

4. PEMBAHASAN

Sarang burung walet memiliki kandungan seperti protein, abu, karbohidrat, zat besi, kalsium, fosfor, garam anorganik, serat organik, dan air serta beberapa asam amino dengan manfaat seperti memperkuat sistem kekebalan tubuh, merangsang pertumbuhan epidermis, menghambat infeksi virus, dan menurunkan masalah pencernaan (Wahyuni *et al.*, 2021). Khasiat dari sarang burung walet sangat melimpah dan banyak sekali permintaan dari konsumen oleh karena itu produk semakin langka dan sebagai akibat menjadi mahal maka dari itu seringkali dicampur bahan tambahan asing yang berguna untuk menambah berat bersih juga kualitas sehingga dapat menambah keuntungan contoh bahan tambahan asing tersebut yaitu gelatin babi. Apabila gelatin babi ditambahkan pada sarang burung walet dapat menyebabkan alergi dan juga masalah persyaratan hukum dan agama karena sebagian masyarakat tidak bisa mengonsumsi bahan tersebut. Dibutuhkan metode deteksi yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan bahan pemalsu karena identifikasi tidak bisa dilakukan dengan kasat mata. Metode yang dapat mendeteksi keberadaan pemalsuan seperti kromatografi, spektroskopi, ELISA dan PCR (Lee *et al.*, 2017).

Sampel yang digunakan dalam data penelitian ini berasal dari beberapa negara yaitu Indonesia, Thailand, dan Malaysia. Sebelum mengukur keberadaan gelatin babi pada sarang burung walet dilakukan preparasi sampel dengan berbagai perlakuan serta *range* konsentrasi yang berbeda. Kemudian bubuk sarang walet dengan massa tertentu dicampur, lalu dilanjutkan dengan deteksi menggunakan alat pengujian berupa spektroskopi, kromatografi, ELISA, dan PCR. Instrumen yang digunakan untuk mendeteksi gelatin babi dalam kurun waktu 5 tahun terakhir lebih sering menggunakan jenis FTIR spektroskopi. Jenis spektroskopi lain yang digunakan yaitu NIR, MIR sementara untuk jenis kromatografi yang digunakan yaitu spektrometri massa tandem nano LC-QTRAP-MS/MS dan metode lainnya yaitu PCR dan ELISA.

4.1. Kemampuan Setiap Metode Dalam Mendeteksi Gelatin Babi Paling Rendah

Pada metode spektroskopi FTIR memiliki konsentrasi gelatin terendah yang dapat terdeteksi yaitu sebesar 1 % pada bilangan gelombang 1742 cm^{-1} , 3009 cm^{-1} dan dengan gugus fungsi C=O, C=CH (Hamzah *et al.*, 2013). Kemudian pada metode MIR konsentrasi gelatin terendah yang terdeteksi adalah 1% pada bilangan gelombang 1740 cm^{-1} dan pada gugus fungsi C=O (Adenan *et al.*, 2019). Selanjutnya untuk metode NIR konsentrasi terendah yang dapat dideteksi sebesar 1%. Lalu pada metode ELISA memiliki konsentrasi terendah yang dapat dideteksi sebesar 0,05% (Tukiran *et al.*, 2015). Sementara untuk metode beberapa kombinasi memiliki LOD sebesar 0,88 % (Huang *et al.*, 2019). Kemudian pada metode PCR ditemukan konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi sebesar 0,001 % (Guo *et al.*, 2014). Pada kombinasi beberapa metode marker yang dideteksi adalah Kolagen tipe 1 rantai alfa 1 dengan senyawa GETGPAGPAGPVGPVGAR dan TGETGASGPPGFAGEK dengan *retention time* 12,25 dan 8,06. Pada pengujian berbagai metode menggunakan parameter berupa LOD (limit deteksi) yang merupakan uji batas minimum konsentrasi yang masih bisa menunjukkan nilai absorbansi oleh instrumen tanpa kriteria akurat dan presisi sementara LOQ (limit kuantitasi) adalah jumlah senyawa target terkecil dalam sampel yang masih bisa diukur oleh alat dengan akurat dan presisi (Sumarno *et al.*, 2018).

