

Indonesia merupakan negara dengan mayoritas penduduk muslim sehingga potensi pasar halal di Indonesia sangat besar, selain itu juga didukung dengan meningkatnya kesadaran masyarakat muslim untuk mengonsumsi dan menggunakan produk halal. Di sisi lain, pemerintah Indonesia telah mengesahkan UU Nomor 33 tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal yang mewajibkan semua produk yang diklaim halal dan beredar di Indonesia wajib bersertifikat halal.

Berbagai penelitian terkait halal telah banyak dilakukan. Malaysia dan Indonesia merupakan negara yang menghasilkan publikasi terkait halal tertinggi berdasarkan data Scopus. Di sisi lain, UK, USA, dan Australia menempati posisi ke-3, 4, dan 5 yang menunjukkan bahwa halal sudah menjadi isu global sehingga menjadi daya tarik bagi negara-negara dengan mayoritas penduduk non-muslim.

Buku ini mengulas halal dari konsep *maqashid syari'ah* yang merujuk pada tujuan disyariatkannya suatu hukum. Konsep makanan yang halal-tayyib terkait erat dengan keamanan makanan sehingga perlu diulas kaitannya dengan konsep *Hazard Analysis Critical Control Points* (HACCP). Sistem jaminan halal-tayyib memastikan bahwa pada rantai produksi makanan, makanan harus terbebas dari bahan yang diharamkan dan bahan yang najis. Selama proses produksi, dilakukan evaluasi titik kritis mulai dari bahan baku sampai ke produk akhirnya, termasuk di dalamnya penggunaan bahan tambahan makanan (BTM).

Metode analisis kehalalan suatu produk makanan dan sediaan farmasi sangat penting untuk dikembangkan. Pengembangan metode analisis yang cepat, akurat, valid, dan sahih sangat penting karena metode ini harus dapat mendeteksi kontaminasi bahan non halal sekecil apa pun. Pada buku ini akan dibahas metode analisis kehalalan dengan *differential scanning calorimetry*, spektroskopi inframerah, kromatografi gas, *high performance liquid chromatography* (HPLC), LC-MS/MS based *metabolomics*, dan *polymerase chain reaction* (PCR). Berbagai metode yang dikembangkan ini masing-masing memiliki kelebihan dan kelemahan, untuk itu peneliti dapat memilih metode yang paling cocok untuk digunakan.




PUSTAKA PELAJAR
Penerbit Pustaka Pelajar
Celeban Timur UH III/548 Yogyakarta 55167
Telp. (0274) 381542, Faks. (0274) 383083
e-mail: pustakapelajar@yahoo.com
website: pustakapelajar.co.id



Editor: • Dr. Lily Arsanti Lestari • Prof. Ir. Yuny Erwanto
• Prof. Dr. Abdul Rohman

FALSAFAH SAINS HALAL

Editor:

• Dr. Lily Arsanti Lestari • Prof. Ir. Yuny Erwanto
• Prof. Dr. Abdul Rohman

FALSAFAH SAINS HALAL



PUSTAKA PELAJAR

**FALSAFAH
SAINS
HALAL**

Editor:

- Dr. Lily Arsanti Lestari • Prof. Ir. Yuny Erwanto
- Prof. Dr. Abdul Rohman

FALSAFAH SAINS HALAL



PUSTAKA PELAJAR

FALSAFAH SAINS HALAL

Cetakan Pertama • **Februari 2023**

Editor • **Dr. Lily Arsanti Lestari, STP., MP.**
Prof. Ir. Yuny Erwanto, S.Pt., MP., PhD., IPM.
Prof. Dr. Abdul Rohman, M.Si., Apt.

Perwajahan Buku • **Jendro**
Pemeriksa Aksara • **Risty**
Sampul Depan • **Riyanto**
Pracetak • **Riyanto**

Diterbitkan oleh

PUSTAKA PELAJAR

Celeban Timur UH III/548 Yogyakarta 55167

Telp. [0274] 381542 Faks. [0274] 383083

E-mail: pustakapelajar@yahoo.com

Website: pustakapelajar.co.id

ISBN: **978-623-236-342-7**

Prakata

Assalamu'alaikum wr. wb.

Pertama-tama marilah kita panjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT karena atas rahmat dan hidayahnya, buku Falsafah Sains Halal ini telah tersusun dengan baik. Buku ini telah diinisiasi penyusunannya oleh Pusat Unggulan Iptek Perguruan Tinggi *Institute for Halal Industry & System* (PUIPT IHIS), Universitas Gadjah Mada atas kerjasama beberapa penulis baik dari UGM maupun dari universitas lain serta institusi riset seperti BRIN dll yang memberikan kontribusi di beberapa Bab.

Halal diharapkan menjadi bagian dari gaya hidup, terlebih karena mayoritas penduduk di Indonesia adalah muslim, sehingga tuntutan akan makanan yang *halalan thayyiban* semakin tinggi. Hal ini didukung oleh adanya Undang-undang Jaminan Produk Halal (UU-JPH) Nomor 33 tahun 2014 tentang tentang Jaminan Produk Halal. Deteksi akan kehalalan suatu produk makanan dan farmasetik sangat penting untuk dikembangkan. Pada buku ini diulas beberapa topik terkait teori halal dan metode deteksi halal antara lain: 1) *maqashid* al-qur'an dalam kehalalan produk; 2) sistem jaminan halal dan *hazard analysis critical and control points* (HACCP) titik kritis kehalalan produk; 3) bahan halal dalam pengolahan makanan dan aditif makanan; 4) analisis derivat babi dengan *differential scanning calorimeter*, kromatografi gas, *high performace liquid chromatography* (HPLC), *polymerase chain reaction* (PCR), serta analisis kehalalan produk dengan spektroskopi inframerah. Besar harapan kami agar buku ini dapat memberikan manfaat bagi para pembaca dan dapat

menjadi referensi untuk berbagai topik penelitian terkait halal.

Kami mengucapkan terima kasih kepada para penulis yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk mendukung penulisan buku ini. Kami menyadari bahwa Edisi 1 Buku Falsafah Sains Halal ini masih terdapat kekurangan, untuk itu masukan dari para pembaca akan dapat memperkaya pengembangan buku di edisi-edisi berikutnya.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Tim Editor

Daftar Isi

Prakata _____ **v**

Daftar Isi _____ **vii**

BAB I

PENGANTAR SAINS HALAL _____ **1**

- A. Pendahuluan _____ 1
- B. Halal dari perspektif Sains _____ 2
- C. Kandungan Buku Sains Halal _____ 5

BAB II

MAQASHID AL-QUR'AN DALAM KEHALALAN PRODUK _____ **15**

- A. Pendahuluan _____ 15
- B. Antara Maqashid al-Qur'an dengan Maqashid al-Syari'ah _____ 21
- C. Identifikasi Ayat-Ayat tentang Halal dan Haram _____ 25
- D. Konsep Makanan Halal dan Haram dalam al-Qur'an _____ 28
- E. Konsep dan Urgensi Kehalalan Produk _____ 32
- F. Maqashid al-Qur'an dan Syariah dalam Kehalalan Produk _____ 35

BAB III

SISTEM JAMINAN HALAL DAN HAZARD ANALYSIS CRITICAL CONTROL POINTS (HACCP) _____ **45**

- A. Pendahuluan _____ 45
- B. Keamanan Pangan _____ 46

- C. Konsep Keamanan Pangan dalam Islam_____47
- D. *Hazard Analysis Critical and Control Points (HACCP)* _____57
- E. Sistem Jaminan Halal (SJH) _____63
- F. Sinergi SJH dengan HACCP_____67

BAB IV

TITIK KRITIS KEHALALAN PRODUK_____77

- A. Pendahuluan_____77
- B. Titik Kritis Kehalalan Produk Hewani dan Turunannya_____79
- C. Titik Kritis Kehalalan Produk Nabati dan Turunannya_____83
- D. Titik Kritis Kehalalan Produk Mikrobial_____87
- E. Titik Kritis Produk Bioteknologi_____91
- F. Titik Kritis Enzim_____93
- G. Titik Kritis Kehalalan Produk Lain-Lain_____9⁵

BAB V

BAHAN HALAL DALAM PENGOLAHAN MAKANAN DAN ADITIF MAKANAN_____105

- A. Pengantar_____105
- B. Definisi Aditif Makanan_____107
- C. Kelompok BTP Makanan_____109
- D. Legislasi terkait Aditif Makanan_____112
- E. Kesepakatan Penggunaan *E-code* di Indonesia____114
- F. Tinjauan Singkat Kehalalan dalam Aditif Makanan_____120
- G. Titik Kritis Halal Aditif Makanan_____123
- H. Teknologi Baru dalam Pengolahan Menggunakan Bahan Tambahan Pangan_____125

- I. Teknologi dalam Penggunaan BTP_____126
- J. Fungsi Fisiologis Penggunaan BTP_____127
- K. Bahan baku Sumber BTP_____129
- L. Penggunaan BTP pada Jenis Produk_____130
- M. Bahan Makanan yang menggunakan BTP_____133
- N. Kesimpulan_____133

BAB VI

ANALISIS DERIVAT BABI DENGAN *DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETER* _____ 139

- A. Pendahuluan_____139
- B. Sistem Instrumentasi_____141
- C. Kalibrasi Instrumen DSC_____146
- D. Penyiapan Sampel_____146
- E. Analisis Derivat Babi dengan DSC_____148

BAB VII

ANALISIS KEHALALAN PRODUK DENGAN SPEKTROSKOPI INFRAMERAH _____ 167

- A. Pendahuluan_____167
- B. Sistem Instrumentasi Spektrofotometer
Inframerah_____169
- C. Analisis Derivat Babi dengan Spektroskopi
Inframerah_____172

BAB VIII

ANALISIS DERIVAT BABI SECARA KROMATOGRAFI GAS _____ 217

- A. Pendahuluan_____217
- B. Analisis Derivat babi dengan Kromatografi Gas_____218

BAB IX

ANALISIS KEHALALAN PRODUK DENGAN HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) _____ 245

- A. Pendahuluan _____ 245
- B. Prinsip Pemisahan dan Sistem Instrumentasi HPLC _____ 247
- C. Analisis Halal Menggunakan HPLC _____ 250
- D. Kombinasi Metode HPLC dan Kemometrik untuk Analisis Halal _____ 268

BAB X

ANALISIS KEHALALAN PRODUK DENGAN LC-MS/MS _____ 281

- A. Pendahuluan _____ 281
- B. Sistem Instrumentasi LC-MS/MS _____ 283
- C. Analisis Daging Babi dengan Menggunakan LC-MS/MS *Based Metabolomics* _____ 285

BAB XI

ANALISIS DERIVAT BABI DENGAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) _____ 293

- A. Pendahuluan _____ 293
- B. Prinsip dan Prosedur PCR _____ 295
- C. Proses Amplifikasi _____ 298
- D. Desain Primer _____ 306
- E. *Real-time Polymerase chain reaction* (RT-PCR atau q-PCR) _____ 312
- F. Kuantifikasi Metode *Real-Time* PCR _____ 335
- G. Aplikasi PCR dan qPCR untuk Analisis Kehalalan Produk _____ 337

Biografi _____ 377

BAB I

PENGANTAR SAINS HALAL

Lily Arsanti Lestari, Yuny Erwanto dan Abdul Rohman

Pusat Unggulan Ipteks Perguruan Tinggi,
Institute of Halal Industry and Systems

Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

A. Pendahuluan

Indonesia adalah negara dengan penduduk Muslim terbesar di dunia, dan hal ini tentunya berkaitan erat dengan konsumsi produk halal bagi masyarakat Indonesia seiring dengan meningkatnya kesadaran komunitas Muslim untuk mengonsumsi dan menggunakan produk yang Halal. Hal ini mendorong Pemerintah Indonesia untuk mengharuskan semua produk yang diklaim halal yang beredar di Indonesia dan diperdagangkan di wilayah Negara Kesatuan Republik Indonesia harus disertifikasi Halal oleh pihak yang berwenang sebagaimana amanat Undang-Undang Jaminan Produk Halal (UU-JPH) Nomer 33 tahun 2014. Kehalalan produk makanan, minuman, kosmetika, obat, barang gunaan lainnya merupakan hal yang sangat ditekankan dalam Syariah Islam. Perintah mengonsumsi produk halal dan tayyib dalam al-Qur‘ân dalam surat Al-Baqarah ayat 186 yang artinya “*Hai sekalian manusia, makanlah yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi. Janganlah mengikuti langkah-langkah setan karena setan adalah musuh yang nyata bagimu*” menjadi dasar hukum bagi setiap muslim untuk memperhatikan dan memilih produk halal (Aziz, 2017).

Halal adalah istilah yang berasal dari Bahasa Arab yang secara Bahasa bermakna terlepas (*halla-yahillu-halalan*). Secara istilah halal adalah sesuatu yang jika dilakukan atau dikonsumsi terbebas

atau tidak terikat dengan ketentuan yang melarangnya, atau bisa juga diartikan sebagai segala sesuatu yang boleh dilakukan sesuai dengan syaria'ah (hukum) islam. Dalam konteks pangan dan farmasetik, makanan dan sediaan farmasi halal adalah makanan dan sediaan farmasi yang boleh dikonsumsi jika itu merupakan makanan/minuman atau boleh digunakan jika berupa bahan gunaan seperti pakaian dan sepatu, boleh diproduksi dan dikomersialkan. Konsep halal berasal dari Alquran dan hadits Nabi Muhammad s.a.w yang dapat dimaknai sebagai hal atau produk yang diperbolehkan, sesuai dengan aturan hukum Syariah Islam dan tidak ada larangan dalam hukum Islam (Akhtar et al., 2020).

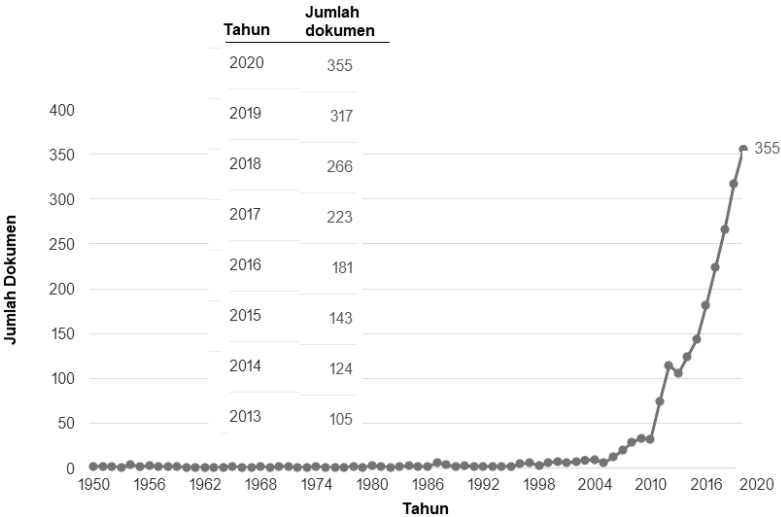
B. Halal dari perspektif Sains

Halal minimal dapat ditinjau dari 3 perspektif, yakni agama, ekonomi dan ilmu pengetahuan (Rohman, 2015). Dari sudut pandang agama, setiap orang (baik Muslim atau nonmuslim) diperintah oleh Allah SWT untuk memakan makanan yang halal dan *toyyib*, sebagaimana dalam Surat Al-Baqarah ayat 168 di atas dan juga mendasarkan pada perintah-perintah yang terkait dengan makanan halal dalam hadits nabi Muhammad s.a.w. Dari sisi ekonomi, perdagangan produk halal di dunia meningkat secara tajam, seiring dengan meningkatnya kesadaran umat Islam untuk menggunakan produk-produk halal. Pasar makanan dan minuman halal secara global diprediksi terus tumbuh, bahkan pertumbuhannya terjadi secara ekponensial seiring dengan kesadaran orang Islam untuk bergaya hidup halal dan mengonsumsi produk halal. Karenanya banyak studi dilakukan baik secara global maupun regional terkait dengan perkembangan pasar produk halal ini sebagaimana studi yang dilakukan di Kawasan Eropa (Lever & Miele, 2012) atau di Negera Jepang (Yusof & Shutto, 2014).

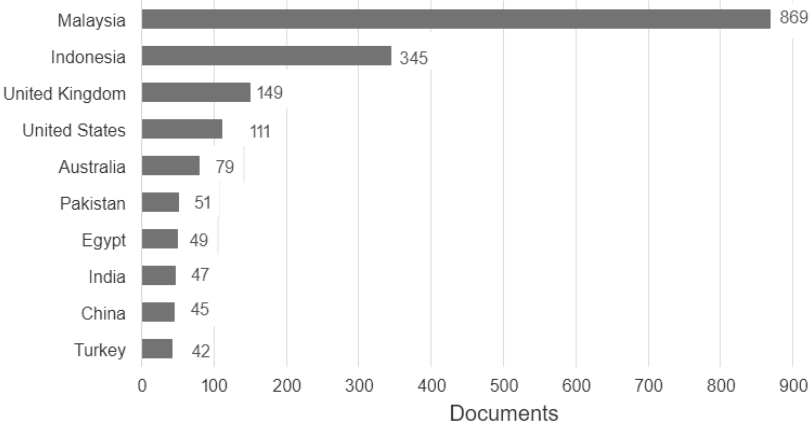
Dari sisi ilmu pengetahuan, isu-isu yang terkait dengan halal selalu menarik untuk diteliti. Mengutip pendapat dari Prof. Dr. Ahmed Zewail, seorang ilmuwan Mesir dan professor di California Institute of Technology, yang menyatakan bahwa “*peneliti Muslim hendaknya memfokuskan penelitiannya pada hal-hal yang oleh peneliti Barat tidak difikirkannya*”, maka kami sangat tertarik untuk mengembangkan metode analisis fisika-kimia dan biologi molekuler untuk analisis komponen nonhalal ini. Aspek analisis kehalalan produk tidak terpikirkan atau tidak menarik bagi peneliti barat, karena hal ini tidak terkait langsung dengan kepentingan mereka, sehingga menjadi keuntungan tersendiri, karena hasil-hasil penelitian yang terkait dengan halal ini menarik untuk dipublikasikan ke jurnal-jurnal yang bereputasi. Berbagai penelitian dengan tentang topik seputar halal mulai dari penjaminan mutu kehalalan bahan baku, pencarian bahan baku alternatif, sampai ke sistem pariwisata halal telah dilakukan (Mostafa, 2020).

