti ELISA, spektroskopi (FTIR, NIR, MIR), PCR (Elisa *et al.*, 2019) dan beberapa metode campuran. Cara deteksi gelatin babi pada SBW dapat dilihat melalui Tabel 3, 4, 5, 6 dan 7.

3.1 Deteksi Pemalsuan Gelatin Babi dengan Metode Spektroskopi

FTIR atau yang bisa disebut juga dengan *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* adalah alat yang sering digunakan untuk menganalisis gugus fungsi dengan cara kualitatif pada suatu bahan yang di dalamnya terdapat lemak babi, karet, obat, minyak, kosmetik dan lainnya. FTIR bisa juga digunakan pada analisis kuantitatif dengan data dari intensitas panjang gelombang tertentu untuk perhitungan. Pada penelitian ini menggunakan alat deteksi FTIR, NIR, MIR yang digunakan untuk mendeteksi gelatin babi. Pada Tabel. 3 dapat dilihat bahwa untuk metode spektroskopi banyak menggunakan analisis FTIR dengan preparasi sampel berupa sampel yang dihaluskan lalu ditambahkan KBr dan ditekan hingga tipis, namun untuk FTIR-ATR dilakukan dengan cara sampel diendapkan kemudian disebar pada ATR. Metode FTIR dengan

KBr dan ATR ini dapat mendeteksi konsentrasi minimal gelatin sebesar 1% dari konsentrasi gelatin 1-30% dan 5% dari konsentrasi gelatin 5-20% yang telah ditambahkan.

Fingerprint pada gelatin babi ditandai dengan gugus fungsi CH regangan gugus C=CH dan CH₂ dari sekian banyak studi yang berhasil mendeteksi keduanya adalah analisis FTIR dengan menggunakan KBr sementara gugus fungsi dari gelatin babi yang umum ditemukan adalah gugus fungsi dari C=O. Kemudian untuk gugus fungsi C=O sendiri ditandai dari kisaran bilangan gelombang 1602-1742 cm⁻¹ yang menandakan ester dari asam lemak sementara gugus fungsi CH regangan gugus C-CH berada pada bilangan gelombang 3009 cm⁻¹ menandakan lemak tidak jenuh dan untuk gugus fungsi CH₂ berada pada bilangan gelombang 2855 cm⁻¹ sebagai penanda regangan dari lemak. Pada metode MIR-ATR preparasi dilakukan dengan cara menghaluskan SBW dan diletakkan diatas ATR. Dari metode tersebut dapat mendeteksi sebesar 1% dari konsentrasi gelatin 1-10% yang telah ditambahkan dan gugus fungsi C=O juga ditemukan pada metode ini di bilangan gelombang 1740 cm⁻¹. Pada metode NIR preparasi sampel dilakukan dengan sampel bubuk dikemas padat dalam cawan sampel dengan konsentrasi adulteran 1-50%. Semua metode uji pada Tabel 3 tidak menggunakan bahan pelarut.

Analisis multivariat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari dua macam yakni PCA, HCA, LDA, DD-SIMCA, SVM, BPNN, KNN (kualitatif), dan, GA, OCPLS, PLSR, PLS (kuantitatif). Metode FTIR banyak menggunakan interpretasi data PCA (*Principle Component Analysis*). Adapula yang menggunakan interpretasi data LDA (*PCA*), SVM (*Support Vector Machine*), OCPLS (*One Class Partial Least Square*), HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*). Kemudian pada metode NIR interpretasi data yang digunakan adalah GA (*Genetic Algorithm*), KNN (*K-nearest neighbors*), PLSR (*Partial Least Square Regression*) sementara pada metode MIR menggunakan interpretasi data yaitu DD-SIMCA (*Data-Driven Soft Independent Modelling of Class Analogy*).