4.2. Kemampuan Spektroskopi dalam Mendeteksi Konsentrasi Gelatin Babi

4.2.1. Pengujian Gelatin Babi Terhadap Gugus Fungsi yang Dideteksi oleh Spektroskopi

Berdasarkan Tabel 3, dapat diketahui bahwa adulteran gelatin babi pada SBW dapat dideteksi dengan metode spektroskopi, ELISA, PCR, dan beberapa kombinasi metode. Metode spektroskopi seperti analisis FTIR digunakan untuk mengenali otentikasi produk dengan menggunakan spektrum pada lemak hewannya (Rahmawati *et al.*, 2015) seperti lemak babi (Che Man *et al.*, 2011) dan babi (Hashim *et al.*, 2010). Metode dari FTIR ini sering digunakan dalam mengidentifikasi kandungan gelatin babi yang

dapat dilihat pada Tabel 3. Metode MIR dan NIR digunakan untuk mendeteksi kandungan babi karena pencariannya berfokus pada lemak dari babi (Che Man *et al.*, 2011) sehingga bisa digunakan dalam pengujian kandungan gelatin babi yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Preparasi sampel adalah hal yang penting dalam menentukan otentikasi suatu bahan pangan yang dipalsukan oleh bahan pemalsu. Preparasi sampel berguna untuk mendapatkan spektrum yang diinginkan (Smith, 2011). Pada metode FTIR dapat dilihat dalam Tabel 3. bahwa sebelum pengujian sampel SBW diberi perlakuan terlebih dahulu seperti menjadikan sarang walet berupa bentuk bubuk dan mencampurnya dengan KBr. Hal ini menandakan bahwa spektrum yang digunakan merupakan spektrum berbentuk padat yang hanya dapat diukur dengan menggunakan KBr, NaCl atau sampel cair dalam parafin cair dan jika objek yang diuji sudah tipis atau transparan maka spektrum dapat langsung diukur pada sampel. Itulah mengapa sampel harus dikompres terlebih dahulu (Ferraro, dan Krishnan, 1990).

Dari Tabel 3. dapat dilihat bahwa metode FTIR mempunyai beberapa gugus fungsi yaitu C=O (gugus fungsi C=O ini juga ada pada metode MIR), CH₂, C=CH dengan spektrum 1600-1745 cm⁻¹, 2855 cm⁻¹, 3009 cm⁻¹ secara berurutan untuk membedakan gelatin babi. Hal ini sesuai dengan Irnawati *et al.*, (2021) yang menjelaskan bahwa pada kisaran bilangan gelombang 3010-3000 cm⁻¹ merupakan gugus fungsi C=CH. Puncak serapan yang tinggi ini menunjukkan adanya kandungan lemak tak jenuh. Selanjutnya, pada bilangan gelombang 2875 cm⁻¹ ditemukan gugus fungsi -C-H (CH₂) menandakan regangan dari lemak dan pada bilangan gelombang 1744 cm⁻¹ ditemukan gugus fungsi -C=O yaitu ester.

Gugus fungsi yang paling sering ditemukan pada FTIR adalah C=O (gugus fungsi ini juga terdapat pada metode MIR) dengan spektrum 1600-1745 cm⁻¹. Menurut

pernyataan Rafi M *et al.*, (2016) metode spektroskopi seperti FTIR dapat membedakan adanya gelatin babi dengan mencari keberadaan spektrum yaitu pada bilangan gelombang 1600-1700 cm^{-1} dan pada gugus fungsi C=O yang berasal dari asam lemak. Hal ini sesuai dengan Hamzah *et al.*, (2013) yang menyatakan bahwa hanya kulit babi yang ada pada gelatin yang mempunyai gugus fungsi ikatan regangan C=O yang merupakan kelompok ester dari asam lemak dan gugus ini tidak terdapat di SBW. Keuntungan dari metode FTIR, MIR, dan NIR adalah tidak memerlukan bahan pelarut.

Pada analisis spektroskopi metode FTIR-ATR dianggap paling efektif sebagai alat deteksi pemalsuan gelatin babi pada SBW karena tidak menggunakan bahan pelarut dan tidak membutuhkan persiapan sampel yang sulit sehingga analisis menjadi lebih cepat (Sulistiyani *et al.*, 2018). Diperjelas lagi oleh Hernandez *et al.*, (2011) bahwa FTIR-ATR merupakan metode yang sangat berguna untuk mendapatkan spektrum lemak. Analisis spektroskopi sering kali menggunakan bantuan dari analisis multivariat / kemometrik dikarenakan spektrum serapan dari molekul sampel mengalami tumpang tindih / pola yang hampir identik sehingga sulit untuk diinterpretasi secara langsung. Analisis multivariat / kemometrik ini berguna untuk mengevaluasi, mengolah, dan menerjemahkan sebagian besar data dengan prosedur matematika (Rafi M *et al.*, 2016).