Dari penelusuran data di database Scopus (Desember 2020), dengan menggunakan kata kunci pencarian “halal” terdapat sekitar 2100-an artikel di *primary document* dan sekitar 5300-an dokumen di *secondary document*, yang terkait dengan semua aspek halal seperti sertifikasi halal dan autentikasi produk halal. Dilihat dari jumlah publikasi (dokumen), terdapat peningkatan yang signifikan dari tahun ke tahun, bahkan peningkatannya terjadi secara eksponensial (Gambar 1.1). Dilihat dari negara yang menghasilkan publikasi dalam bidang Halal, Malaysia dan Indonesia menempati peringkat pertama dan kedua yang mana peneliti-peneliti di kedua negara tersebut mempublikasikan artikelnya di jurnal-jurnal terindeks Scopus, baik dalam bentuk *original article* atau dalam bentuk *review article* (Gambar 1.2). Hal ini tidak mengagetkan karena kedua negara tersebut mayoritas penduduknya adalah Muslim. Sementara itu di posisi ketiga, keempat dan kelima adalah United Kingdom, Amerika

serikat dan Australia yang merupakan negara yang penduduk mayoritasnya adalah non-Muslim. Sekali lagi ini menunjukkan bahwa isu-isu dan riset-riset yang terkait dengan halal sudah menjadi isu global, yang tidak didominasi oleh negara-negara Muslim.



Gambar 1.1. Jumlah publikasi yang terkait dengan topik halal yang diambil dari Scopus pada bulan Desember 2020.



Gambar 1.2. Jumlah publikasi yang terkait dengan topik halal (berdasarkan negara) yang diambil dari Scopus pada bulan Desember 2020.

C. Kandungan Buku Sains Halal

Halal adalah suatu istilah yang familier untuk difahami, baik oleh orang Islam atau Non-muslim. Topik-topik yang terkait halal bersifat multidisiplin, yang dapat didekati dari semua bidang ilmu. Beberapa pendapat ulama' terkait dengan halal baik terkait dengan sisi Bahasa dan sisi istilah sebagaimana dikutip dari (Ali, 2016) adalah sebagai berikut: Abû Muhammad al-Husayn ibn Mas'ûd al-Baghawî dari mazhab Syafi'i, berpendapat bahwa kata "halâl" berarti sesuatu yang dibolehkan oleh syariat karena baik. Imam Muhammad ibn 'Ali al-Syawkânî berpendapat bahwa sesuatu itu dinyatakan sebagai halal karena telah terurainya simpul tali atau ikatan larangan yang mencegah. Imam Yusuf al-Qaradhawî, mendefinisikan halal sebagai sesuatu yang dengannya terurailah *buhul* yang membahayakan, dan Allah memperbolehkan untuk dikerjakan, sementara Imam 'Abd al-Rahmân ibn Nâshir ibn al-Sa'dî' mendefinisikan kata "halâl" terkait dengan bagaimana memperolehnya, bukan dengan cara *ghashab* (meminjam tanpa izin), mencuri, dan bukan sebagai hasil muamalah yang haram atau berbentuk haram. Dari definisi ini, menurut Ali (2006), halal adalah sesuatu yang diperbolehkan oleh syariat untuk (1) dilakukan, (2) digunakan, atau (3) diusahakan, karena telah terurai tali atau ikatan yang mencegahnya atau unsur yang membahayakannya dengan disertai perhatian cara memperolehnya, bukan dengan hasil muamalah yang dilarang.

Segala sesuatu yang dihalalkan atau diharamkan dapat dikaitkan dengan maksud dan tujuan diharamkan atau dihalalkannya sesuatu tersebut, sebagaimana dalam konsep *maqashid syari'ah*. *Maqosid Syariah* merujuk pada tujuan disyariatkannya suatu hukum yang meliputi untuk menjaga agama (*hifdhu al-din*), menjaga akal (*hifdhu al-aql*), menjaga jiwa (*hifdhu al-nafs*), menjaga harta (*hifdhu al-mal*) dan menjaga keturunan (*hifdhu annasl*). Diharamkannya daging babi dapat dikaitkan dengan menjaga jiwa (*hifdhu*

annafs) manusia, karena daging babi dilaporkan mengandung cacing pita yang dapat membahayakan kesehatan manusia. Selain itu diharamkannya khamr (minuman keras) karena minuman keras dapat menghilangkan akal, dan ini dapat dikaitkan dengan tujuan disyariatkannya minuman keras untuk menjaga akal. Menurut Rasyid Ridha, sebagaimana dikutip dari (Yanggo, 2013), Allah mengharamkan bangkai hewan yang mati dengan sendirinya karena berbahaya bagi kesehatan. Hewan mati dengan sendirinya, tidak mati melainkan disebabkan oleh penyakit. Darah diharamkan, karena darah itu adalah tempat yang paling baik untuk pertumbuhan bakteri-bakteri. *Maqosid syari'ah* dalam kaitannya dihalalkan dan diharamkannya makanan, minuman, obat dan lainnya akan diuraikan dalam Bab 2.

Konsep makanan atau produk yang halal dalam beberapa ayat Alqur'an digabungkan dengan *tayyib*, sehingga muncul gabungan keduanya *halalan-tayyiban*, sebagaimana dalam surat Al-Baqarah ayat 168, Al-Maidah ayat 88, An-Nahl ayat 114, dan Thaha ayat 81. Istilah *tayyib* (baik, bergizi) dapat dilihat dari sisi kemanfaatannya, yaitu bermanfaat bagi tubuh, mengandung nutrisi yang diperlukan oleh tubuh, bergizi dengan kandungan vitamin, protein dan lain-lain yang sesuai dengan kebutuhan tubuh seseorang. *Tayyib* juga berkaitan dengan *safety* (keamanan) produk makanan, yaitu makanan yang tidak baik dan tidak aman, atau makanan yang diharamkan, jika dikonsumsi akan merusak kesehatan, seperti memakan makanan yang sudah kadaluarsa, mengandung formalin, atau mengandung racun dan lain-lain. *Tayyib* juga dikaitkan dengan bebasnya makanan dari bahan-bahan yang membahayakan, karenanya selama produksi makanan, industri harus menerapkan HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Points*) (Neio Demirci et al., 2016). Konsep HACCP merupakan pendekatan sistematis untuk melakukan identifikasi bahan-bahan yang berbahaya, asesmen resiko

dan juga pengendalian bahan-bahan yang berbahaya. Secara umum, sistem ini diaplikasikan sebagai upaya preventif (pencegahan) untuk terpapar produk-produk makanan yang tidak *tayyib* dengan memastikan bahwa rantai produksi, mulai dari pemilihan bahan baku, pengadaan bahan baku dan sampai siap dikonsumsi, dipantau dan dipastikan mutunya (Kohilavani et al., 2013). Keterkaitan antara prinsip *halalan-tayyiban* dan HACCP ini akan diuraikan di Bab 3.

Sistem jaminan halal-tayyib memastikan bahwa rantai produksi makanan mulai dari *raw materials* (bahan baku) sampai di meja makanan terbebas dari bahan yang diharamkan dan bahan yang najis. Inilah yang dikenal dengan ungkapan “*from farm to fork*” (mulai dari ladang bahan baku sampai ke garpu untuk makan) harus dipastikan halal, *tayyib* dan bebas najis. Konsep produksi makanan *from farm to fork* secara umum bermakna bahwa pemrosesan bahan baku dari sektor primer (pertanian, laut) menjadi produk makanan yang diolah di industri makanan telah memenuhi keinginan konsumen (dalam hal ini adalah halal, *tayyib*/higienis) (Nusantoro, 2018). Selama proses produksi, dilakukan evaluasi titik kritis mulai dari bahan baku sampai ke produk akhirnya. Sebagai contoh evaluasinya adalah apakah bahan baku berasal dari hewan atau tanaman, dan jika berasal dari hewan apakah hewannya merupakan hewan yang daging/bagian lainnya haram dikonsumsi seperti babi atau berasal dari hewan yang halal dikonsumsi, dan seterusnya (Paredi et al., 2013). Titik kritis kehalalan produk makanan dijelaskan secara rinci dalam Bab 4.

Dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, produk makanan ditambah dengan berbagai bahan tambahan makanan (BTM) dengan fungsi tertentu seperti pengawet, pemanis, pewarna, emulsifier, penstabil makanan dan lainnya. BTM ini berfungsi untuk memastikan produk makanan tetap aman, meningkatkan kesegaran dan keamanan produk makanan, meningkatkan fungsionalitas pro-

duk makanan, meningkatkan waktu simpan produk makanan, menjaga nilai-nilai nutrisi, serta menjaga kualitas makanan (Al-Teinaz, 2020). Bahan-bahan tambahan ini dapat berasal atau disintesis dari bahan yang kehalalannya diragukan, oleh karena pemahaman terkait dengan status kehalalan bahan tambahan makanan mutlak diperlukan. Adanya bahan tambahan makanan juga menjadi salah satu titik kritis kehalalan produk yang harus dipastikan asal bahannya (Fermanto & Sholahuddin, 2020). Pembahasan tentang BTM akan diuraikan secara rinci dalam Bab 5.

Semua produk, termasuk produk makanan, minuman, obat, kosmetika dan juga barang gunaan seperti sepatu dan gas yang diklaim halal harus bersertifikat halal sebagaimana amanat pasal 4 Undang-Undang Jaminan Produk halal Nomer 33 Tahun 2014 yang berbunyi “*Produk yang masuk, beredar, dan diperdagangkan di wilayah Indonesia wajib bersertifikat halal*” (Anonim, 2014). Sertifikasi halal digunakan untuk memastikan bahwa siklus produk mulai dari sifat bahan yang digunakan, asal bahan, dan metode pemrosesan sesuai dengan kaidah-kaidah kehalalan suatu produk. Beberapa negara telah menerapkan standar sertifikasi untuk memastikan produk sesuai standar halal dengan menggunakan label dan simbol tertentu (van der Spiegel et al., 2012). Dalam Standar Malaysia yang terkait dengan produk halal (makanan, obat atau kosmetika), produk halal adalah produk yang mengandung komponen-komponen yang diizinkan oleh hukum syaria’ah dan memenuhi kondisi-kondisi berikut:

- Tidak mengandung bagian apapun atau produk apapun yang berasal dari hewan yang non-halal menurut hukum syaria’ah atau mengandung komponen apapun yang berasal dari hewan yang disembelih tidak sesuai dengan aturan syaria’ah
- Tidak mengandung najis sesuai dengan hukum syaria’ah

- Aman untuk dikonsumsi, tidak beracun, tidak toksik atau membahayakan bagi kesehatan sesuai dengan hukum syariah
- Tidak disiapkan, diproses atau diproduksi dengan peralatan yang terkontaminasi dengan najis sesuai dengan hukum syariah
- Tidak mengandung bagian apapun dari tubuh manusia yang tidak diperbolehkan sesuai dengan aturan syara'
- Selama proses pembuatan, pemrosesan, penanganan, pengemasan, penyimpanan, dan distribusi, produk tersebut terpisah secara fisik dengan produk-produk yang tidak memenuhi syarat produk halal di atas.

Every ounce of Pig 05049 was used, helping create an astonishing 185 products. Here are some of the more surprising uses for the animal - and a diagram to show just which bit of the beast, from the trotter to the snout, is used where...

1 Chemical weapons testing: Because of the pig's similarity to human tissue

2 Ice cream: Gelatine regulates the sugar crystallisation and slows down the melting process

3 Fertiliser: Made from processed pig hair

4 Low fat butter: Gelatine used for texture

5 Beer: Gelatine used as a clarifying agent. Reacts with bitter substances and tannins to absorb cloudy elements, leaving clear drinks

6 Fabric softener: Fatty acids from bone fat give colour

7 Paint brush: Made from pig hair

8 Fruit juice: Gelatine absorbs cloudy elements to give clear drinks

9 Shampoo: Fatty acids from bone fat are used to give them a pearl-like appearance

10 Candle: Fatty acids from bone fat are used to stiffen the wax and raise the candle's melting point

11 Bread: Protein from pig hair is used to soften dough

12 Bullet: Bone gelatine used to help transport the gunpowder or cordite into the casing

13 Medicine tablets: Gelatine is used in the shell to give it hardness

14 Washing powder: Fatty acids from bone fat harden the substance

15 Paint: Fatty acids from bone fat increase gloss

16 Tambourine: Made from the pig's bladder

17 Wine: Gelatine absorbs cloudy elements to give clear drinks

18 Paper: Bone gelatine is used to improve stiffness and reduce moisture

19 Heparin: Used to stop the formation of blood clots, it's taken from the mucus in the intestines

20 Soap: Fatty acids from bone fat act as a hardening agent and give colour

21 Corks: Bone gelatine is used as a binder

22 Insulin: Taken from the pancreas, as closest to human in chemical structure

23 Yoghurt: Pig bone calcium is used in some yoghurts

24 Cigarettes: Haemoglobin from the blood used in cigarette fillers to create an artificial lung that supposedly lessens harmful chemicals reaching the smoker

25 Photographic film: Bone gelatine acts as a bonding agent on the film sheet

26 Dog food treat: Haemoglobin used as a red colouring agent

27 Photodynamic therapy: Haemoglobin used in drug to treat retina decay in the eye. Drug is activated by shining laser into eye

28 Moisturisers: Fatty acids from bone fat used

29 Dog snack: Deep fried pig nose

30 Crayons: Fatty acids are used as a hardening agent

31 Shoes: Bone glue is used to improve the texture and quality of the leather

32 Train brakes: Bone ash used in production

33 Toothpaste: Glycerine from bone fat is used to give toothpaste texture

34 Hide glue: A strong glue used in the woodworking industry derived from collagen

35 Face mask: With collagen to help reduce wrinkles and lines

36 Alternative energy: Waste products used as fuel to produce electricity

37 Energy bar: Treated collagen is cheap source of protein for body builders

38 Cream cheese: Gelatine used to make it stable

39 Whipped cream: Gelatine gives texture

40 Sweets: Porcine gelatine used as a binding and gelling agent and to ensure the right texture is found in the following: liquorice, wine gums, chewing gum

Gambar 1.3. Berbagai produk yang dapat diproduksi dengan menggunakan komponen-komponen yang berasal dari babi. Gambar diambil dari Prof. Dr. Yaakob Che Man, dalam mata kuliah Falsafah Sains Halal, Institut Penyelidikan Produk Halal, Universiti Putra Malaysia, 2008.

Di antara komponen non-halal yang sering dijumpai dalam produk makanan, obat dan kosmetik, komponen non-halal yang berasal dari babi adalah yang paling banyak sebagaimana dalam Gambar 1.3. Sebagai contoh, kolagen babi (nomer 35 dalam Gambar 1.3) dapat digunakan dalam sediaan kosmetika untuk mengurangi kerutan.

Produk makanan, obat dan kosmetika selama proses produksi dapat mengandung atau terkontaminasi dengan komponen non-halal seperti lemak babi, daging babi, gelatin babi atau alkohol. Karenanya diperlukan suatu autentikasi kehalalan produk. Metode analisis apapun yang digunakan harus telah divalidasi dan menunjukkan karakteristik kinerja yang dipersyaratkan dan sesuai dengan peruntukannya. Metode yang telah divalidasi ini dapat diaplikasikan untuk analisis kehalalan produk sesuai dengan ruang lingkungannya. Diantara metode yang banyak digunakan untuk analisis adalah *differential scanning calorimetry* (DSC), spektroskopi inframerah dan metode kromatografi yang dikombinasikan dengan kemometrika untuk analisis lemak babi. DSC banyak digunakan untuk analisis kelompok lipid, sehingga dalam Bab 6 akan diuraikan tentang DSC yang digunakan untuk analisis autentikasi halal. Metode spektroskopi merupakan metode analisis yang banyak dilaporkan di berbagai publikasi ilmiah. Semua jenis spektroskopi melibatkan interaksi antara sampel dengan radiasi elektromagnetik (REM) di daerah inframerah (IR). Metode spektroskopi IR untuk analisis derivat babi merupakan teknik analisis yang tidak merusak (*non-destructive*), yang bermakna bahwa sampel yang dianalisis dengan spektroskopi IR dapat dianalisis dengan metode yang lain, sekiranya jumlah sampel sedikit, sensitif, serta tidak melibatkan penyiapan sampel yang rumit. Dibandingkan dengan teknik analisis yang lain seperti kromatografi yang mengidentifikasi komponen yang terdapat dalam turunan babi (misalkan analisis asam lemak dengan kromatografi gas dan

analisis komposisi triasilgliserol dengan kromatografi cair kinerja tinggi), spektroskopi IR telah diidentifikasi sebagai teknik yang ideal karena menganalisis turunan babi sebagai satu kesatuan materi (Rohman, 2017) (Rohman, 2019). Penggunaan spektroskopi inframerah yang dikombinasikan dengan kemometrika ini akan diuraikan di Bab 7.

Disebabkan karena daya pemisahannya yang *powerful* dan juga dapat memberikan informasi kualitatif dan kuantitatif, berbagai teknik kromatografi telah digunakan untuk analisis autentikasi halal. Kromatografi gas dengan dengan detektor ionisasi nyala atau dengan detektor spectrometer massa, yang mana gabungan antara kromatografi gas-spektrometer massa dikenal dengan GC-MS, merupakan metode standar yang digunakan untuk analisis profil asam lemak dalam lemak babi. Asam lemak yang menyusun lemak babi dan lemak serta minyak lain bersifat sidik jari, dalam artian tidak ada dua minyak yang mempunyai jenis dan komposisi asam lemak yang sama sehingga asam lemak tertentu dapat dijadikan sebagai marker dalam analisis keberadaan lemak babi (Rohman & Che Man, 2012). Dikombinasikan dengan kemometrika, respon dari kromatografi gas dapat digunakan sebagai informasi kualitatif dan kuantitatif lemak babi dalam berbagai produk makanan. Penggunaan kromatografi gas yang dikombinasikan dengan kemometrika dijelaskan pada Bab 8.