Tabel 3. Deteksi Pemalsuan Gelatin Babi dengan Metode Spektroskopi

No	Preparasi sampel		Massa sampel SBW (mg)	Jumlah sampel gelatin Babi (mg)	Jenis Instrumen	Sarang Burung Walet	Konsentrasi Gelatin babi (%)	Konsentrasi terendah Gelatin yang terdeteksi (%)	Gugus Fungsi	Wave number (cm ⁻¹)	Interpretasi Data	Referensi
1	Sampel Diendapkan	Disebar merata di permukaan ATR	100	N/A	FTIR	<i>cave nest Aerodramus sp. dan house nest Collocalia sp.</i>	5, 10, 15, 20	5	C=O (ester dari asam lemak)	1600-1700	PCA	Nurul <i>et al.</i> , 2018
2	N/A		N/A	N/A	FTIR	<i>Aerodramus sp., Collocalia sp. orange nest, blood cave nest</i>	1, 5, 10, 20, 30	1	C=O	1602	PCA	Noor <i>et al.</i> , 2020
3	SBW dihaluskan & dicampur KBr	Dikompres jadi pelet	N/A	N/A	FTIR	<i>house nest, cave nest</i>	1, 5, 10, 30, 50, 100	10	C=O, CH ₂ (regangan dari lemak).	1745, 2855	PCA, LDA, SVM, OCPLS	Guo <i>et al.</i> , 2018
4	SBW dihaluskan & dicampur KBr	Dikompres jadi pelet lapis tipis	1	1	FTIR	<i>Aerodramus fuciphagus</i>	N/A	N/A	C=O, CH regangan gugus C=CH (lemak tidak jenuh).	1742, 3009	N/A	Hamzah <i>et al.</i> , 2013
5	SBW dihaluskan & dicampur KBr	Dikompres menjadi serpihan tipis	500	N/A	FTIR	<i>Aerodramus, Collocalia</i>	N/A	N/A	C=O, CH ₂	1745, 2855	HCA, PCA, LDA	Guo <i>et al.</i> , 2017
6	SBW dihaluskan & diletakkan pada ATR	Dikompres sampai 70°	20	N/A	MIR-ATR	<i>Aerodramus fuciphagus</i>	1, 5, 10	1	C=O	1740	PCA, DD-SIMCA	Adenan <i>et al.</i> , 2019

Lanjutan Tabel 4. Deteksi Pemalsuan Gelatin Babi dengan Metode Spektroskopi

Preparasi sampel No	Massa sampel SBW (mg)	Jumlah sampel gelatin Babi (mg)	Jenis Instrumen	Sarang Burung Walet	Konsentrasi Gelatin babi (%)	Konsentrasi terendah Gelatin yang terdeteksi (%)	Gugus Fungsi	Wave number (cm ⁻¹)	Interpretasi Data	Referensi
7	300	400	NIR	N/A	1, 5, 10, 30, 50	1	N/A	N/A	GA, KNN, PCA, PLSR	Shi <i>et al.</i> , 2017

Keterangan :

N/A	= <i>Not available</i>
SBW	= Sarang Burung Walet
PCA	= <i>Principle Component Analysis</i>
PDA	= <i>Pile Driving Analyzer</i>
HCA	= <i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
BPNN	= <i>Back Propagation Neural Networks</i>
PLS	= <i>Partial Least Square</i>
PLSR	= <i>Partial Least Squares Regression</i>
KNN	= <i>K-nearest neighbors</i>
GA	= <i>Genetic Algorithm</i>
LDA	= <i>Linear Discriminant Analysis</i>
SVM	= <i>Support Vector Machine</i>
OCPLS	= <i>One Class Partial Least Square</i>
DD-SIMCA	= <i>Data-Driven Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
NIR	= <i>Near Infrared</i>
MIR-ATR	= <i>Mid-Infrared – Attenuated Total Reflectance</i>

3.2 Deteksi Pemalsuan Gelatin Babi dengan Metode ELISA

ELISA memiliki komponen utama berupa Ab (Antibodi), Ag (antigen), imunoprob, substrat, reagen penghentian reaksi, *buffer*, cawan ELISA. Penggunaan antibodi anti-peptida poliklonal (PAB) sebagai marker pada metode ELISA dapat dilihat pada Tabel 4. Tabel tersebut menjelaskan bahwa metode ELISA berhasil dalam menemukan keberadaan gelatin dengan LOD terendah 0,05% dengan konsentrasi gelatin yang berbeda yaitu 0,5-5% di pAb3 ELISA 1 (Tukiran *et al.*, 2016) dan LOD tertinggi sebesar 0,12% dengan LOQ 0,56 dan *range* konsentrasi mulai dari 0,05-5% di pAb2 ELISA 2 (Tukiran *et al.*, 2015).

Pelarut yang digunakan juga beragam untuk ELISA 1 ada bahan kimia seperti Aseton, Na_2CO_3 , NaHCO_3 sementara ELISA 2 menggunakan jenis pelarut seperti air ultra murni dan air deionisasi. Ada pula preparasi sampel yang dilakukan pada penelitian ini yaitu untuk ELISA 1 pelet protein dilarutkan ke dalam *buffer* kemudian gel dihilangkan warna hingga bersih lalu peptida sintetik dan antibodi poliklonal dibuat serta ekstrak protein gelatin babi ditambahkan pada SBW lalu diencerkan. ELISA 2 juga memiliki preparasi yang mirip bedanya adalah pada tahap pertama PBS digunakan untuk melarutkan pellet protein dan disini tidak terdapat tahap warna gel yang dihilangkan.