Analisis kemometrik PCA dapat digunakan untuk mengidentifikasi persentase pemalsuan dalam sampel, reduksi data sehingga jumlah variabel yang tidak berkorelasi menjadi sejumlah kecil variabel berkorelasi, menentukan karakteristik hubungan sampel dan diklasifikasikan menjadi sekelompok karakteristik yang sama. Pada FTIR juga menggunakan interpretasi data LDA (*Linear Discriminant Analysis*) yang berperan dalam pengenalan klasifikasi dengan memaksimalkan penyebaran antar kelas sambil meminimalkan pemisahan kelas. Lalu SVM (*Support Vector Machine*) juga digunakan untuk memprediksi sumber material dan kemurnian SBW komersial sementara OCPLS (*One Class Partial Least Square*) untuk penilaian cepat keaslian atau tidaknya SBW

komersial (Guo *et al.*, 2018). HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) digunakan untuk menunjukkan hubungan intrinsik antara SBW murni dan pemalsu.



PLSR (*Partial Least Square Regression*) dikembangkan dengan akurasi prediksi yang tinggi. BPNN (*Back Propagation Neural Networks*) digunakan untuk mengidentifikasi murni dan tidaknya SBW (Huang *et al.*, 2019). Kemudian DD-SIMCA (*Data-Driven Soft Independent Modelling of Class Analogy*) merupakan pengembangan dari metode SIMCA yang terdiri dari dua langkah, pertama PCA dan kedua pada metode SD (*score distance*) dan OD (*orthogonal distance*). Pada MIR-ATR DD-SIMCA berguna untuk mengevaluasi sensitivitas model (Adenan *et al.*, 2019). Interpretasi data KNN (*K-nearest neighbors*) atau PLS pada metode NIR digunakan untuk membangun model kalibrasi kualitatif berdasarkan fitur spektral yang diekstraksi dan properti SBW untuk otentikasi SBW. GA (*Genetic Algorithm*) digunakan untuk memilih daerah panjang gelombang yang paling informatif dari data NIR besar. Lalu PCA berguna untuk mengekstrak fitur spektral dari data NIR yang dipilih. Kemudian PLSR digunakan untuk kalibrasi kuantitatif dalam menilai SBW. GA, PCA, dan KNN berguna untuk mengoptimalkan model kalibrasi yang baik untuk otentikasi SBW (Shi *et al.*, 2017).

4.2.2. Pengujian Gelatin Babi terhadap Marker yang Dideteksi oleh ELISA.

Pada pengujian metode ELISA marker yang biasa digunakan adalah pAb1, pAb2, pAb3 yang merupakan tiga urutan asam amino spesifik spesies babi dari rantai kolagen dengan LOD masing-masing 0,12, 0,10, 0,11 dan LOQ yaitu 0,56, 0,26, 0,45 secara berurutan (Tukiran *et al.*, 2015) sementara untuk metode ELISA menurut Tukiran *et al.*, (2016) memiliki LOD sebesar 0,05%. Berdasarkan spesifitas reaksi dan teknik produksinya antibodi terdiri dari dua varian yaitu Pab (Ab Poliklonal) dan Mab (Ab Monoklonal) yang nantinya akan bereaksi dengan Ag (Suryadi *et al.*, 2009).

Pada preparasi sampel dalam pengujian adulteran gelatin babi yang dilakukan pelet protein dilarutkan pada reagen *buffer* yaitu PBS Hal ini sesuai dengan Suryadi *et al.*, (2009) yang memaparkan bahwa larutan *buffer* yang sering digunakan adalah *buffer* fosfat (PBS), *buffer* karbonat dan *buffer* lainnya. Sementara untuk senyawa yang dipakai sebagai penghentian reaksi adalah BSA (*Bovine serum albumin*), OA (ovalbumin), asam sulfat, NaOH dan lainnya. Dalam penentuan akurasi pada metode ELISA 1 Tukiran *et al.*, (2016) ditentukan dari *recovery* (%) menurut Gonzalez & Herrador, (2007) rentang *recovery* yang baik berkisar antara 80-110% hal ini menandakan bahwa hasil yang diperoleh tidak masuk dalam rentang *recovery* yang baik karena hasil *recovery* pada metode ini adalah 62,8 – 125,4 %.