Beberapa *derivate* babi seperti daging babi dan gelatin babi dianalisis dengan menggunakan kromatografi cair ataupun kromatografi cair yang dikombinasikan dengan spektrometer massa (LC-MS). Analisis daging babi dianalisis melalui identifikasi protein ataupun melalui analisis komposisi triasilgliserolnya. Sementara dengan LC-MS dapat diperoleh suatu peptida *marker* (peptida penanda) yang spesifik untuk babi sehingga metode ini sesuai untuk melakukan identifikasi gelatin babi. Bab 9 akan membahas secara rinci

tentang penggunaan kromatografi cair untuk analisis derivat babi. Sementara Bab 10 akan menguraikan *high resolution liquid chromatography mass spectrometry* (HR LC-MS) untuk analisis *derivate* babi melalui pendekatan metabolomik dan lipidomik (Windarsih et al., 2022).

Analisis berbasis DNA seperti *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan metode pilihan untuk identifikasi spesies hewan karena metode ini menawarkan spesifisitas dalam identifikasi sehingga menjadi metode standar untuk identifikasi dan konfirmasi (Kumar et al., 2015). PCR dan teknik-teknik pengembangannya seperti *real-time* PCR merupakan metode pilihan untuk analisis DNA babi dalam daging dan dalam makanan-makanan yang berbasis daging. Metode ini secara luas diaplikasikan untuk analisis daging babi dan daging haram lainnya seperti daging celeng, daging anjing ataupun daging tikus (Ali et al., 2012). Metode PCR untuk analisis DNA ini akan diuraikan dalam Bab 11.

Referensi

- Akhtar, N., Jin, S., Alvi, T.H. & Siddiqi, U.I., 2020, Conflicting halal attributes at halal restaurants and consumers' responses: The moderating role of religiosity, *Journal of Hospitality and Tourism Management*, 45, November, 499–510. <https://doi.org/10.1016/j.jhtm.2020.10.010>,.
- Al-Teinaz, Y.R., 2020, The Halal Food Handbook, In, Y. R. Al-Teinaz, S. Spear, & I. H. A. A. El-Rahim, eds. *The Halal Food Handbook*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK, pp. 149–168.,
- Ali, M., 2016, Konsep Makanan Halal dalam Tinjauan Syariah dan Tanggung Jawab Produk Atas Produsen Industri Halal, *AHKAM: Jurnal Ilmu Syariah*, 16, 2, 291–306.
- Ali, M.E., Hashim, U., Dhahi, T.S., Mustafa, S., Man, Y.B.C. & Latif, M.A., 2012, Analysis of Pork Adulteration in Commercial Burgers Targeting Porcine-Specific Mitochondrial Cytochrome B Gene by TaqMan Probe Real-Time Polymerase Chain Reaction, *Food Analytical Methods*, 5, 4, 784–794. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.031>,.

- Anonim, 2014, *Halal, Undang-Undang Jaminan Produk*,
- Aziz, M., 2017, Perspektif Maqashid Al-Syariah Dalam Penyelenggaraan Jaminan Produk Halal Di Indonesia Pasca Berlakunya Undang-Undang Nomor 33 Tahun 2014 Tentang Jaminan Produk Halal, *AL HIKMAH Jurnal Studi Keislaman*, 7, September, 78–94.
- Fermanto, F. & Sholahuddin, M.A., 2020, Studi Ilmiah Halal Food additive yang aman dikonsumsi dan baik bagi kesehatan, *Journal of Halal Product and Research*, 3, 2, 95–104.
- Kohilavani, Zzaman, W., Febrianto, N.A., Zakariya, N.S., Abdullah, W.N.W. & Yang, T.A., 2013, Embedding Islamic dietary requirements into HACCP approach, *Food Control*, 34, 2, 607–612. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.008>,
- Kumar, A., Kumar, R.R., Sharma, B.D., Gokulakrishnan, P., Mendiratta, S.K. & Sharma, D., 2015, Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 10, 1340–1351.
- Lever, J. & Miele, M., 2012, The growth of halal meat markets in Europe: An exploration of the supply side theory of religion, *Journal of Rural Studies*, 28, 4, 528–537. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrurstud.2012.06.004>,
- Mostafa, M.M., 2020, A knowledge domain visualization review of thirty years of halal food research: Themes, trends and knowledge structure, *Trends in Food Science and Technology*, 99, December 2019, 660–677. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.022>,
- Neio Demirci, M., Soon, J.M. & Wallace, C.A., 2016, Positioning food safety in Halal assurance, *Food Control*, 70, 257–270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.059>,
- Nusantoro, B.P., 2018, Food production: From farm to fork, In, M. E. Ali & N. N. A. Nizar, eds. *Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods*, Woodhead Publishing Limited, pp. 1–14., <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>.
- Paredi, G., Sentandreu, M.A., Mozzarelli, A., Fadda, S., Hollung, K. & de Almeida, A.M., 2013, Muscle and meat: New horizons and applications for proteomics on a farm to fork perspective, *Journal of Proteomics*, 88, 58–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.029>,
- Rohman, A., 2015, *Pengukuhan Guru Besar: Analisis derivat babi dalam produk makanan dan farmasi dengan metode fisika-*

kimia dan biologi molekuler untuk autentikasi halal, Yogyakarta, Indonesia. <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>.

- Rohman, A., 2019, The employment of Fourier transform infrared spectroscopy coupled with chemometrics techniques for traceability and authentication of meat and meat products, *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6, 1.
- Rohman, A., 2017, The use of infrared spectroscopy in combination with chemometrics for quality control and authentication of edible fats and oils: A review, *Applied Spectroscopy Reviews*, 52, 7.
- Rohman, A. & Che Man, Y.B., 2012, Analysis of Pig Derivatives for Halal Authentication Studies, *Food Reviews International*, 28, 1.
- van der Spiegel, M., van der Fels-Klerx, H.J., Sterrenburg, P., van Ruth, S.M., Scholtens-Toma, I.M.J. & Kok, E.J., 2012, Halal assurance in food supply chains: Verification of halal certificates using audits and laboratory analysis, *Trends in Food Science and Technology*, 27, 2, 109–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2012.04.005>.
- Windarsih, A., Dwi, H., Wheni, A., Rohman, A. & Ihya, Y., 2022, Untargeted metabolomics and proteomics approach using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry to detect pork adulteration in *Pangasius hypophthalmus* meat, *Food Chemistry*, 386, March, 132856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132856>.
- Yanggo, H.T., 2013, Makanan dan Minuman dalam Perspektif Hukum Islam, *Tahkim*, 9, 7. <file:///C:/Users/User/AppData/Local/Temp/72-280-1-PB.pdf>.
- Yusof, S.M. & Shutto, N., 2014, The Development of Halal Food Market in Japan: An Exploratory Study, *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 121, September 2012, 253–261. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbspro.2014.01.1126>.

BAB II

MAQASHID AL-QUR'AN DALAM KEHALALAN PRODUK

Ahmad Atabik

Atabik78@gmail.com

Institut Agama Islam Negeri (IAIN) Kudus,
Jawa Tengah, Indonesia

A. Pendahuluan

Al-Qur'an sebagai kitab suci umat Islam diturunkan kepada Nabi Muhammad SAW untuk memberi petunjuk pada umat manusia.[1, p. 15] Al-Qur'an juga merupakan sumber syariat dan dasar hukum Islam yang memberi kemaslahatan kepada alam semesta. Sudah menjadi kesepakatan para ulama, bahwasanya setiap hukum yang telah disyariatkan Allah Swt. kepada umat manusia sejatinya memberi maslahat ataupun kebaikan untuk mereka. Disadari ataupun tidak, aturan yang telah ditetapkan itu secara otomatis akan mengarahkan setiap manusia ke arah kebahagiaan dunia dan akhirat.

Prinsip syariat yang diejawantahkan oleh manusia pada hakikatnya memberi kemaslahatan, dengan cara memelihara keselamatan dan kesejahteraan hidup umat manusia di dunia ini, melalui jalinan hubungan baik antara manusia dengan Sang Pencipta, antara manusia dengan manusia lainnya, antara manusia dengan makhluk lainnya, serta antara manusia dengan lingkungannya. Maslahat yang merupakan tujuan Sang Pencipta dalam syariat-Nya itu mutlak diwujudkan karena keselamatan dan kesejahteraan duniawi dan ukhrawi tidak akan mungkin dicapai tanpa maslahat [2]. Kemaslahatan ini dapat digali dari kandungan ayat-ayat al-Qur'an

yang menjadi sumber syariat Islam.

Kandungan al-Qur'an mencakup segala hal yang berkaitan dengan kehidupan umat Islam. Untuk mengatur kehidupan mereka al-Qur'an menghadirkan ayat-ayat hukum. Perbagai ayat hukum dihadirkan untuk memberi maslahat bagi setiap muslim yang dibebani syariat (mukallaf). Oleh karena itu, maslahat menjadi salah satu tolok ukur mujtahid dalam menggali hukum Islam pada setiap problematika yang secara pasti tidak disebutkan dalam al-Qur'an maupun hadis.[3] Dengan demikian, hasil ijthiat para mujtahid yang berupa produk hukum seharusnya dapat berkesinambungan dan relevan dengan keadaan tempat dan waktu (*shalih likulli zaman wa makan*).

Realitas yang terjadi di masyarakat tidaklah demikian. Terdapat kesenjangan antara realitas dan idealitas. Menurut idealitasnya, pemahaman dan penafsiran terhadap al-Qur'an dapat memberi solusi pada seluruh problematika, tapi realitasnya banyak problematika yang sering dibenturkan dengan pemahaman agama dan penafsiran ayat yang mengatasnamakan al-Qur'an. Menurut al-Na'im, pelbagai problematika itu muncul disebabkan adanya gap antara penafsiran Al-Quran dan hak asasi manusia. [4] Realitas di atas, menyampaikan bahwa seakan-akan al-Qur'an tidak mampu memberi solusi atas pelbagai problematika mencuat akhir-akhir ini. Realitasnya bukan demikian, al-Qur'an apabila dipahami dengan baik dan benar maka akan memberi solusi terhadap setiap problem kehidupan manusia.

Di antara problem umat Islam dewasa ini adalah munculnya banyak produk yang hadir di tengah-tengah masyarakat. Keberadaan produk-produk ini banyak tidak diketahui secara pasti komposisinya. Makanan dan minuman merupakan produk yang terbanyak. Selain keduanya, produk yang juga sering dikonsumsi dan dipakai umum adalah obat-obatan dan kosmetika. Makanan dan minuman

merupakan produk cukup mudah diketahui komposisinya, karena biasanya tertera di labelnya. Kendatipun dewasa ini banyak sekali bahan makanan dan minuman tambahan yang diduga dipergunakan produsen pada produk yang tidak disebutkan dalam labelnya. Sedangkan, untuk obat-obatan dan kosmetik, masyarakat umum mendapati kesulitan untuk mengidentifikasi apakah produk tersebut betul-betul halal dan aman dipakai. [5] Berangkat dari *view point* di atas, artikel ini akan menyuguhkan tujuan-tujuan maksud kandungan al-Qur'an dalam kehalalan produk atau oleh para sarjana muslim disebut dengan maqashid al-Qur'an dalam produk halal. Pembahasan akan menyuguhkan secara berurutan tentang pengertian Maqashid al-Qur'an, perbedaan maqashid al-Qur'an dengan Maqashid al-Syari'ah, ayat-ayat al-Qur'an yang berbicara tentang halal dan haram, konsep halal dan haram dalam al-Qur'an, dan diakhiri tentang maqashid produk halal dalam al-Qur'an. Selanjutnya akan ditarik kesimpulan dari keseluruhan kajian tersebut.

Apa itu Maqashid al-Qur'an?

Maqasid al-Qur'an, secara etimologi merupakan kata majemuk yang tersusun dari 2 (dua) kata yaitu: Maqasid dan al-Qur'an. Kata Maqashid merupakan bentuk plural dari kata *maqsad* yang merupakan derivasi dari kata kerja *qashada-yaqshudu, qashdan, maqshad* yang mempunyai beragam makna. Ibnu Faris menjelaskan asal dari kata *qashada* adalah mendatangi sesuatu [6, p. 777]. Dalam kamus al-Muhith, Fairuz Abadi menjelaskan bahwa *qashada* memiliki beberapa arti, di antaranya; menuju suatu arah, tujuan, adil, dan tidak melampaui batas, tengah-tengah, jalan lurus, berada pada poros tengah antara berlebihan dan kekurangan [7, p. 566]. Pelbagai makna dari *qashada* di atas dapat dilihat dari penggunaan kata *qashada* dan derivasinya dalam al-Qur'an.

Sementara al-Qur'an secara etimologi berasal dari kata *qara'a*

yaqrau qira'atan qur'an yang memiliki arti menghimpun, mengumpulkan dan membaca. Qira'ah memiliki arti merangkai huruf demi huruf dalam sebuah ungkapan kata-kata yang tersusun secara teratur. Manna' al-Qattan menjelaskan, *qur'an* yang berasal dari *wazan fu'lan* yang sama seperti *ghufran* dan *syukran* memiliki arti bacaan dan cara membacanya. Kemudian secara khusus, al-Qur'an menjadi nama dari sebuah kitab suci yang berasal dari firman Allah diturunkan kepada Nabi Muhammad Saw. Sebutan al-Qur'an tidak hanya terbatas sebuah kitab dengan keseluruhan kandungannya namun juga bagian daripada ayat-ayat yang dinisbatkan kepadanya[8, pp. 16–17]. Dari rangkain dua kata itu, maka *maqashid* al-Qur'an secara bahasa bisa diartikan sebagai orientasi atau tujuan diturunkannya ayat al-Qur'an.

Sedangkan menurut terminologi, ada beberapa ulama yang memberikan devinisi *maqashid* al-Qur'an. Al-Hamidi dalam *al-Madkhal ila Maqashid al-Qur'an* menjelaskan bahwa *maqashid* al-Qur'an adalah tujuan diturunkan al-Qur'an sebagai jaminan *maslahah* bagi hamba.[9, p. 23] Pengertian ini memposisikan *maqashid al-Qur'an* sebagai tujuan tertentu yang nantinya akan membatasi penafsiran al-Qur'an dalam tujuan-tujuan tersebut. Menurut Izzuddin Abd al-Salam, *Maqashid* al-Qur'an adalah tujuan al-Qur'an diturunkan untuk *mengajak manusia untuk melaksanakan seluruh kebajikan dan sebab-sebab yang menghantarkan kepada kemaslahatan. Serta mencegah melakukan kerusakan dan sebab-sebab yang menghantarkannya.*

Dari dua pengertian di atas dapat diambil kesimpulan bahwa *maqashid al-Qur'an* merupakan salah satu prinsip dalam memahami kandungan al-Qur'an. Para sarjana Islam semacam Muhammad Abduh juga menyatakan bahwa tafsir yang relevan untuk masa kekinian adalah penafsiran yang didasarkan pada tujuan utama diturunkannya al-Qur'an, yaitu memberikan petunjuk bagi seluruh

umat manusia untuk meraih kebahagiaan dunia dan akhirat. Senada juga disampaikan oleh Ibnu Asyur bahwa seluruh konsep maqashid al-Qur'an seyogyanya disandingkan dengan tujuan inti diturunkannya al-Qur'an, yaitu memberi maslahat bagi keberlangsungan umat manusia di dunia dan akhirat.[10]

Kemasalahan yang terdapat dalam maqashid al-Qur'an bukan hanya bermakna sebagai tujuan atau titik pencapaian yang diinginkan untuk ditelisik, namun juga meliputi segala proses yang dilakukan untuk memperoleh tujuan tersebut. Atas dasar ini, *maqashid* al-Qur'an tidak berhenti pada satu atau beberapa tema pokok al-Qur'an melainkan juga meliputi seluruh proses untuk mencapainya. Ini berarti bahwa eksistensi Maqashid al-Qur'an dapat menjadi salah satu *problem solving* umat Muslim dalam menghadapi perkembangan zaman. Dalam maqashid al-Qur'an, al-Qur'an dijadikan sebagai acuan dan semangat dalam upaya mencari solusi semua problematika kontemporer dewasa ini.[11]

Dari *view point* di atas dapat dimengerti bahwa maqashid al-Qur'an sangat urgen untuk diketahui oleh pengkaji al-Qur'an pada masa kontemporer ini. Hal ini menimbang bahwa mengetahui maqashid ayat al-Qur'an memberi manfaat bagi para pengkajinya. Sejalan dengan hal tersebut mengetahui maqashid al-Qur'an memiliki tujuan sebagai berikut; pertama, mendapatkan pemahaman yang benar serta mengetahui hakikat kandungan ayat. Kedua, dapat menghubungkan ayat dengan ayat lain yang ada sebelum dan sesudahnya berdasarkan tujuan pokok dari masing-masing ayat. Ketiga, membuktikan adanya keselarasan antar ayat al-Qur'an dengan menunjukkan keseuaian antar ayat tersebut. Keempat, memperoleh maksud kandungan ayat yang digali oleh mufasir. Kelima, dapat menghayati makna kandungan ayat setelah diketahui tujuan diturunkannya ayat.[12, pp. 64–65]

Untuk dapat menggali maqashid al-Qur'an, dibutuhkan upa-

ya serius dalam menggali, membaca, dan mengangan-angan kandungan ayat al-Qur'an dengan penuh bijaksana, setidaknya dengan memadukan dua piranti, yaitu wahyu dan alam. Perpaduan dua pembacaan ini merupakan gagasan yang sangat urgen yang pernah dikemukakan oleh Thaha Jabir 'Alwani. Dua piranti itu harus selaras. Sebaliknya apabila keduanya diabaikan, maka mufasir akan gagal menggapai kesempurnaan pemahaman terhadap maksud kandungan al-Qur'an. Hal ini disebabkan bahwa dalam pembacaan pertama, wahyu, menghubungkan dengan Allah Sang Pemilik Kalam, sedangkan pembacaan kedua, alam semesta, dapat berpotensi manusia andil dalam pembangunan peradaban.[10]

Dalam kajian penafsiran al-Qur'an, term maqashid al-Qur'an dapat di *breakdown* ke dalam tafsir maqashidi. Abu Zaid menjelaskan bahwa tafsir maqashidi adalah salah satu ragam dan aliran tafsir yang berupaya menguak makna-makna logis dan tujuan-tujuan beragam yang berputar di sekiling al-Qur'an, baik secara general maupun parsial, dengan menjelaskan cara manfaatnya untuk merealisasikan kemaslahatan manusia. Tujuan yang dimaksud adalah tujuan yang muncul dalam teks al-Qur'an itu sendiri dan sudah diungkap oleh jumhur ulama [12].