Tabel 5. Deteksi Pemalsuan Gelatin Babi dengan Metode ELISA

No	Preparasi sampel			Jenis instrumen	Marker	Bahan kimia yang digunakan	Konsentrasi gelatin (%)	Konsentrasi terendah gelatin terdeteksi (%)	Recovery (%)	LOD	LOQ	Referensi
1	Pellet protein dilarutkan dalam <i>buffer</i>	Gel dihilangkan warna hingga bersih	Produksi peptida sintetis dan antibodi poliklonal	ELISA	pAb3	Aseton, Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃	5, 3, 1, 0,5	N/A	62,8 -125,4	0,05%	N/A	Tukiran <i>et al.</i> , 2016
2	pelet protein dilarutkan dalam PBS	Produksi peptida sintetis dan antibodi poliklonal	Melakukan analisis rangkap tiga	ELISA	pAb1 pAb2 pAb3	Air Ultra murni, air deionisasi	5, 3, 1, 0,5, 0,1, 0,05	0,05	N/A	0,12 0,10 0,11	0,56 0,26 0,45	Tukiran <i>et al.</i> , 2015

Keterangan :
N/A

= *Not available*

3.3. Deteksi Pemalsuan Gelatin Babi dengan Kombinasi Beberapa Metode

Kombinasi beberapa metode ini menggunakan metode kromatografi. Metode kromatografi adalah metode yang dapat memisahkan komponen-komponen dalam sampel. Pada metode spektrometri massa tandem nano LC-QTRAP-MS/MS analisis kromatografinya menggunakan marker peptida spesifik untuk mendeteksi keberadaan dari gelatin. Seperti yang bisa dilihat pada Tabel 5. untuk marker peptida spesifik yang dicari adalah Kolagen tipe 1 rantai alfa 1 dengan senyawa GETGPAGPAGPVGPVGAR dan TGETGASGPPGFAGEK. Konsentrasi yang dilakukan untuk pengujian antara 1-80% dan membutuhkan 500 gram sampel SBW juga 200 gram sampel adulteran. Pelarut yang digunakan berupa asetonitril dan asam format. Preparasi sampel diawali dengan mengekstrak protein kemudian ekstrak protein dicampur dengan *buffer* dan ekstrak pelarut lalu dianalisis Nano LC-QTRAP-MS/MS setelah itu mencari kumpulan data dan terakhir campuran peptida dianalisis dengan MRM terjadwal.

Pada metode susunan sensor kolorimetri marker yang dicari adalah komponen volatil asam heksadekanoat, propanetriol (yang merupakan komponen volatil pada SBW), dan 2,4-dimetilamfetamin (pada kulit babi) yang nantinya akan diterjemahkan melalui metode kemometrik seperti PCA, HCA, BPNN, dan PLS. Berbeda dengan metode spektrometri massa tandem nano LC-QTRAP-MS/MS, air suling digunakan sebagai pelarut dalam metode ini. Konsentrasi yang dilakukan untuk pengujian antara 10-75% dan membutuhkan massa sampel adulteran dan SBW sebanyak 200 gram. Preparasi sampel diawali dengan pemilihan panduan pewarna kemoresponsif dengan GC-MS dilanjutkan sampel diletakkan di labu kerucut tertutup dan diberi air suling lalu komponen volatil dari infus SBW dipompa ke ruang uji dan setelah itu memilih pewarna kemorespon yang peka pada karakter komponen volatil.

Tabel 6. Deteksi Pemalsuan Gelatin Babi dengan kombinasi beberapa metode

Preparasi sampel				Massa sampel SBW (mg)	Jumlah sampel gelatin Babi (mg)	Jenis instrument	Konsentrasi gelatin	Marker	Pelarut	Retention time	Interpretasi data	Referensi
Mengekstrak protein mentah	Ekstrak protein dicampur dengan <i>buffer</i> dan ekstrak pelarut	Analisis Nano LC-QTRAP-MS/MS	Mencari kumpulan data	500	200	Spektrometri Masa Tandem nano LC-QTRAP-MS/MS	1, 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80	Peptida spesifik dengan senyawa GETGPAGPAG PVGPGAR dan TGETGASGPP GFAGEK dari kolagen tipe 1 rantai alfa 1	Asetonitril, asam format	12,25	N/A	Ma <i>et al.</i> , 2019
Pemilihan panduan pewarna kemoresponsif dengan GC-MS	Sampel diletakkan di labu kerucut tertutup dan diberi air suling	Komponen volatil dari infus SBW dipompa ke ruang uji	Memilih pewarna kemorespon yg peka pada karakter komponen volatil	200	200	Susunan Sensor Kolorimetri	10, 20, 50, 75	2,4-dimetil amfetamin.	Air suling	N/A	PCA, HCA, BPNN, dan PLS	Huang <i>et al.</i> , 2019