Menurut Tukiran *et al.*, (2015) mengatakan bahwa pAb2 merupakan antibodi terbaik dengan LOD dan LOQ masing-masing sebesar 0,10 dan 0,26. Pada Metode ELISA yang penulisnya sama maka akan dibandingkan dengan pelarut, konsentrasi terendah gelatin yang terdeteksi dan LOD yang digunakan, maka untuk metode dari ELISA 2 Tukiran *et al.*, (2015) ini dipilih karena untuk batas deteksi konsentrasi minimal lebih sensitif, dan pelarut yang digunakan juga lebih sedikit.

4.2.3. Pengujian Gelatin Babi terhadap Marker yang Dideteksi oleh PCR

Pengujian PCR melalui beberapa tahap yaitu pra-denaturasi DNA, denaturasi DNA, *annealing* (penempelan primer), *extension* (pemanjangan primer), *postextension* (pemantapan) (Budiarto, 2016). Berdasarkan Tabel 6 dapat dilihat pelarut yang digunakan yaitu kloroform, etanol, air ultra murni dan alkohol hal ini sesuai dengan Zilhada *et al.*, (2020) yang menyatakan bahwa kloroform yang merupakan pelarut organik dipakai untuk mengendapkan protein selain itu kloroform mempunyai sifat yang tidak mudah larut air. Pada alkohol juga berfungsi sebagai bahan untuk mengendapkan dengan cara menurunkan kelarutan dari asam nukleat. Etanol juga mempunyai fungsi yang sama hanya saja etanol bekerja untuk membuang air yang berikatan dengan DNA sehingga nantinya DNA akan mengendap.

Menurut Lee *et al.*, (2018) sensitivitas metode LAMP lebih tinggi daripada uji PCR karena sebanyak 10^{-8} DNA genom SBW diperlukan untuk deteksi sementara PCR memerlukan 10^{-3} mg DNA genom untuk pendeteksian. Hal ini diperjelas pula oleh Wilopo *et al.*, (2015) yang mengatakan bahwa validitas dan kesesuaian metode LAMP sangat baik, alat yang dibutuhkan sederhana, dan cara kerja cepat dibanding dengan uji PCR sehingga metode LAMP dipilih sebagai metode yang efektif dalam mendeteksi gelatin babi pada SBW.

4.2.4. Pengujian Gelatin Babi terhadap Marker yang Dideteksi oleh Beberapa Kombinasi Metode

Analisis dari metode kromatografi menggunakan marker peptida spesifik untuk mendeteksi keberadaan dari gelatin (Hameed *et al.*, 2018). Pada metode CSA komponen volatil yang dicari adalah 2,4-dimetilamfetamin (pada kulit babi). Keunggulan dari metode ini yaitu cepat dan tidak merusak sedangkan kekurangan yaitu beberapa sampel yang salah dalam pengklasifikasiannya dan sulit untuk menetapkan respon warna tertentu pada komponen volatil tertentu yang berbeda dengan komposisi pada alat analisis umumnya. Metode CSA juga memiliki *correlation coefficient* yaitu sebesar 0,88 yang mana lebih tinggi dari nilai kalibrasi dan validasi (Huang *et al.*, 2019).

Metode spektrometri massa tandem Nano LC-QTRAP-MS/MS dipilih menjadi metode yang efektif karena dapat mengukur beberapa analitik secara bersamaan, analisis berupa multikomponen dalam tahap preparasi sampel matriks biologis sehingga biaya lebih hemat, dan persiapan sampel dapat disederhanakan dengan ekstraksi atau pengendapan protein. Sementara gas kromatografi yang ada pada metode CSA persiapan sampel membutuhkan waktu dan biaya untuk derivatisasi (ekstraksi fase padat) karena senyawa yang digunakan harus mudah menguap supaya bisa dianalisis (Kade Harmita *et al.*, 2019). Pada metode spektrometri massa tandem juga memiliki nilai *recovery* berkisar 92.06–112.04% yang mana sedikit melebihi batas *recovery* yang baik yaitu antara 80-110% (Gonzalez & Herrador., 2007).

Fase gerak yang digunakan pada metode ini yaitu asetonitril dalam air dan asam format dengan waktu retensi sebesar 12,5 menit. Menurut Kade Harmita *et al.*, (2019) pada pembersihan kolom asetonitril yang bersifat nonpolar berguna untuk membersihkan kolom dari cecaran. Waktu retensi dapat ditentukan dari selang waktu yang dibutuhkan sampel mulai dari injeksi hingga terdeteksi pada detektor. Faktor yang mempengaruhi waktu retensi adalah laju alir, fase gerak, tekanan kolom, dan sifat dari

sampel. Apabila laju alir tinggi maka waktu retensi akan semakin singkat begitu pula sebaliknya.