Tafsir maqashidi juga dapat disebut sebagai model baru pendekatan dalam menafsirkan al-Qur'an dengan menekankan pada dimensi maqashid al-Qur'an dan Maqashid al-Syari'ah. Sehingga, tafsir maqashidi tidak membatasi diri dengan penjelasan makna eksplisit dari teks al-Qur'an, namun juga menguak maksud dan tujuan dibalik makna implisit dari teks (*mafhum*), yang sebenarnya dalam setiap perintah atau larangan Allah dalam al-Qur'an ada tujuan-tujuan tertentu. Jika penafsirannya adalah ayat-ayat kisah, maka tafsir maqashidi akan menelisik apa sebenarnya hikmah tujuan Allah menarasikan kisah al-Qur'an tersebut. Semisal, kisah Nabi Nuh diperintahkan untuk mengangkut semua jenis hewan secara

berpasangan ke dalam kapalnya. Tujuannya tidak lain adalah untuk menjaga ekologi polulasi hewan.[13, p. 13]

Dewasa ini menafsirkan dengan maqashid al-Qur'an sangat urgen sebagai alternatif dalam mencari solusi atas problematika masyarakat pada masa kini dalam memahami al-Qur'an. Problem itu berkaitan dengan gaya penafsiran yang tekstualis ke kanan dan liberalis ke kirian. Sehingga penafsiran model maqashid al-Qur'an diharapkan dapat menghasilkan penafsiran yang moderat dan dapat dijadikan solusi dalam menghadapi problematika yang muncul di tengah masyarakat. Dengan penafsiran model maqashidi ini dapat menguatkan jargon yang sangat masyhur, *al-Qur'an shalil likulli zaman wa makan*, al-Qur'an senantiasa relevan untuk setiap tempat dan waktu.

B. Antara Maqashid al-Qur'an dengan Maqashid al-Syari'ah

Maqashid al-Qur'an dalam kajian ilmu keislaman mempunyai hubungan yang sangat dekat dengan *maqashid al-Syari'ah*. Hal ini karena keduanya merupakan kajian *maqashid* yang dilakukan pada sumber otentik Islam. Walaupun demikian, untuk memperjelas arah kajian, penulis akan memaparkan perbedaan antara *maqashid al-Qur'an* dan *maqashid al-Syari'ah*. Istilah *Maqashid al-Syari'ah* lebih populer dalam kajian hukum Islam, sedangkan *maqashid al-Qur'an* merupakan satu kajian dalam studi al-Qur'an dan Tafsir. *Maqashid al-Qur'an* secara umum membahas tentang kehendak Allah Swt. yang diwakili oleh setiap ayat-ayat al-Qur'an yang diturunkan-Nya, baik *ayat ahkam* (ayat tentang hukum) atau ayat lainnya, sedangkan *maqashid al-Syari'ah* berdasarkan sumber-sumbernya tidak hanya meliputi ayat ahkam yang ada dalam al-Qur'an, melainkan juga meliputi hadis ahkam dari Nabi, *Ijma'*, *Qiyas* dan sumber ahkam yang lain.[14, p. 8]

Maqashid al-Qur'an dapat diklasifikasikan berdasarkan ruang

lingkupnya, dari yang terkecil hingga yang terbesar. Pertama, ada yang disebut dengan maqashid ayat atau maksud dari suatu ayat, baik yang sudah jelas (*sharih*) maupun yang masih samar (*khafi*). Dalam konteks ini, tugas mendasar seorang penafsir adalah menjelaskan makna dan maksud setiap ayat yang ditafsirkannya. Kedua, ada pula yang disebut maqashid al-surah atau maksud dari suatu surah. Menurut al-Biqqa'i, setiap surah mempunyai satu pembahasan tentang tema pokok yang dikandungnya dan biasanya ayat-ayat awal dan akhir pada surah tersebut mengitari tema pokoknya. Lebih lanjut, mufassir ini mengatakan bahwa maqashid al-surah sangat mempengaruhi tujuan-tujuan dan pemaknaan ayat-ayat dalam surah tersebut. Ketiga, ada yang disebut dengan maqashid al-Qur'an al-'Ammah atau maksud al-Qur'an secara keseluruhan. Penafsir menempuh satu dari dua cara untuk mengidentifikasi ini, yaitu dengan memerhatikan teks al-Qur'an yang menerangkan tujuan dan sifatnya sendiri atau dengan merangkum hukum maupun penjelasan al-Qur'an dan menyimpulkan unsurunsurnya yang utama.[14]

Sementara itu, maqasyid al-syari'ah lebih dekat dengan kajian fiqih dan ushul fiqih. Maqasyid al-syari'ah ini mulai berkembang pada era al-Syathibi (abad ke-8 H). Oleh karena itu, al-Syathibi oleh para ulama dijuluki 'Bapak Maqashid al-Syari'ah'. Al-Syathibi mencetuskan gagasan maksud diberlakukannya syariat yang lebih dinamis melalui karya monumentalnya, *al-Muwafaqat*. Auda menjelaskan bahwa andil besar al-Syathibi dalam perkembangan ilmu Maqashid al-Syari'ah, pada tiga hal, yaitu: pertama, Mengubah persepsi lama tentang Maqashid al-Syari'ah, menjadikan kajian ini menjadi disiplin ilmu mandiri yang sebelumnya menjadi bagian dari ushul fiqih; kedua, al-Syathibi mengkritik penggunaan Maqashid al-Syari'ah hanya sebagai hikmah suatu hukum saja. Ia menyampaikan usulan agar menetapkan hukum dapat digali dari landasan pokok Maqashid al-Syari'ah; ketiga, Maqashid al-Syari'ah dapat dijadikan

sebagai dasar hukum yang pasti, karena bersumber dari nash yang qath'i.[15, pp. 53–54]

Al-Syathibi dalam karya monumentalnya, *al-Muwafaqat*, mengembangkan kajian maqashid al-syariah menggunakan pendekatan *tahlili istiqrā'i* (analitis induktif). Pendekatan ini dirasa sangat memberikan banyak kontribusi dalam pengembangan pemahaman ayat-ayat al-Qur'an dan hadis dalam sebuah maqasyid syariah. Kontribusi riil al-Syathibi dalam mengembangkan maqasyid syariah adalah: pertama, mengembangkan ushul fikih sebagai dasar maqashid al-syariah dan menjadi maqasyid syariah menjadi disiplin ilmu yang mandiri; kedua, al-Syathibi merupakan *founding father* yang menambahkan maqashid al-mukallaf ke dalam salah satu tema Maqashid al-Syari'ah; ketiga, al-Syathibi adalah tokoh pertama yang menyemai metodologi untuk mengetahui tujuan-tujuan Sang Pencipta akan diketahui secara menyeluruh.[16, p. 15]

Hal yang mendasar dari maqasyid al-Syariah al-Syathibi adalah bahwa syariat yang diturunkan oleh Allah di muka bumi ini pada hakekatnya untuk merealisasikan kemaslahatan manusia serta menghindari kerusakan. Al-Syathibi membagi kemaslahatan dalam tiga kategori, yaitu; primer (*dharuriyat*), sekunder (*haajiyat*) dan tersier (*tahsiniyat*). Kebutuhan primer berarti kebutuhan yang harus ada untuk keberlangsungan hidup manusia. Semisal, menjalankan agama, makan, minum, belajar, menikah, dan lainnya. Kebutuhan primer ini mencakup lima penjagaan (*al-hifzh*), atau sering disebut *dlaruriyat al-khams*; menjaga agama (*hifzhu al-din*), menjaga jiwa (*hifzhu al-nafs*), menjaga keturunan (*hifzhu al-nasl*), menjaga harta (*hifzhu al-mal*) dan menjaga akal (*hifzhu al-'aql*). Al-Syathibi juga menjelaskan bagaimana cara untuk dapat melestarikan lima penjagaan tersebut. Pertama, menjaga segala hal agar keberadaannya lestari. Kedua, menghindari dari segala yang bisa merusak.[16]

Al-Syathibi mencontohkan; pertama, cara menjaga agama, yaitu dengan menjalankan ibadah, seperti shalat, puasa, zakat dan lainnya. Sebaliknya, barang siapa memerangi agama harus turut berjihad. Kedua, untuk menjaga jiwa, diri harus dijaga dengan baik, tidak boleh melukai diri maupun orang lain. Apabila melukai orang lain atau sampai membunuh maka harus ada syariat qishash. Untuk menghindarkan punahnya agama, maka disyariatkan jihad. Sedangkan diterapkannya maslahat hajiyyat untuk menghindarkan diri dari kesulitan dalam hal pelaksanaannya. Semisal, shalat jama' dan qashar bagi musafir. Sementara masalah tahsiniyat adalah untuk melestarikan akhlak yang baik. Sekiranya masalah ini tidak ada, maka tidak akan memunculkan kerusakan atau lenyapnya sesuatu juga tidak akan menimbulkan kesulitan dalam pelaksanaannya, namun dianggap tidak layak dan tidak pantas menurut kesopanan dan tata krama yang berlaku di masyarakat.[17]

Dewasa ini kajian Maqashid al-Syari'ah dielaborasi oleh Ibnu 'Asyur yang sebelumnya dikembangkan oleh al-Syathibi. Ibn 'ASyur membagi Maqashid al-Syari'ah dalam dua varian yang belum dikenal sebelumnya, yaitu: umum (*al-'ammah*) dan khusus (*al-khashshah*). Ibn 'Asyur menyatakan bahwa Maqashid al-Syari'ah dapat dijadikan sebagai pendekatan dalam memahami nash (teks) al-Qur'an maupun hadis. Pemikiran lain dari Ibnu 'Asyur yang membedakan dengan sebelumnya adalah *al-hurriyah* (kebebasan), *al-musawah* (kesetaraan), *al-fithrah* (kesucian), *al-samahah* (toleransi), dan *al-haqq* (keadilan). Terobosan pemikiran ini sangat urgen untuk memenuhi kebutuhan manusia pada konteks modern saat ini. Pemikiran brilliant ini berimbas pada jangkauan Maqashid al-Syari'ah yang tidak semata membatasi pada aktifitas individu, namun juga kepada manusia secara menyeluruh.[18, p. 28]

Berkembangnya kajian Maqashid al-Syari'ah berimbas pada munculnya kajian maqasyid al-Qur'an yang menurunkan kajian

tafsir maqashidi. Ketika Maqashid al-Syari'ah dianggap sebagai alat untuk dapat memahami syariah agar senantiasa bisa membumi dan memberi kemaslahatan kepada umat manusia, maqashid al-Qur'an juga dimaksudkan agar al-Qur'an bisa dipahami secara holistik untuk kepentingan umat manusia. Sebenarnya terdapat kesamaan dalam menggunakan pendekatan sistem antara Maqashid al-Syari'ah dan maqashid al-Qur'an, baik dalam penetapan hukum ataupun dalam memahami dan menafsirkan al-Qur'an, keduanya menjadikan al-Qur'an sebagai sumber utama. Ketika seseorang berbicara dan membahas syariat sudah barang tentu juga membicarakan al-Qur'an.[19, p. 42]

Meskipun tafsir maqashidi yang sebagai turunan dari maqashid al-Qur'an belum dikenal luas sebagaimana Maqashid al-Syari'ah, namun pelbagai upaya untuk mensosialisasikan pemikiran tafsir maqashidi ini telah dilakukan. Gerakan mensosialisasi pemikiran ini dimotori oleh para sarjana muslim dari Marokko. Salah satu upaya adalah diskusi publik ilmiah internasional bertajuk al-Qira'at al-Jadidah li al-Qur'an al-Karim (Pembacaan baru dalam memahami al-Qur'an) yang diadakan oleh Fakultas Adab dan Humaniora Universitas al-Balag al-Tsaqafi Oujda, Marokko, pada tanggal 18 s.d. 20 April 2007. Momentum inilah yang dianggap sebagai stimulus disosialisasikannya tafsir maqashidi sebagai pendekatan baru dalam memahami kandungan al-Qur'an. [20] Kini kajian maqashid al-Qur'an dan tafsir maqashidi mulai semarak. Banyak sarjana al-Qur'an menjadikannya sebagai bahan kajian untuk memahami al-Qur'an pada masa kini. Bahkan maqashid al-Qur'an dan tafsir maqashidi sudah menjadi mata kuliah yang diajarkan di pelbagai perguruan tinggi keagamaan baik di dalam maupun luar negeri.

C. Identifikasi Ayat-Ayat tentang Halal dan Haram

Dalam al-Qur'an kata halal dengan berbagai derivasinya dise-

but sampai 51 kali. Terkadang menggunakan kata halal seperti dalam QS. al-Baqarah (2): 167, QS. al-Maidah: 77, QS. al-Anfal: 69, dan al-Nahl: 1144. Di saat lain menggunakan kata ahalla, uhillah dan uhillat seperti dalam QS. al-Baqarah: 187, QS. al-Baqarah: 275, QS. Ali Imran: 50, QS. al-Nisa': 24, QS. al-Maidah: 1, QS. al-Maidah: 4, dan QS. al-Maidah: 5. Pada kesempatan lain menggunakan kata yahillu dan tahillu seperti dalam QS. al-Baqarah: 228, 229, 230, QS. al-Nisa': 19. Selain itu juga menggunakan kata lain seperti hillun yang terdapat dalam QS. al-Maidah ayat 5, selain menggunakan kata yang mempunyai hubungan dengan makna halal seperti halaltum, mahilluha, halail dan yang lainnya.[21, p. 256]

Sedangkan kata haram dalam al-Qur'an dengan berbagai derivasinya juga disebut dalam al-Qur'an sebanyak 78 kali. Kata haram secara spesifik disebut dalam QS. al-Nahl: 116, QS. al-Baqarah: 144, 149, 150, 191, 194, 198, 217, QS. al-Maidah: 2, 197, QS. al-Taubah: 7, 19, QS. Yunus: 59, QS. al-Isra': 1, QS. al-Hajj: 25, al-Fath: 25, 227. Terkadang menggunakan kata harrama, hurrima dan hurrimat seperti dalam QS. al-Baqarah: 275, QS. Ali Imran: 50 dan 93, QS. al-Nisa': 23 dan 160, QS. al-An'am: 143, 144, 150, QS. al-A'raf: 32 dan 33, QS. al-Taubah: 37, QS. al-Nahl: 115, al-Nur: Terdapat pula kata harramna dalam QS. al-An'am: 146, 148.[22, p. 322]

Banyaknya kata halal dalam al-Qur'an tidak semuanya mengarah pada halal yang bermakna kebolehan dalam makanan. Adakalanya halal bermakna tidak boleh menyembunyikan sesuatu dalam rahim (QS. al-Baqarah: 28), halal berarti hukum boleh bergaul laki-laki dan perempuan setelah menikah (QS. al-Baqarah: 230), kebolehan jual beli dan kerahaman riba (QS. al-Baqarah: 257). Kata *halail* dalam QS. al-Nisa': 23) diartikan perempuan yang menjadi istri anak (menantu). Sedangkan halal dalam ritual ibadah haji berarti telah selesai melakukan rangkaian ibadah haji (QS. al-Maidah: 2). Dalam QS. Hud: 3, *halla yahillu* berarti tertimpa. Sementara kata

uhlul dalam QS. Thaha: 27 mempunyai arti melepaskan.[23, p. 139]

Begitu juga kata haram dalam al-Qur'an, tidak semuanya mengarahkan kepada makna segala yang dilarang dari makanan. Kata haram dalam al-Qur'an apabila disandingkan dengan kata *syahr* (bulan) berarti yang dimuliakan, sehingga rangkaian kata *al-Syahr al-haram* berarti bulan yang dimuliakan (QS. al-Baqarah: 194 dan QS. al-Maidah: 2). Demikian juga kata *haram* apabila disandingkan dengan kata *masjid*, maka bermakna masjid yang dimuliakan yaitu masjid yang mengelilingi ka'bah itu, *masjid al-haram* (QS. al-Baqarah: 144, 149, QS. al-Maidah: 2, QS. al-Anfal: 3, QS. al-Taubah: 7. Selain itu, kata haram dengan derivasinya *hurrimat* yang terdapat QS. al-Nisa': 33 mempunyai arti laki-laki diharamkan menikah dengan wanita-wanita yang disebutkan dalam rentetan ayat tersebut.

Sementara itu dalam al-Qur'an secara spesifik ada beberapa ayat yang menganjurkan untuk makan makanan yang halal. Penyebutan halal dalam al-Qur'an berkaitan dengan makanan terkadang menggunakan kata halal (bentuk masdar) secara langsung. Seperti dalam QS. al-Baqarah: 168:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ كُلُوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا، وَلَا تَتَّبِعُوا خَطَوَاتِ الشَّيْطَانِ

Artinya: Hai sekalian manusia, makanlah yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan. (QS: al-Baqarah:168).

Adakalanya al-Qur'an menggunakan kata *uhilla* (bentuk *fi'il madhi mabni majhul*/kata kerja pasif) seperti dalam QS. al-Maidah: 4:

قُلْ أَجَلٌ لَّكُمْ الطَّيِّبَاتُ وَمَا عَلَّمْتُمْ مِنَ الْجَوَارِحِ

Artinya: Katakanlah: "Dihalalkan bagimu yang baik-baik dan (buruan yang ditangkap) oleh binatang buas yang telah kamu ajar dengan melatihnya untuk berburu" (QS. al-Maidah: 4).