Keterangan :

N/A = *Not available*LC-QTRAP MS/MS = *Liquid Chromatography Coupled With Quadru- Pole/Linear Ion Trap Mass Spectrometry*

3.4 Deteksi Pemalsuan Gelatin Babi dengan Metode PCR

PCR adalah salah satu alat yang digunakan untuk menduplikat sepenggal molekul DNA yang ada pada kompleks molekul besar satu gugus kromosom. Dalam Tabel 6 dapat diketahui bahwa metode PCR *Real Time* bisa mendeteksi keberadaan gelatin dengan marker ATP6 (ATP synthase subunit 6 gene) marker ini digunakan untuk mendeteksi primer dan probe spesifik babi yang menargetkan berdasarkan urutan *Sus scrofa domesticus* dan untuk metode LAMP menggunakan marker Cyt b (*Cytochrome b*) merupakan penanda paling populer dalam identifikasi hewan. Pada Tabel 6. Dapat dilihat bahwa metode PCR *Real Time* dapat menemukan keberadaan gelatin dengan batas metode deteksi / konsentrasi terendah sebesar 0,001% dengan konsentrasi gelatin yang berbeda mulai dari 0,001-10% sementara pada metode LAMP dapat mendeteksi LOD dan batas metode deteksi / konsentrasi gelatin terendah sebesar 0,01% dengan konsentrasi 0,001-50%.

Berdasarkan Tabel 6 dapat dilihat pelarut yang digunakan pada metode PCR *Real Time* yaitu kloroform, etanol, dan air ultra murni hampir sama dengan metode LAMP hanya saja tidak menggunakan bahan air ultra murni. Preparasi sampel pada metode PCR *Real Time* diawali dengan DNA diukur dengan alat nanodrop 33000 kemudian primer dan probe disintesis lalu amplikasi dideteksi dengan elektroforesis dan menghitung efisiensi amplifikasi. Sedangkan LAMP diawali dengan mengukur konsentrasi ekstrak DNA menggunakan spektrofotometer lalu mendesain LAMP primer berdasarkan sitokrom cytb dan dicampur ekstrak DNA SBW kemudian SYBR green I diberikan pada produk LAMP setelah itu DNA murni SBW hasil rebus dan kukus dianalisis PCR dan LAMP dan terakhir uji amplifikasi putaran isothermal yang dimediasi (LAMP).

Tabel 7. Deteksi Pemalsuan Gelatin Babi dengan Metode PCR

	Preparasi sampel		Jenis Instrumen		Massa Sampel SBW (mg)	Jumlah Sampel Gelatin Babi (mg)	Marker	Pelarut	Sensitivitas	Konsentrasi Gelatin (%)	Konsentrasi gelatin terendah terdeteksi (%)	LOD (%)	Referensi
Mengukur DNA dengan nanodrop 3300	Primer dan probe disintesis	Amplikasi dideteksi dengan elektroforesis	Menghitung efisiensi amplifikasi (E)	Waktu nyata Taq-man PCR	15	200	ATP sintase subunit 6 gen (ATP6)	air ultra murni, kloroform dan etanol	N/A	10, 1, 0,1, 0,01, 0,001	0,001	N/A	Guo <i>et al.</i> , 2014
Mengukur konsentrasi ekstrak DNA menggunakan spektrofotometer	Mendesain LAMP primer berdasarkan sitokrom cytb dan dicampur ekstrak DNA SBW	Pemberian SYBR green I pada produk LAMP	DNA murni SBW hasil rebus dan kukus di analisis PCR dan LAMP	uji amplifikasi putaran isothermal yang dimediasi (LAMP)	50	N/A	cytochrome b (cyt b)	Kloroform/ isoamil alkohol.	10 ⁻⁸	50, 10, 5, 1, 0,1, 0,01, 0,001	0,01	0,01	Lee <i>et al.</i> , 2018

Keterangan :

N/A

= *Not available*