Terkadang juga menggunakan kata *yuhillu* (bentuk *fi'il mudhari' mabni ma'lum*/kata kerja aktif), seperti dalam QS. al-A'raf: 157:

وَيُحِلُّ لَهُمُ الطَّيِّبَاتِ وَيُحَرِّمُ عَلَيْهِمُ الْخَبَائِثَ

Hal yang sama juga pada kata haram yang menunjuk pada makanan. Terdapat beberapa ayat yang secara khusus membahas tentang keharaman memakan makanan tertentu. Penyebutan haram terkadang menggunakan kata *harrama* (bentuk *fi'il madhi mabni ma'lum*/kata kerja aktif) seperti dalam firman-Nya:

إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخَنزِيرِ وَمَا أُهْلَ بِهِ لِغَيْرِ اللَّهِ

Artinya: Sesungguhnya Allah hanya mengharamkan bagimu bangkai, darah, daging babi, dan binatang yang (ketika disembelih) disebut (nama) selain Allah (QS. al-Baqarah: 173).

Pada ayat yang lain, penyebutan haram menggunakan kata *hurrimat* (bentuk *fi'il mabhi majhul*/kata kerja pasif), seperti firman-Nya:

حُرِّمَتْ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةُ وَالدَّمُ وَلَحْمُ الْخَنزِيرِ وَمَا أُهْلَ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ وَالْمُنْخَنِقَةُ وَالْمَوْقُوذَةُ وَالْمُتَرَدِّيَةُ وَالنَّطِيحَةُ وَمَا أَكَلَ السَّبْعُ إِلَّا مَا ذَكَّيْتُمْ وَمَا ذُبِحَ عَلَى النَّصَبِ وَأَنْ تَسْتَقْسِمُوا بِالْأَزْلَمِ ذَلِكُمْ فَسُقُ

Artinya: Diharamkan bagimu (memakan) bangkai, darah, daging babi, (daging hewan) yang disembelih atas nama selain Allah, yang tercekik, yang terpukul, yang jatuh, yang ditanduk, dan diterkam binatang buas, kecuali yang sempat kamu menyembelihnya, dan (diharamkan bagimu) yang disembelih untuk berhala. Dan (diharamkan juga) mengundi nasib dengan anak panah, (mengundi nasib dengan anak panah itu) adalah kefasikan (QS. al-Maidah: 3).

D. Konsep Makanan Halal dan Haram dalam al-Qur'an

Pengetahuan tentang halal dan haram dalam Islam telah dijelaskan secara gamblang, baik dalam al-Qur'an maupun hadis. Bahkan dikatakan dalam hadis bahwa barang yang halal itu jelas, yang haram juga jelas, antara yang halal dan haram itu disebut dengan mutasyabihat atau syubhat. Pengetahuan tentang halal dan

haram ini sangat urgen bagi setiap muslim, karena berimbang pada pahala dan dosa, antara kenikmatan surga dan siksa neraka. Sehingga setiap muslim diwajibkan untuk mengetahui mana makanan dan minuman yang halal, mana yang haram. Apabila seorang muslim dapat mengkonsumsi makanan dan minuman yang halal saja, serta dapat menghindari dari yang diharamkan Allah Swt, maka niscaya ridha Allah akan menghampirinya. Namun sebaliknya, apabila yang dikonsumsi adalah makanan dan minuman yang haram bukan karena terpaksa, siksa dan murka Allah akan menghampirinya.[24, p. 35] Oleh karena itu, sangat penting bagi seorang muslim memahami konsep halal dan haram.

Konsep halal dan haram merupakan istilah al-Qur'an yang digunakan dalam berbagai pengertian konsep yang berbeda-beda. Adakalanya dipergunakan untuk konsep yang berkaitan dengan pernikahan sebagian lagi berhubungan dengan konsep makanan dan minuman. Kata halal dan haram selain sering disebut dalam al-Qur'an juga banyak disebut dalam Hadis Nabi Saw.[25] Ibnu Faris mengidentifikasi kata halal berasal dari kata *halla*, yang mempunyai beragama makna, di antaranya menempati, menguarai, solusi, dan membuka sesuatu.[6] Dalam etimologi *fuqaha*, kata halal juga sering diartikan kebolehan (*al-ibahah*). Al-Jurjani menjelaskan kata halal yang berasal dari *al-hall* memiliki arti terbuka dan mengurai. Secara terminologi syariah, halal adalah sesuatu apabila dilakukan tidak dikenai hukuman atau sanksi begitu pula apabila ditinggal. Apabila dihubungkan dengan makanan, halal berarti sesuatu yang boleh dimakan menurut hukum syariat.[26, p. 97]

Sedangkan kata haram berasal dari kata *harama* yang bermakna larangan (*mamnu'*). Haram juga bermakna peringatan. Haram menurut istilah para ahli fiqh (*fuqaha'*) adalah sesuatu apabila dilakukan mendatangkan dosa atau dikenai sanksi dari Allah, dan apabila ditinggalkan akan mendapatkan pahala. Ini adalah kata

haram yang berantonim dengan wajib. Sementara haram yang berantonim dengan halal biasanya lebih kepada larangan terhadap sesuatu yang bisa dirasakan, seperti makanan, pernikahan dan yang lainnya. Menurut al-Asfihani, haram dan halal merupakan bentuk larangan atau kebolehan terhadap sesuatu yang disantap haruslah disarankan pada teks ilahi, karena itu menjadi hukum syara'.[23]

Kata halal yang bermakna kebolehan menyantap sesuatu dalam al-Qur'an sering disandingkan dengan kata *thayyib*. Setidaknya ada empat yang dalam al-Qur'an yang menyandingkan kata halal dengan *thayyib*, yaitu QS. al-Baqarah: 168, QS. al-Maidah: 88, QS. al-Anfal: 69 dan QS. al-Nahl: 114. Secara bahasa *thayyib* bermakna sesuatu yang baik yang bersifat umum. Dalam al-Qur'an kata baik selain menggunakan *thayyib* juga biasa disebut dengan menggunakan kata *shalih*, *hasan*, *khair*, *birr*, dan *ma'ruf*. Tentu masing-masing kata memiliki spesifikasi tersendiri yang biasa dikaji dalam kajian al-Furuq al-Lughawiyah (perbedaan makna kata dalam bahasa Arab).[27, p. 275]

Dari empat ayat yang berbicara tentang halal dan *thayyib* di atas bisa dikatakan bahwa halal dan *thayyib* bertemu dalam kesatuan makna yang berfungsi sebagai penguat (*ta'kid*) untuk membedakan lafaz. Al-Syawkani ketika mengutip pendapat al-Syafi'i mengatakan bahwa *thayyib* memiliki makna melezatkan. Sementara itu al-Tabari (w. 310 H) menyatakan bahwa makna dari kata *thayyib* dalam ayat-ayat tersebut adalah sesuatu yang suci dan bersih tidak yang mengandung unsur najis dan tidak juga mengandung unsur haram. Sementara Menurut Al-'Arabi, kata *thayyib* berantonim (kebalikan) dari kata *al-khabits*, bermakna yang buruk dan jelek. Al-'Arabi juga menjelaskan bahwa kata *thayyib* memiliki dua arti. 1), suatu perkara yang dirasa cocok bagi tubuh dan atau sesuatu yang bisa dirasakan lezatnya bagi indera perasa. 2), segala sesuatu baik makanan atau minuman ataupun barang yang diharamkan Allah Swt.[28]

Konsep halal dan thayyib ini berimplikasi pada makanan yang layak dimakan atau diminum. Ini berarti bahwa makanan yang akan disantap itu tidak hanya halal ketika didapat dan halal jenis makanannya, namun juga harus dipastikan makanan itu layak dan baik untuk disantap. Sehingga halal saja tidak cukup, harus disertai thayyib baik dan layak. Semisal, di hadapan kita ada makanan berupa buah mangga, yang kita dapatkan secara halal, namun apabila mangga itu busuk, maka tidak disebut dengan thayyib. Begitu juga ketika dihadapan seseorang ada makanan berupa daging, yang halal ketika ia mendapatkannya, akan tetapi ketika itu ia sedang sakit diabetes yang akut, maka makanan yang dari daging itu tidak baik untuk ia santap.

Mengkonsumsi makanan halal dan thayyib bukan hanya pada umatnya Nabi Muhammad semata, namun para umat nabi-nabi terdahulu juga diperintahkan Allah untuk mengkonsumsi dan memakan makanan yang thayyib. Hal ini tergambar dalam QS. al-Mu'minun: 51. Ayat ini menjelaskan tentang perintah Allah kepada seluruh Rasul dan para umatnya untuk mengkonsumsi makanan halal serta melakukan amal shalih. Berdasarkan ayat ini, mengonsumsi makanan dan minuman yang halal merupakan perintah agama yang sesuai dengan syar'iat dan termasuk amal shalih, yang semua para Rasul telah diperintahkan untuk melaksanakannya. Pelbagai ayat al-Qur'an yang menjelaskan tentang perintah halal di atas dapat dipahami bahwa mengonsumsi makanan dan minuman yang halal lagi baik merupakan bagian dari kewajiban. Dengan kata lain, ketentuan halal dan haram sangat erat hubungannya dengan ajaran Islam yang terdiri dari akidah (keimanan), syari'at dan akhlak.[28]

Konsep halal dan haram berlaku pada semua orang, bukan hanya kaum muslimin saja. Hal ini didasarkan pada QS. al-Baqarah: 168, "Wahai para manusia, makan lah yang halal lagi thayyib (baik)

dari sesuatu yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan. Halal dan haram juga manifestasi dari baik dan buruk. Sejak awal penciptaannya manusia sudah dibekali ilmu mana yang baik dan buruk, yang halal dan haram, yang boleh dan tidak boleh. Oleh karena itu, yang halal dan baik pasti merupakan petunjuk dari Allah swt, sementara haram dan buruk bisa dipastikan sebagai akibat mengikuti langkah setan. Mendasar hal tersebut, al-Qur'an memerintahkan manusia secara umum dan kaum muslim secara khusus untuk mengkonsumsi makan halal dan baik yang merupakan bagian dari rizki Allah, dan menjauhkan diri dari sesuatu yang diharamkan. Sebab, menerjang larangan Allah Swt. akan mendatangkan sanksi dan hukuman dari Allah.

Selain dijelaskan al-Qur'an, Nabi secara jelas juga menguatkan apa yang terdapat dalam al-Qur'an. Nabi secara khusus pernah menjelaskan halal dan haram ketika beliau ditanyai tentang keju, minyak samin, dan jubah yang diolah dari kulit binatang. Nabi Saw. menyampaikan bahwa, barang yang halal adalah segala hal yang Allah halalkan dalam Kitab-Nya, dan yang haram adalah segala hal yang Allah haramkan dalam Kitab-Nya. Sedangkan apa yang didiamkan-Nya (tidak disinggung), maka ia termasuk yang dimaafkan kepada kalian (HR. Ibnu Majah dan al-Tirmidzi). Hadis ini mengingatkan kaum muslim bahwa yang halal dan haram itu sesuatu yang sudah disampaikan oleh al-Qur'an, baik secara eksplisit maupun implisit [29]. Secara ekplisit semisal, bangkai dan lainnya. Sedangkan yang implisit adalah narkoba dan sejenisnya. Pengertian tentang keharaman narkoba didapat dengan cara memberlakukan qiyas untuk menggali hukum dari narkoba dan sejenisnya.

E. Konsep dan Urgensi Kehalalan Produk

Apabila kita membicarakan produk halal, maka yang terbesit dalam benak adalah hal tentang makanan dan minuman. Pada-

hal dalam realitasnya, produk halal tidak hanya terbatas pada makanan dan minuman semata. Dalam Undang-Undang Jaminan Produk halal dikatakan bahwa Produk Halal merupakan produk yang memenuhi syarat kehalalan sesuai dengan Syariat Islam. Produk halal berarti produk yang memenuhi syarat sebagai makanan dan Minuman yang halal diantaranya adalah[5]:

Pertama, daging hewan yang halal untuk disembelih dengan tata cara yang baku yang terdapat dalam Syariat Islam. Hal ini merujuk pada QS. al-Maidah (5): 3.

Kedua, tidak terdapat unsur babi atau unsur-unsur yang mengandung babi. Semisal, gelatin babi, lard (lemak babi), emulsifier babi (E471), kuas dengan bulu babi (bristle), dan lechitine babi. Pengertian ini didasarkan pada QS. Al-Baqarah (2): 173.

Ketiga, tidak berupa khamar dan semua jenis makanan atau minuman yang tidak ada unsur alkohol dan turunannya, atau bukan juga jenis alkohol yang digunakan sebagai bahan yang sengaja dimasukkan. Hal ini didasarkan pada QS. al-Baqarah (2): 219, al-Maaidah (5): 90.

Keempat, tidak bangkai dan atau darah yang haram dikonsumsi umat Islam. Hal ini berdasarkan QS. al-Baqarah (2):173. Termasuk segala jenis makanan yang didapat/diperoleh secara halal (*halal lighairihi*).

Ali Mustafa Ya'kub menjelaskan bahwa terdapat 5 (lima) kriteria dari makanan atau minuman yang dikategorikan halal, yaitu: pertama, Selain halal, makanan dan minuman tersebut adalah thayyib (baik), yakni sesuatu yang dapat dirasa enak oleh indra atau jiwa, serta tidak menjijikkan dan menyakitkan. Dalam QS. al-Maidah: 4, "Mereka bertanya kepadamu, Apakah yang diharamkan bagi mereka? Katakanlah, yang diharamkan bagimu yang baik-baik". Kedua, tidak memudaratkan (mendatangkan bahaya); ketiga, Tidak terdapat unsur najis di dalamnya; keempat, tidak terdapat unsur

yang memabukkan di dalamnya; dan kelima, Tidak terdapat unsur organ tubuh manusia. Oleh karena itu, produk halal tidak hanya yang dilabeli halal secara syar'i, akan tetapi juga telah mendapatkan sertifikasi halal dari Badan Penyelenggara Produk Halal Kementerian Agama (sekarang), dahulu dilegalkan oleh Majelis Ulama Indonesia (MUI).[30, p. 11]

Produk halal harus diproses menggunakan cara-cara yang halal. Produk halal biasanya diproses dengan menggunakan bahan baku, bahan tambahan, bahan olahan, serta bahan penolong. Bahan-bahan itu berasal dari tumbuhan, hewani, mikroba dan bahan yang diproses melalui cara biologi, kimiawi atau bahkan proses rekayasa genetik. Bahan yang berasal dari tumbuhan merupakan bahan halal kecuali yang dapat memabukkan dan mendatangkan bahaya apabila dikonsumsi. Bahan yang berasal dari hewan juga halal kecuali hewan yang jelas-jelas diharamkan secara syar'i. Hewan yang dipergunakan untuk bahan produk harus disembelih terlebih dahulu sesuai dengan syariat Islam dan mematuhi kaidah belas kasihan terhadap hewan. Sementara bahan yang berasal dari proses kimiawi dan mikroba, proses biologi, dan proses rekayasa genetik tidak diperbolehkan atau bahkan diharamkan apabila proses pertumbuhan dan atau pembuatannya tercampur dengan bahan yang diharamkan secara nyata.[5]

Tidak semua produk yang beredar jelas status halal haramnya, bahkan kebanyakan tidak jelas statusnya. Oleh karena itu, terdapat anjuran kepada masyarakat yang mengkonsumsi produk halal yang sudah tersertifikasi dan terlabeli. Hal ini dapat menghindarkan konsumen dari keraguan terhadap status hukumnya. Dengan adanya jaminan produk halal memunculkan rasa tenang dan aman oleh masyarakat pengguna produk tersebut. Selain rasa nyaman masyarakat juga menciptakan kesehatan jiwa konsumen yang tidak lain adalah masyarakat muslim. Dengan konsumsi produk halal ini juga

diharapkan masyarakat bisa sehat secara jasmani dan rohani.

Urgensi keberadaan produk halal tidak bisa dilepaskan dari keyakinan kaum muslimin dalam mengonsumsi dan mempergunakan suatu produk tertentu, yang diharuskan mematuhi konsep “halal dan tayyib” yang merupakan kriteria produk yang dianggap halal, sehat dan berkualitas. Mengetahui sebuah produk itu halal atau tidak bisa digali dari hukum Islam dan pengetahuan terhadap kandungan produk tersebut. Hukum Islam memberi rambu-rambu produk apa saja yang boleh dikonsumsi dan digunakan, dan produk apa yang haram dikonsumsi. Selain tentang pengetahuan tentang hukum Islam, pengetahuan tentang kandungan produk juga sangat bermanfaat untuk mengetahui kehalalan sebuah produk. Selain itu, mengetahui hukum halal dan haram sebuah produk tidak hanya berkaitan dengan doktrin keagamaan semata, namun juga dibaliknya terdapat hikmah yang mendasar berkaitan dengan kesehatan dan kebermanfaatannya.[29]

F. Maqashid al-Qur'an dan Syariah dalam Kehalalan Produk

Konsumsi produk halal merupakan diskursus yang sering sekali dibincangkan, terutama di era modern ini. Produk halal sudah merupakan sebuah keniscayaan bagi kaum muslimin di tengah merembaknya produk-produk dalam maupun luar negeri yang diproduksi oleh pabrik non muslim. Labelisasi produk halal pun sudah menjadi kebutuhan yang mendesak. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan kenyamanan dalam berkehidupan dalam menjalankan syariat. Kerena pada hakekatnya syariat yang diturunkan adalah untuk memberi kemaslahatan bagi umat manusia. Kemaslahatan dalam produk halal ini dapat digali dari maqashid al-Qur'an.

Ada beberapa langkah yang bisa dilakukan dalam menggali adanya maqashid al-Qur'an berkaitan dengan produk halal. Langkah pertama adalah mengidentifikasi dan mengumpulkan ayat-ayat

halal dan thayyib dalam al-Qur'an. Langkah ini juga biasa digunakan dalam menafsirkan ayat-ayat al-Qur'an dengan metode tematik (*maudlui*).[31, p. 61] Sebagaimana dijelaskan di atas, bahwa terdapat 51 ayat yang berkaitan dengan halal. Namun pada kesempatan ini akan dikupas maqashid al-Qur'an dari ayat-ayat halal yang secara khusus disandingkan dengan kata thayyib, yang jumlahnya ada (empat) dalam al-Qur'an, yaitu: QS. al-Baqarah: 168, QS. al-Maidah: 87-88, QS. al-Anfal: 69, QS. al-Nahl: 114.

1. Maqashid al-Qur'an al-Baqarah: 168.

Dalam ayat 168 Surat al-Baqarah, Allah berfirman: “Hai sekalian manusia, makanlah yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan.” Ayat ini dimulai dengan sebuah panggilan kepada manusia secara umum “Ya ayyuhannas (wahai sekalian manusia)”. Ayat ini dan ayat-ayat yang terkumpul dalam surat al-Baqarah masuk pada kategori surat Madaniyah, karena diturunkan setelah Nabi Muhammad berhijrah ke Madinah, meskipun ayat ini dimulai dengan “Ya ayyuhannas”. Meskipun demikian, karakter ayat ini seperti ayat Makkiyah, yang mengajak semua manusia, bukan saja orang yang beriman. Hal ini mengindikasikan bahwa perintah untuk memakan makanan dan minuman yang halal dan baik itu bukan saja kepada orang yang beriman, akan tetapi kepada semua orang, apapun agamanya[8].

Menurut Quraish Syihab, ayat ini menunjukkan bahwa bumi disediakan untuk seluruh umat manusia. Semuanya diajak untuk makan dan produk yang halal yang ada di bumi. Namun, tidak semua yang ada di bumi ini otomatis halal dikonsumsi. Ada makanan halal namun tidak bergizi, dan ketika dikonsumsi tidak baik. Yang diperintahkan adalah yang halal lagi baik. Tujuannya adalah agar tidak menimbulkan madharat untuk manusia. Sebab, mengkonsum-

si makanan untuk jasmani sering kali digunakan setan untuk memperdaya manusia. Oleh karena itu, lanjutan ayat ini; *dan jangan kamu mengikuti langkah-langkah setan*. Setan bisa menjerumuskan manusia dari hal-hal yang dikonsumsi manusia, baik melalui cara perolehannya yang tidak halal maupun menyantap yang kandungannya tidak halal dan atau makanan yang tidak baik. Bukankah dulu leluhur manusia, Nabi Adam As. dan istrinya, terperdaya melalui pintu makanan? Sehingga setan pun bisa dengan mempermudah perperdaya anak turunya melalui makanan pula, dengan cara perolehannya yang tidak halal dan mengkonsumsi bahan yang tidak halal[32, p. 354].

2. Maqashid al-Qur'an Surat al-Maidah: 87-88.

Dalam Surat al-Maidah ayat 87-88, anjuran makan yang halal nan baik ditujukan kepada orang yang beriman. Ayat 87 diturunkan berkaitan erat dengan beberapa sahabat yang tidak tepat dalam memahami ayat-ayat al-Qur'an yang harus diamalkan. Mereka menyangka, bahwasanya untuk memperdekatkan diri kepada Sang Pencipta haruslah bisa menjauhkan diri dari semua hal yang mendatangkan nikmat dunia. Mereka mengira, bahwasanya kenikmatan duniawi menyebabkan kelalaian mendekati diri kepada Allah. Bukankah Allah telah menjadikan dan menyediakan hal-hal yang baik di muka bumi ini yang dihalalkan untuk mereka semua. Selain itu juga Allah menjelaskan hal-hal yang diharamkan dalam al-Qur'an agar dijauhi. Kendatipun Allah telah menyediakan segala yang dihalalkan dan yang baik bagi manusia, tetapi harus manusia yang mengkonsumsi apa-apa yang dihalalkan Allah tidak boleh berlebihan. Terlebih dalam ayat ini Allah melarang hamba-Nya dari perbuatan dan sikap yang berlebihan dan melampaui batas-batas kewajaran.[33, p. Vol. 1, 391]

Banyak contoh tentang perbuatan dan sikap yang melampaui

batas, semisal, dalam makan dan minum ia makan dan minum yang halal namun berlebih-lebihan. Padahal sesuatu yang masuk ke perut apabila berlebihan akan berpotensi mengundang penyakit dan mendatangkan kemalasan dalam beraktifitas dan beribadah. Melampaui batas dalam makan dan minum juga bisa diartikan ia memakan barang halal namun makanan itu secara medis menjadi larangan baginya karena ia mempunyai riwayat penyakit mengharuskan ia untuk tidak memakan makanan tertentu. Maka hal itu akan mendatangkan bahaya bagi kesehatannya.

Sedangkan pada ayat 88, Allah memerintahkan kepada hamba-Nya yang beriman agar mereka mengkonsumsi produk halal dari rizki yang halal lagi baik, yang telah dikaruniakan-Nya kepada mereka. Kata halal di sini mengandung pengertian, bendanya halal bendanya dan cara memperolehnya juga halal. Sedangkan kata *thayyib* (baik) dimaksudkan dari cara memanfaatkannya, yakni yang mengandung maslahat dan manfaat bagi tubuh manusia, mengandung vitamin, gizi, protein dan manfaat lainnya. Sementara itu makanan yang tidak baik, selain tidak mengandung gizi dan vitamin, juga makanan dan minuman apabila dikonsumsi akan mendatangkan bahaya dan dapat merusak kesehatannya.[34, p. 255] Dengan demikian, secara implisit ayat ini memerintahkan untuk mengkonsumsi produk halal yang mengandung manfaat bagi kehidupan manusia.

Jargon 'halal dan baik' ini hendaknya terus menjadi perhatian masyarakat dalam menentukan sesuatu yang akan dimakan dan dikonsumsi untuk dirinya dan keluarganya, sebab sesuatu yang dimakan dan diminum tidak hanya mempengaruhi jasmaninya saja, namun juga dapat mempengaruhi rohaninya. Tidak ada larangan bagi seorang mukmin yang mempunyai kemampuan untuk menikmati sesuatu yang makanan dan minuman yang lezat, dan menggauli istrinya, namun harus memperhatikan pelbagai ketentuan yang

telah ditetapkan syari'at, yakni; halal, baik dan tidak melampaui batas. Oleh karena itu, pada penggalan akhir ayat ini Allah memberi peringatan kepada orang mukmin agar berhati-hati dan dalam menentukan makanan dan minuman serta kenikmatan lainnya. Jangan sampai mereka menetapkan hukum sesuai ke-mauan diri sendiri, serta tidak melampaui batas dalam menikmati segala sesuatu yang telah dihalalkan Allah Swt.

3. Maqashid al-Qur'an Surat al-Nahl: 114

Maqashid yang terdapat pada ayat ini adalah Allah menyuruh kaum Muslimin untuk mengkonsumsi makanan halal dan baik dari rezeki yang telah Allah Swt. anugerahkan kepada mereka, baik makanan itu asal mulanya dari tanaman ataupun binatang. Konsep makanan halal dan baik pada ini juga hampir sama dengan ayat-ayat sebelumnya yaitu makanan dan minuman yang tidak diharamkan dan tidak pula menyalahi aturan syariat untuk dikonsumsi (dimakan serta diminum). Sedangkan makanan yang baik adalah makanan dan minuman yang tidak mendatangkan mudarat apabila disantap dan diminum, sehingga makanan itu enak, lezat, tidak menjijikkan.[34] Dengan dasar tersebut, Allah menganjurkan untuk mengkonsumsi makanan halal dan baik.

Makanan yang halal dan baik bisa berasal dari tanaman hasil bumi maupun hewan. Semua diperuntukkan manusia agar mereka bersyukur atas segala karunia ini. Kemurahan Allah kepada manusia harus dibalas manusia dengan setidaknya menyebut nama Allah ketika makan dengan membaca basmalah dan bersyukur dengan membaca alhamdulillah ketika selesai makan dan minum. Bersyukur dalam hal ini juga mengkonsumsi produk-produk halal yang bukan hanya makanan dan minuman semata. Namun juga segala jenis produk yang biasa dipergunakan oleh manusia dalam kehidupannya. Karena dengan mengkonsumsi produk halal ini manusia

umumnya dan kaum muslimin secara khusus dapat hidup nyaman tidak dibayangi rasa khawatir karena menggunakan produk yang haram yang bisa mendatangkan murka dari Allah swt.

4. Maqashid ayat-ayat halal dan thayyib dalam Produk Halal

Dari ayat-ayat di atas dapat digali kandungan maqashid al-Qur'annya. Ayat-ayat tersebut sejatinya sangat menganjurkan bagi seluruh manusia untuk mengkonsumsi produk yang halal dan baik. Tujuan ini sangat selaras dengan maqasyid syariat. Apabila seseorang mengkonsumsi produk halal maka; pertama, ia telah menjaga agamanya, karena hal ini adalah perintah agama. Kedua, ia telah menjaga jiwanya, karena dengan produk halal dan baik, ia menghindari mengkonsumsi makanan yang haram dan yang membahayakan jiwanya. Ketiga, ia telah menjaga akalinya, sebab dengan mengkonsumsi produk halal ia bisa menjauhi makanan minuman yang haram yang bisa merusak akalinya, seperti arak, narkoba dan lainnya. Keempat, ia telah menjaga keturunannya, karena dengan mengkonsumsi halal, ia juga bisa mengajak keluarganya bisa makan dan minum yang halal dan baik. Kelima, ia juga telah menjaga hartanya, karena dengan mengkonsumsi produk halal ia telah berhasil mempergunakan hartanya untuk dipergunakan untuk yang halal dan baik.[33]

Selaras dengan Maqashid al-Syari'ah, maqasyid al-Qur'an pun mewujudkan kemaslahatan bagi manusia di dunia dan akhirat. Imam al-Ghazali dan al-Syathibi menyatakan bahwa kemaslahatan dibagi menjadi tiga, 1) kemaslahatan bersifat primer (dlaruriyah), 2) sekunder (hajiyah), 3) bersifat tersier (tahsiniyah). Maslahat primer, adalah suatu hal yang wajib ada untuk dapat mewujudkan maslahat agama di dunia. Jika sesuatu itu hilang, makan maslahat bagi manusia itu sulit terealisasi, bahkan bisa mendatangkan madharat dan kerusakan. Ini berarti mengkonsumsi dan menggunakan produk

halal itu sangat urgen, produk ini hanya sebatas pada makanan dan minuman semata, namun juga produk lain yang tidak langsung dikonsumsi secara langsung, seperti obat-obatan dan kosmetik.[35] Ini selaras dengan apa yang di sabda Nabi Muhammad Saw. yang menganjurkan kepada kaum muslimin untuk menjauhi segala sesuatu yang mengandung syubhat apalagi haram.

Menggunakan produk halal dapat memberikan rasa nyaman. Menggunakan produk yang halal juga bisa menghindarkan diri dari rasa khawatir dan rasa bersalah. Mengonsumsi produk yang halal juga berarti bisa menjaga agama (*hifz al-din*) dan bisa menghindarkan diri dari keraguan dan rasa was-was. Sebaliknya, penggunaan produk yang tidak halal akan berimbas pada lenyapnya kebahagiaan dan kenikmatan serta munculnya kerugian bagi dirinya. Untuk bisa menjaga hal tersebut dibutuhkan 2 (dua) perkara; 1), menjaga keberadaan syariat, karena ini merupakan aspek utama untuk menguatkan pondasi dan kaidah syariat. 2) menghindari kepunahan syariat dengan cara menghindari pelanggaran syariat baik secara langsung maupun tidak langsung.

Referensi

- [1] A. Atabik, *Repetisi Redaksi al-Qur'an (Memahami Ayat-Ayat al-Qur'an yang Diulang)*. Yogyakarta: Idea Press, 2014.
- [2] L. Jamaa, "Dimensi Ilahi dan Dimensi Insani dalam Maqashid al-Syari'ah," *Asy-Syir'ah J. Ilmu Syari'ah dan Huk.*, vol. 45, pp. 1251–1270, 2011.
- [3] A. Mutakin, "Teori Maqâshid Al Syari'ah Dan Hubungannya Dengan Metode Istinbath Hukum," *Kanun J. Ilmu Huk.*, vol. 19, no. 3, pp. 547–570, 2017.
- [4] A. Taufiq, "Pemikiran Abdullah Ahmed An-Naim tentang Dekonstruksi Syari'ah sebagai Sebuah Solusi," *Int. J. Ihya 'Ulum al-Din*, vol. 20, no. 2, pp. 145–166, 2018.
- [5] M. Ilyas, "Sertifikasi dan Labelisasi Produk Halal Perspektif Maslahat," *J. Al-Qadau Peradil. dan Huk. Kel. Islam*, vol. 4, no. 2, pp. 357–376, 2018.

- [6] A. I. Faris, *Maqayis al-Lughah*. Kairo: Dar al-Hadis, 2008.
- [7] F. Abadi, *Qamus al-Muhith*. Beirut: Dar al-Kutub al-Ilmiyah, 1997.
- [8] M. K. Al-Qattan, *Mabahis fi Ulum al-Qur'an*. Kairo: maktabah al Wahbah, 2009.
- [9] A. al-K. Hamidi, *Madkhal Ila Maqashid al-Qur'an*. Beirut: Maktabah al-Rusyd, 2007.
- [10] A. Fawaid, "Maqâshid al-Qur'ân dalam Ayat Kebebasan Beragama Menurut Thahâ Jâbir al-'Alwânî," *Madania J. Kaji. Keislam.*, vol. 21, no. 2, pp. 113–126, 2017.
- [11] M. Bushiri, "TAFSIR AL-QUR'AN DENGAN PENDEKATAN MA-QÂSHID AL-QUR'ÂN PERSPEKTIF THAHA JABIR AL-'ALWANI," 2019.
- [12] W. A. A. Zayd, *Metode Tafsir Maqasidi: Memahami Pendekatan Baru Penafsiran al-Qur'an, terj. Ulya Fikriyati*. Jakarta: Qaf Media Kreativa, 2019.
- [13] A. Mustaqim, "Argumentasi Keniscayaan Tafsir Maqasidi Sebagai Basis Moderasi Islam," Yogyakarta: UIN Sunan Kalijaga, 1999.
- [14] A. Raisuni, *Maqashid al-Maqashid, al-Ghayat al-Ilmiyyah wa al-'Amaliyyah Limaqashid al-Syari'ah*. Cairo: Dar Arabia lin-Nasr wa Abhats, 2013.
- [15] J. Auda, *Maqashid al-Syari'ah Dalil li al-Mubtadi'in*. Virginia: The International Institute of Islamic Tought (IIIT), 2010.
- [16] I. bin M. Al-Syathibi, *Al-Muwafaqat fi Ushul al- Syari'ah*. Beirut: Dar al-Kutub al-Ilmiyyah, 2013.
- [17] N. Nurnazli, "Penerapan Kaidah Maqâshid Syariah Dalam Produk Perbankan Syariah," *Ijtima'iyya J. Pengemb. Masy. Islam*, vol. 7, no. 1, pp. 43–66, 2014.
- [18] M. al-S. Al-Islamiyyah, *Muhammad Thahir Ibnu Asyur*. Qatar: Wuzarah al-Auqaf wa al-Syu'un al-Islamiyyah, 2004.
- [19] M. Hasan, "Penafsiran Al-Quran berbasis maqasid asy-syari'ah: studi ayat-ayat persaksian dan perkawinan beda agama." UIN Walisongo, 2018.
- [20] U. Umayah, "TAFSIR MAQASHIDI: METODE ALTERNATIF DALAM PENAFSIRAN AL-QUR'AN," *Diya Al-Afkar J. Stud. al-Quran dan al-Hadis*, vol. 4, no. 01, 2016.
- [21] H. M. F. Al-Shafi'i, *Al-Dalil al-Mufahras li Alfaz al-Qur'an*. Cairo: Der el-Hadis, 2000.

- [22] M. F. A. Al-Baqi, “al-Mujam al-Mufahras li Alfadz al-Qur’an,” *Beirut Dar al-Fikr*, 1997.
- [23] R. Al-Isfahani, “al-Mufradat fi Gharib al-Qur’an,” *Qom Darol-kotob Publ.*, p. 297, 1961.
- [24] Y. Al-Qardhawi, “Halal dan Haram dalam Islam, terj,” *Zulkifli Mohamad al-Bakri. Negeri Sembilan Pustaka Cahaya Kasturi Sdn Bhd*, 2014.
- [25] A. Akbar, “Metode Ijtihad Yusuf Al-Qardhawi dalam Fatawa Mu’ashirah,” *J. Ushuluddin*, vol. 18, no. 1, pp. 1–20, 2012.
- [26] A. bin M. Al-Jurjani, “al-Ta’rifat,” *Mustafa al-Babi al-Halabi, Mesir*, 1938.
- [27] A. H. Askari and M. I. Salim, *Furuq al-lughawiyah*. Dar al-‘Ilm wa-al-Thaqafah.
- [28] M. Ali, “Konsep Makanan Halal dalam Tinjauan Syariah dan Tanggung Jawab Produk Atas Produsen Industri Halal,” *AHKAM J. Ilmu Syariah*, vol. 16, no. 2, pp. 291–306, 2016, doi: 10.15408/ajis.v16i2.4459.
- [29] M. A. M. MOHAMMAD ABABILIL MUJADDIDYN, “SERTIFIKASI HALAL TERHADAP PRODUK IMPOR DALAM PERPEKTIF MAJELIS ULAMA INDONESIA (MUI) DAN BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN (BPOM),” 2015.
- [30] M. A. Karim(ed), *Perilaku Komunitas Muslim Perkotaan dalam Mengonsumsi Produk Halal*. Jakarta: Puslitbang Kehidupan Keagamaan Badan Litbang dan Diklat Kementerian Agama RI, 2013.
- [31] A. H. al Farmawi, “Metode Tafsir Maudhui, ed. terjemah oleh Suryan A,” *Jamrah,(Jakarta PT. Graf. Persada, 19940)*.
- [32] M. Q. Shihab, *Tafsir al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qur’an, Vo. 1*. Jakarta: Lentera Hati, 2000.
- [33] T. Penyusun, “Al-Qur’an dan Tafsirnya: Tafsir Kemenag RI,” *Jakarta: Lentera Abadi*, 2010.
- [34] S. bin H. Al-Qanuji, *Fath al-Bayan fi Maqashid al-Qur’an*. Beirut: Maktabah al-Ashriyah.
- [35] S. Khatib, “Konsep Maqashid Al-Syariah: Perbandingan Antara Pemikiran Al-Ghazali Dan Al-Syathibi,” *J. Ilm. Mizani Wacana Hukum, Ekon. Dan Keagamaan*, vol. 5, no. 1, pp. 47–62, 2018.

BAB III

SISTEM JAMINAN HALAL DAN HAZARD ANALYSIS CRITICAL CONTROL POINTS (HACCP)

Sulistyo Prabowo

*Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Universitas Mulawarman Samarinda Kalimantan Timur
Unit Layanan Strategis Halal Center
Universitas Mulawarman Samarinda Kalimantan Timur*

A. Pendahuluan

Jika kita mengikuti perkembangan berita tentang keamanan pangan di Indonesia, maka yang selalu muncul setidaknya ada empat masalah utama saat ini yaitu, cemaran mikroba karena rendahnya kondisi hygiene dan sanitasi, cemaran kimia karena bahan baku yang sudah tercemar, penyalahgunaan bahan berbahaya pada pangan dan yang terakhir yaitu penggunaan bahan tambahan pangan (BTP) yang melebihi batas maksimum yang diizinkan.

Tidak dapat dipungkiri bahwa definisi keamanan pangan yang berkembang di dunia didominasi oleh masifnya informasi dari negara barat. Keamanan Pangan mengacu pada penanganan, persiapan, dan penyimpanan makanan dengan cara terbaik untuk mengurangi risiko seseorang menjadi sakit akibat penyakit bawaan makanan. Prinsip keamanan pangan bertujuan untuk mencegah pangan agar tidak terkontaminasi yang dapat menyebabkan keracunan pangan. Ini dicapai melalui berbagai cara diantaranya adalah membersihkan dan melakukan sanitasi semua permukaan, peralatan, dan perkakas dengan benar, menjaga kebersihan pribadi, terutama mencuci tangan, menyimpan, mendinginkan dan memanaskan

makanan dengan benar berkaitan dengan suhu, lingkungan, dan peralatan serta menerapkan pengendalian hama yang efektif. Dalam perkembangannya sekarang keamanan pangan juga diupayakan melalui pemahaman alergi makanan, keracunan makanan dan intoleransi makanan.

B. Keamanan Pangan

Keamanan pangan digunakan sebagai disiplin ilmu yang menjelaskan penanganan, persiapan, dan penyimpanan makanan dengan cara yang mencegah penyakit yang dapat ditularkan melalui makanan yang terkontaminasi. Kontaminasi makanan terjadi dalam proses produksi, pengangkutan, pengemasan, penyimpanan, penjualan dan proses memasak. Kontaminasi dapat bersifat fisik, kimia, dan biologis.

Dalam perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi pangan sekarang, banyak muncul sistem manajemen keamanan pangan, yaitu sistem yang mengidentifikasi, mengevaluasi dan mengendalikan bahaya keamanan pangan. Sistem ini dibuat untuk memberikan jaminan keamanan yang lebih baik sejalan dengan tuntutan perlindungan konsumen, perkembangan teknologi pengolahan, perubahan sistem rantai pasokan barang, perdagangan internasional yang semakin terbuka dan meningkatnya kekhawatiran terorisme menggunakan bahan pangan sebagai senjata yang mematikan.

Dalam Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 18 Tahun 2012 Tentang Pangan disebutkan bahwa Keamanan Pangan adalah kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah Pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia, dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan, dan membahayakan kesehatan manusia serta tidak bertentangan dengan agama, keyakinan, dan budaya masyarakat sehingga aman untuk dikonsumsi. Pada Pasal 67 lebih lanjut dijelaskan melalui ayat (1) Keamanan Pangan diselenggarakan

untuk menjaga Pangan tetap aman, higienis, bermutu, bergizi, dan tidak bertentangan dengan agama, keyakinan, dan budaya masyarakat, dan ayat (2) Keamanan Pangan dimaksudkan untuk mencegah kemungkinan cemaran biologis, kimia, dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan, dan membahayakan kesehatan manusia.

Penyelenggaraan Keamanan Pangan dijelaskan dalam Pasal 69, yaitu dilakukan melalui: sanitasi pangan; pengaturan terhadap bahan tambahan Pangan; pengaturan terhadap pangan produk rekayasa genetik; pengaturan terhadap iradiasi pangan; penetapan standar kemasan pangan; pemberian jaminan keamanan pangan dan mutu pangan; dan jaminan produk halal bagi yang dipersyaratkan.

Dimasukkannya jaminan produk halal sebagai salah satu faktor keamanan pangan adalah sebuah terobosan besar dalam UU 18/2012 ini. Hal ini dipahami sebagai upaya untuk melindungi mayoritas penduduk Indonesia yang muslim. Namun demikian implementasi klausul halal ini belum begitu terlihat dalam diksi yang digunakan oleh pemangku kepentingan di bidang pengawasan obat dan makanan yang beredar, sehingga belum dirasakan menjadi masalah utama keamanan pangan di Indonesia.

Apa hubungan antara halal dengan keamanan makanan? Tulisan ini berupaya untuk mendefinisikan kembali makna keamanan pangan dalam pandangan agama Islam sehingga dapat memberikan pemahaman yang lebih komprehensif.

C. Konsep Keamanan Pangan dalam Islam

Dalam Al-Qur'an salah satu ayat yang menyebutkan kriteria tentang makanan salah satunya adalah QS al-Baqarah ayat 168.

“Wahai sekalian manusia, makanlah yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi, dan janganlah mengikuti langkah-langkah setan. Sesungguhnya setan adalah musuh yang nyata bagi kalian”.

Dalam ayat di atas, Allah menyuruh manusia untuk memakan makanan yang *halal* dan *thayyib* dari rezeki yang diberikan Allah kepada mereka, baik makanan itu berasal dari binatang maupun tanaman. Makanan yang halal ialah makanan dan minuman yang dibenarkan oleh agama untuk dimakan dan diminum. Makanan yang *thayyib* ialah makanan dan minuman yang dibenarkan untuk dimakan atau diminum oleh kesehatan, termasuk di dalamnya makanan yang bergizi, enak, dan sehat. Makanan yang halal lagi baik inilah yang diperintahkan oleh Allah untuk dimakan dan diminum. Makanan yang dibenarkan oleh ilmu kesehatan sangat banyak, dan pada dasarnya boleh dimakan dan diminum.

1. Halal

Dalam Kamus Besar Bahasa Indonesia, kata halal (Arab: حلال, ḥalāl; ‘diperbolehkan’) adalah segala objek atau kegiatan yang diizinkan untuk digunakan atau dilaksanakan dalam agama Islam. Istilah ini dalam kosa kata sehari-hari lebih sering digunakan untuk menunjukkan makanan dan minuman yang diizinkan untuk dikonsumsi menurut Islam, menurut jenis makanan dan cara memperolehnya. Lawan *halal* adalah *haram*. Halal menjadi salah satu dari lima hukum yang dikenal dalam agama Islam, yaitu: *fardhu* (wajib), *mustahab* (disarankan), *halal* (diperbolehkan), *makruh* (dibenci), *haram* (dilarang).

Pengertian ini tentu saja sangat tidak memadai karena mengurangi makna yang sebenarnya terkandung. Halal mempunyai makna lain yang lebih luas. Halal bisa diartikan menempatkan sesuatu sesuai dengan tempatnya. Hukum semua benda dibolehkan untuk manusia, karena dunia diciptakan untuk manusia. Namun ketika digunakan tidak sesuai peruntukannya maka dinamakan tidak halal. Halal juga bermakna melepaskan ikatan. Ketika seorang muslim dihadapkan pada makanan *syubhat*, pasti ada keraguan

untuk mengonsumsinya. Namun ketika diberitahukan bahwa makanan tersebut sudah jelas halal, maka hilang perasaan terikat dan merasa 'plong' untuk memakannya (Somad, 2020).

Demikian juga haram, kata ini tidak sederhana diartikan sebagai dilarang. Masjidil haram bukan berarti masjid yang dilarang. Bulan haram bukan berarti bulan yang dilarang. Haram bisa bermakna terhormat atau dimuliakan. Ketika seorang muslim diharamkan memakan barang yang haram atau dicegah melakukan perbuatan yang haram, maka makna sesungguhnya adalah ia sedang dimuliakan. Pemahaman ini penting sehingga ketika dihadapkan pada perkara haram, seseorang seharusnya tidak akan menolak atau menentang, namun justru bersyukur karena sedang dimuliakan (Somad, 2020).

Ditegaskan juga dalam QS. Al A'raaf ayat 157 bahwa yang halal itu pasti baik dan yang haram itu pasti buruk bagi manusia.

Artinya: "(Yaitu) orang-orang yang mengikuti Rasul, Nabi yang ummi (tidak bisa baca tulis) yang (namanya) mereka dapati tertulis dalam Taurat dan Injil yang ada pada mereka, yang menyuruh mereka berbuat yang makruf dan mencegah dari yang mungkar, dan yang menghalalkan segala yang baik bagi mereka dan mengharamkan segala yang buruk bagi mereka, dan membebaskan beban-beban dan belenggu-belenggu yang ada pada mereka. Adapun orang-orang yang beriman kepadanya, memuliakannya, menolongnya dan mengikuti cahaya yang terang yang diturunkan kepadanya (Alquran), mereka itulah orang-orang beruntung."

2. Thayyib

Lafaz *thayyib* disebut 13 kali di dalam Al Qur'an. Selengkapnya dapat dilihat dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Ayat Al Quran yang menyebutkan kata *halal* dan atau *thayyib*

Surah dan ayat	Terjemahan dari https://risalahmuslim.id
Al Baqarah (2), ayat 168	Wahai manusia! Makanlah dari (makanan) yang halal dan baik yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah setan. Sungguh, setan itu musuh yang nyata bagimu
Ali Imran (3), ayat 179;	Allah tidak akan membiarkan orang-orang yang beriman sebagaimana dalam keadaan kamu sekarang ini, sehingga Dia membedakan yang buruk dari yang baik .
An Nisaa (4), ayat 2	Dan berikanlah kepada anak-anak yatim (yang sudah dewasa) harta mereka, janganlah kamu menukar yang baik dengan yang buruk, dan janganlah kamu makan harta mereka bersama hartamu.
An Nisaa (4), ayat 43	Adapun jika kamu sakit atau sedang dalam perjalanan atau sehabis buang air atau kamu telah menyentuh perempuan, sedangkan kamu tidak mendapat air, maka bertayamumlah kamu dengan debu yang baik (suci) ; usaplah wajahmu dan tanganmu dengan (debu) itu.
Al Maa'idah (5), ayat 6,	Dan jika kamu sakit atau dalam perjalanan atau kembali dari tempat buang air (kakus) atau menyentuh perempuan, maka jika kamu tidak memperoleh air, maka bertayamumlah dengan debu yang baik (suci) ; usaplah wajahmu dan tanganmu dengan (debu) itu. Allah tidak ingin menyulitkan kamu, tetapi Dia hendak membersihkan kamu dan menyempurnakan nikmat-Nya bagimu, agar kamu bersyukur.
Al Maa'idah (5), ayat 88	Dan makanlah dari apa yang telah diberikan Allah kepadamu sebagai rezeki yang halal dan baik , dan bertakwalah kepada Allah yang kamu beriman kepada-Nya
Al Maa'idah (5), ayat 100	Katakanlah (Muhammad), "Tidaklah sama yang buruk dengan yang baik , meskipun banyaknya keburukan itu menarik hatimu, maka bertakwalah kepada Allah wahai orang-orang yang mempunyai akal sehat, agar kamu beruntung
Al A'raaf (7), ayat 58;	Dan tanah yang baik , tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan izin Tuhan; dan tanah yang buruk, tanaman-tanamannya yang tumbuh merana.
Al Anfaal (8), ayat 37	agar Allah memisahkan (golongan) yang buruk dari yang baik dan menjadikan (golongan) yang buruk itu sebagiannya di atas yang lain, lalu kesemuanya ditumpukkan-Nya, dan dimasukkan-Nya ke dalam neraka Jahanam. Mereka itulah orang-orang yang rugi

Al Anfaal (8), ayat 69;	Maka makanlah dari sebagian rampasan perang yang telah kamu peroleh itu, sebagai makanan yang halal lagi baik , dan bertakwalah kepada Allah.
An Nahl (16), ayat 114;	Maka makanlah yang halal lagi baik dari rezeki yang telah diberikan Allah kepadamu; dan syukurilah nikmat Allah, jika kamu hanya menyembah kepada-Nya
Al Hajj (22), ayat 24;	Dan mereka diberi petunjuk kepada ucapan-ucapan yang baik dan diberi petunjuk (pula) kepada jalan (Allah) yang terpuji
Faathir (35), ayat 10.	Kepada-Nyalah akan naik perkataan-perkataan yang baik , dan amal kebajikan Dia akan mengangkatnya. Adapun orang-orang yang merencanakan kejahatan mereka akan mendapat azab yang sangat keras, dan rencana jahat mereka akan hancur

Kata *thayyib* banyak disebutkan dalam berbagai bentuk kata, yaitu dengan lafal *thayyiban*, *thayyibah*, dan *thayyibât*. Lafaz ini adalah mashdar dari lafaz *thayyaba* yaitu menjadikan sesuatu baik dan suci. *Ath thayyib* mengandung makna setiap sesuatu yang melezatkan indera atau diri, setiap sesuatu yang kosong dari yang menyakitkan, kotor, atau najis. *Ath thayyib* juga bermakna orang yang lepas dari segala kehinaan dan bersifat dengan segala kemuliaan. Ungkapan *fulaan thayyibal qalb* bermakna si fulan batin (hatinya) bersih, begitu juga dengan *thayyibal izaar* atau kain yang bersih. *Ath thayyib minal bilaad* artinya tanah yang baik.

Oleh karena itu lafaz ini dapat digunakan pada perkara akhlak, percakapan dan manusia secara umumnya. Di dalam Al Qur'an lafaz *thayyib* mengandung beberapa makna:

a. Sehat, aman dan tepat

Bila dikaitkan dengan makanan ia berarti makanan yang sehat karena tidak kotor atau rusak dari segi zatnya, atau dicampuri benda najis. Ada juga yang mengartikannya sebagai makanan yang mengundang selera bagi yang memakannya dan tidak membahayakan fisik dan akalunya, jadi lafaz *thayyib* dalam makanan adalah makanan yang sehat, tepat dan aman. Sehat berarti makanan yang memiliki zat yang cukup

dan seimbang seperti madu (An Nahl: 69); padi (As Sajadah: 27); ikan (An Nahl: 14) dan sebagainya. Tepat berarti sesuai dengan keperluan pemakan, tidak lebih dan tidak kurang, dan arti aman ialah dengan memperhatikan sisi takwa yang intinya adalah berusaha menghindari segala yang mengakibatkan siksa dan terganggunya rasa aman.

b. Suci

Karena lafaz ini dikaitkan dengan perkataan *sha'üdan* yang berarti debu atau tanah. Makna ini terdapat dalam surah An Nisaa: 43 dan Al Maa'idah: 6. Lafaz *sha'üdan thayyiban* bermakna debu yang bersih atau suci.

c. Perkataan yang baik Dalam surah Faathir ia bermakna setiap perkataan yang baik berupa doa, zikir, membaca Al Qur'an, tasbih, tahmid dan sebagainya.

d. Bumi atau tanah yang baik *Thayyib* dikaitkan dengan perkataan 'al balad yaitu negeri, seperti yang terdapat dalam surah Al A'raaf : 58. Makna *al baladuth thayyib* ialah tanah yang baik dan subur yang mengeluarkan tumbuh-tumbuhannya dengan subur dan produktif.

e. Perumpamaan bagi orang Mukmin *Ath thayyib* ada dua jenis: bersifat jasmani seperti makna-makna di atas, dan yang bersifat rohani adalah perkara yang paling baik dalam mengenal Allah dan taat kepada perintah Allah.

Thayyib menjadi lawan kata dari *khabits*, merujuk pada al-A'raf: 157 di atas. Makna *khabits*, yang merupakan turunan kata dari *khabutsa – yakhbutsu – khubtsan*, diartikan sebagai sesuatu yang rusak, buruk, atau tidak menyenangkan. Karena itulah ia relevan menjadi lawan kata dari *thayyib* yang maknanya adalah baik atau menyenangkan. Dari ayat-ayat di atas dipahami bahwa apa yang *thayyib* atau dipandang baik, maka ia halal. Sedangkan apa

yang dipandang sebagai *khabits* atau buruk, maka ia diharamkan.

Menurut Al-Qur'an dan Hadits bahwa salah satu kriteria produk halal adalah ia mesti *thayyib* dan tidak mengandung *mu-dharat*. Lafal *thayyibat* mencakup makna halal karena makanan yang *thayyib* tidak akan mengandung bahaya, larangan maupun *madharat* lain di dalamnya, sehingga ia halal. Jika yang *thayyib* berarti halal, maka yang buruk (*khabits*) dapat dinilai haram. Sedangkan dalam konteks layak, enak, atau lezat, lumrahnya manusia memandang kelayakan, rasa dan lezatnya makanan atau minuman sebagai hal yang baik. Pandangan seperti ini meniscayakan bahwa layak tidaknya makanan/minuman untuk dikonsumsi dinilai dari pengetahuan manusia seputar kelayakan dan manfaat barang tersebut.

Dengan mempertimbangkan kompleksitas rantai pasokan makanan moderen saat ini pemahaman halal sebagai indikator yang berdiri sendiri tidak lagi cukup. Oleh karena itu, dalam lingkungan bisnis saat ini, konsep halal harus dimasukkan dengan nilai *thayyib*, salah satu yang mewujudkan esensi kebersihan, kemurnian, aman dan tinggi yang lebih dikenal sebagai *Halallan-Toyyiban*.

Banyak cendekiawan Muslim yang menyatakan bahwa konsep *Toyyiban* dan *Halal* saling terkait. *World Halal Forum* menyebutkan bahwa produk halal adalah produk universal dan harus memiliki standar yang tinggi mengenai kualitas, keamanan, pengemasan dan pelabelan (WHF, 2009). Selain itu, sebuah penelitian melaporkan bahwa *Good Hygiene Practices* (GHP) dan *Good Manufacturing Practices* (GMP) adalah persyaratan wajib dalam persiapan makanan Halal (Rahman *et al.*, 2014). Pendekatan ini diperkenalkan sebagai konsep *Islamic Manufacturing Practice* (IMP).

Konsep *Halallan-Toyyiban* sesungguhnya bersumber dari dua sumber utama ajaran Islam yaitu Al Quran dan Hadist. Hukum Islam disebut sebagai *syariah* dan telah ditafsirkan oleh para sarjana

Muslim selama bertahun-tahun. Prinsip dasar hukum Islam sudah pasti dan tidak berubah. Namun, interpretasi dan penerapannya dapat berubah sesuai dengan waktu, tempat, dan keadaan. Selain dua sumber dasar hukum Islam, Alquran dan Hadist, sumber-sumber fiqh lain digunakan untuk menentukan kehalalan pangan, ketika situasi kontemporer tidak secara eksplisit tercakup dalam sumber-sumber dasar tersebut. Sumber petunjuk ketiga disebut *Ijihad*, atau mengerahkan diri sepenuhnya untuk mendapatkan jawaban atas masalah. Hal ini dapat dicapai dengan salah satu atau kedua proses berikut: *Ijma*, yang berarti kesepakatan pendapat, dan *Qiyas*, yang berarti penalaran dengan analogi. Isu terkini tentang organisme hasil rekayasa genetika (GMO), pakan ternak, hormon, dan lain-lain, didiskusikan berdasarkan dua konsep ini dan beberapa sumber lain yang lebih rendah dari yurisprudensi Islam. Sumber bahan yang tidak konvensional, bahan sintetis, dan inovasi dalam penyembelihan hewan dan pemrosesan daging adalah beberapa masalah yang dihadapi oleh cendekiawan Muslim dalam membantu konsumen membuat pilihan yang tepat (Regenstein, 2008).

Sementara pemahaman sekuler yang berkembang pasca keruntuhan kekhalifahan Ustmani menyebabkan perkembangan ilmu pengetahuan dirasakan terpisahkan dari ajaran agama. Hal ini menyebabkan aspek jaminan *Thoyyiban* ditangani sebagai entitas yang terpisah dari jaminan halal dan mengacu pada standard *Codex Alimentarius Commission* (CAC).

Codex Alimentarius Commission (CAC) adalah badan antar pemerintah internasional yang mengembangkan standar keamanan pangan dan komoditas berbasis ilmu pengetahuan, pedoman, dan rekomendasi untuk mempromosikan perlindungan konsumen dan memfasilitasi perdagangan dunia. Codex dibentuk oleh badan kerja sama dari dua organisasi Perserikatan Bangsa-Bangsa, yaitu Organisasi Pangan dan Pertanian (FAO) dan Organisasi Kesehatan Dunia

(WHO). Saat ini, Codex memiliki 165 negara anggota.

Codex didirikan pada tahun 1962 ketika FAO dan WHO menyadari perlunya standar pangan internasional untuk melindungi kesehatan konsumen dan untuk memandu industri makanan yang berkembang di dunia dalam menghasilkan makanan berkualitas. Codex bertugas mengembangkan standar makanan untuk diadopsi dan digunakan oleh negara-negara anggota. *Codex Alimentarius* sendiri merupakan kumpulan standar pangan internasional yang diadopsi oleh *Codex Alimentarius Commission* dan disajikan secara seragam. Tujuan dari standar ini adalah untuk melindungi kesehatan konsumen dan memfasilitasi praktik yang adil dalam perdagangan makanan.

Pendekatan sekuler ini dapat mengarah pada situasi yang menyebabkan produk yang sudah disertifikasi halal mungkin tidak aman atau tidak sesuai dengan kualitas yang ditentukan berdasarkan standard CAC atau dengan kata lain tidak *Thoyyiban*. Sebagai contoh, kasus di Negara Turki, dari sudut pandang pemerintah, mencatat, bahwa Institut Standard Turki, sebuah lembaga pemerintah yang bertanggung jawab atas berbagai standar, menyatakan bahwa masalah keamanan pangan akan didahulukan daripada masalah agama dan menambahkan bahwa kantor negara sekuler hanya dapat memutuskan status kehalalan pangan. Sementara itu, di Malaysia yang merupakan negara berdasarkan Islam, menurut Undang-Undang Uraian Perdagangan Pemerintah Malaysia tahun 1972, Halal harus tidak beracun atau membahayakan kesehatan. Standar MS 1500: 2009 menyatakan bahwa makanan halal harus aman dikonsumsi, tidak beracun, tidak memabukkan atau tidak berbahaya bagi kesehatan. Di sisi lain, definisi Halal dari CAC/GL 24-1997 tidak menyertakan klausul tentang keamanan (CAC, 2001). Ini hanya mengacu pada Prinsip Umum Codex tentang Higiene Pangan dan Standar Codex relevan lainnya selama produksi

makanan Halal. Hal ini menunjukkan bahwa pemerintah Malaysia dan standar Malaysia MS 1500: 2009 memiliki pendekatan “*Halal Toyyiban*” yang terpadu sedangkan pedoman Codex mengacu pada *Halal dan Toyyiban* secara independen (Neio Demirci, et.al., 2016).

Perkembangan sertifikasi halal sekarang semakin komprehensif. Aspek *Thayyib* tidak lagi terpisah dalam standard sistem jaminan halal. Latif *et al.* (2014) mencoba membandingkan sembilan lembaga sertifikasi halal di dunia dalam menerapkan standard sistem jaminan halal. Setidaknya ada tujuh aspek yang disepakati bersama yaitu: 1) tempatnya harus bersih dan tidak terkontaminasi, 2). penyembelihan hewan harus dilakukan oleh Muslim yang memenuhi syarat, 3). fasilitas dan peralatan tidak boleh terkontaminasi oleh barang non-halal, 4). hanya bahan Halal yang dapat digunakan untuk produk Halal, 5). bahan asal hewan harus berasal dari hewan halal yang disembelih sesuai dengan hukum Islam, 6). bahan kemasan tidak boleh mengandung bahan yang melanggar hukum dan berbahaya, serta 7). tidak boleh ada kontaminasi antara produk Halal dan non-Halal selama penanganan penyimpanan, pengangkutan dan pembuatan.

Di Indonesia, Majelis Ulama Indonesia juga sudah memasukkan aspek *Thayyib* ke dalam proses audit sertifikasi halal. Bagi produk yang terutama akan dipasarkan ke negara Uni Emirat Arab, persyaratan HACCP menjadi tambahan wajib. Sedangkan produk pangan yang lain wajib menerapkan minimum GMP ataupun harus ada prosedur tertulis yang menjamin produk tidak terkontaminasi benda asing dan mikroba atau bakteri patogen. Selain itu bahan yang digunakan juga harus sesuai dengan regulasi pemerintah yang berlaku. Audit pemenuhan regulasi terkait bahan-bahan untuk produk intermediet (pangan, obat dan kosmetik) yang dipasarkan di Indonesia mengacu pada PerKa BPOM No.HK.03.1.23.07.11.6664/2011 tentang Pengawasan Kemasan Pangan, PerKa BPOM No. 18/

2015 tentang Persyaratan Teknis Bahan Kosmetika, PerKa BPOM No. 10/2016 tentang Penggunaan Bahan Penolong Golongan Enzim dan Golongan Penyerap Enzim Dalam Pengolahan Pangan, PerKa BPOM No.22/2016 tentang Persyaratan Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Perisa, PerKa BPOM No.05/2017 tentang Pengawasan Pemasukan Bahan Obat Dan Makanan Ke Dalam Wilayah Indonesia, PerKa BPOM No. 07/2018 tentang Bahan Baku Yang Dilarang Dalam Pangan Olahan, dan Permenkes No. 33/2012 tentang Bahan Tambahan Pangan (LPPOM, 2020).

D. Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP)

Standar, pedoman, dan rekomendasi CAC berdampak besar pada produk makanan yang diperdagangkan secara internasional. Karya Codex secara historis mencakup pekerjaan substansial di bidang higiene pangan, termasuk pembentukan prinsip umum untuk produksi pangan higienis dan pengembangan kode praktik higienis untuk komoditas tertentu (Wehr, 2008). Salah satu rekomendasi yang dikeluarkan CAC adalah penerapan *Hazard Analysis Critical Control Points* (HACCP) di industri pangan.

Konsep HACCP dikembangkan pada tahun 1950-an melalui *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) dan Natick Laboratories untuk digunakan dalam manufaktur kedirgantaraan dengan nama "*Failure Mode Effect Analysis*" (Analisis Efek Mode Kegagalan). Pendekatan rasional untuk pengendalian proses untuk produk makanan ini dikembangkan bersama oleh Perusahaan Pillsbury, NASA, dan Laboratorium Natick Angkatan Darat A.S. pada tahun 1971 sebagai upaya untuk menerapkan program tanpa cacat pada industri pengolahan makanan. HACCP didirikan untuk menjamin bahwa makanan yang digunakan dalam program luar angkasa A.S. akan 100% bebas dari bakteri patogen. HACCP digambarkan sebagai metode sederhana namun sangat spesifik untuk mengiden-

tifikasi bahaya dan untuk menerapkan pengendalian yang tepat untuk mencegah potensi bahaya. HACCP diakui sebagai pendekatan yang rasional dan lebih baik untuk pengendalian produksi pangan yang dapat menentukan area kontrol paling penting untuk pembuatan makanan yang aman dan sehat.

HACCP menyediakan mekanisme untuk memantau operasi secara berkala dan untuk menentukan titik-titik yang penting untuk pengendalian bahaya penyakit bawaan makanan. Bahaya berpotensi menimbulkan kerugian bagi konsumen. Titik kendali kritis (CCP) adalah operasi atau langkah untuk menentukan tindakan pencegahan atau pengendalian dapat dilakukan yang akan menghilangkan, mencegah, atau meminimalkan bahaya (*hazard*) yang akan (telah) terjadi sebelum titik ini. Konsep HACCP telah menjadi program berharga untuk pengendalian proses bahaya mikroba. Pendekatan ini merupakan pertanda dari kecenderungan peningkatan sanitasi dan inspeksi makanan yang lebih canggih.

Konsep HACCP dibagi menjadi dua bagian: (1) analisis bahaya dan (2) penentuan titik kendali kritis. Analisis bahaya membutuhkan pengetahuan menyeluruh tentang mikrobiologi makanan dan pengetahuan tentang mikroorganisme yang mungkin ada, dan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup mereka. Keamanan dan penerimaan pangan sangat dipengaruhi oleh: (1) makanan mentah atau tambahan yang terkontaminasi, (2) kontrol suhu yang tidak tepat selama pemrosesan dan penyimpanan (penyalahgunaan suhu dan waktu), (3) pendinginan yang tidak tepat melalui kegagalan untuk mendinginkan hingga suhu pendingin dalam 2 hingga 4 jam, (4) penanganan yang tidak tepat setelah pemrosesan, kontaminasi silang (antara produk/antara makanan mentah dan olahan), (5) pembersihan peralatan yang tidak efektif atau tidak tepat, (6) kegagalan memisahkan produk mentah dan matang, (7) praktik kebersihan dan sanitasi karyawan yang buruk.

Proses evaluasi HACCP menjelaskan produk dan tujuan penggunaannya serta mengidentifikasi item makanan yang berpotensi berbahaya yang terkontaminasi dan mikroba yang berkembang biak selama pemrosesan atau persiapan makanan. Kemudian seluruh proses diamati. Analisis bahaya adalah prosedur untuk melakukan analisis risiko untuk produk dan bahan dengan membuat diagram proses untuk mencerminkan urutan produksi dan distribusi, kontaminasi mikroba, kelangsungan hidup, dan perkembangbiakan yang mampu menyebabkan penyakit bawaan makanan. Titik kendali kritis diidentifikasi dari diagram alir. Setiap kekurangan yang diidentifikasi diprioritaskan dan diperbaiki. Langkah-langkah pemantauan ditetapkan untuk mengevaluasi efektivitas. Program HACCP, dilaksanakan oleh industri makanan dan dipantau oleh badan pengatur, menyediakan industri dengan alat dan titik pemantauan dan digunakan untuk melindungi masyarakat konsumen secara efektif dan efisien.

Sistem HACCP adalah pendekatan yang direkomendasikan untuk meningkatkan keamanan pangan sejak dari ladang pertanian sampai di meja makan (*form farm to fork*). Ini adalah sistem pencegahan untuk mencegah pelanggaran keamanan pangan, melalui identifikasi, pengendalian dan pemantauan bahaya. Mortimore dan Wallace (2013) menyebutkan bahwa HACCP adalah sistem logis dari pengendalian pangan yang didasarkan pada pencegahan.

Langkah-langkah penting untuk pengembangan rencana HACCP adalah:

1. Pembentukan tim HACCP, termasuk orang yang bertanggung jawab atas rencana tersebut. Anggota tim harus mencakup karyawan dengan keahlian di berbagai bidang seperti: sanitasi, jaminan kualitas, dan operasi pabrik, pemasaran, manajemen personalia, dan komunikasi. Apabila beberapa keahlian tidak tersedia, diperlukan konsultan dari pihak luar.

HACCP harus diatur sebagai bagian dari program jaminan kualitas perusahaan.

2. Deskripsi jenis makanan dan distribusinya. Penjelasan lengkap dari produk harus dibuat termasuk informasi mengenai komposisi, struktur fisika/kimia (termasuk Aw, pH, dll.), perlakuan-perlakuan mikrosidal/statis (seperti perlakuan pemanasan, pembekuan, penggaraman, pengasapan, dll.), pengemasan, kondisi penyimpanan dan daya tahan serta metoda pendistribusiannya. Nama dan deskriptor lainnya termasuk persyaratan penyimpanan dan distribusi harus disediakan. Semua bahan mentah dan tambahan harus dicantumkan.
3. Identifikasi tujuan penggunaan dan calon konsumen. Sangat penting untuk mengidentifikasi konsumen yang dituju, terutama jika bayi dan orang dengan gangguan sistem imun lainnya adalah pelanggan yang ditargetkan.
4. Pengembangan diagram alir. Bagan alir harus disusun oleh tim HACCP. Dalam diagram alir harus memuat segala tahapan dalam operasional produksi. Bila HACCP diterapkan pada suatu operasi tertentu, maka harus dipertimbangkan tahapan sebelum dan sesudah operasi tersebut.
5. Verifikasi diagram alir. Tim HACCP harus memeriksa pelaksanaan di lapangan untuk memverifikasi keakuratan dan kelengkapan diagram alir. Modifikasi harus dilakukan seperlunya.
6. Menerapkan tujuh prinsip HACCP, yaitu:
 - 1) Melakukan analisis bahaya.
 - a) Identifikasi langkah-langkah dalam proses yang mungkin berpotensi signifikan akan terjadi bahaya.

- b) Buat daftar semua bahaya yang teridentifikasi terkait dengan setiap langkah.
 - c) Buat daftar tindakan pencegahan untuk mengendalikan bahaya.
- 2) Identifikasi dan dokumentasi TKK (titik kendali kritis) dalam prosesnya.
 - 3) Penetapan batas kritis untuk tindakan pencegahan yang terkait dengan setiap TKK yang teridentifikasi.
 - 4) Penetapan persyaratan pemantauan TKK, termasuk frekuensi pemantauan dan orang-orang yang bertanggung jawab atas kegiatan pemantauan tertentu.
 - 5) Penetapan tindakan korektif yang harus diambil ketika pemantauan menunjukkan adanya penyimpangan dari batas kritis yang ditetapkan. Tindakan tersebut harus mencakup pembuangan makanan yang terpengaruh secara aman dan koreksi prosedur atau kondisi yang menyebabkan situasi tidak terkendali
 - 6) Pembentukan prosedur untuk verifikasi bahwa sistem HACCP bekerja dengan benar. Personel perusahaan yang bertanggung jawab harus melakukan verifikasi kepatuhan terhadap rencana HACCP secara terjadwal.
 - 7) Pembentukan prosedur pencatatan yang efektif yang mendokumentasikan sistem HACCP dan memperbarui rencana HACCP ketika terjadi perubahan produk, kondisi manufaktur, dan bukti bahaya baru.

Semua jenis bahaya keamanan pangan (biologis, kimiawi, dan fisik) dianggap sebagai bagian dari sistem HACCP. Oleh karena itu, penerapan sistem keamanan pangan berbasis HACCP yang efektif harus memberikan kepercayaan kepada petani, produsen,

operator layanan makanan, dan pengecer bahwa makanan yang mereka sediakan aman. Ini dapat dan harus melibatkan semua orang di perusahaan karena setiap karyawan memiliki peran yang harus dijalankan.

Penerapan HACCP harus diawali dengan penerapan Praktik Manufaktur yang Baik (*Good Manufacturing Practices*, GMP) untuk mematuhi ketentuan bahwa semua makanan manusia bebas dari pemalsuan. Penekanan diberikan pada pencegahan kontaminasi produk dari sumber langsung dan tidak langsung. Praktik produksi yang baik adalah persyaratan sanitasi dan pemrosesan minimum yang diperlukan untuk memastikan produksi makanan yang sehat. GMP biasanya ditulis untuk masing-masing bidang berikut:

1. Personel. Praktik ini termasuk arahan untuk pengendalian penyakit, kebersihan, pendidikan dan pelatihan, dan pengawasan.
2. Gedung dan fasilitas. Bangunan di sekitar lahan, desain konstruksi pabrik, dan termasuk operasi sanitasi.
3. Perlengkapan dan perkakas. Semua peralatan pabrik dan perkakas harus dirancang dari bahan dan pengerjaan yang memfasilitasi pembersihan dan pemeliharaan yang memadai.
4. Produksi dan pengendalian proses. Praktik sanitasi untuk fungsi terkait produksi yaitu inspeksi, penyimpanan, dan pembersihan bahan baku; dan prosedur untuk operasi pemrosesan.
5. Catatan dan laporan. Catatan harus mencakup pengarsipan dan pemeliharaan untuk pemasok, pemrosesan dan produksi, dan distribusi.
6. Tindakan tingkat kerusakan. Tingkat ini adalah batas cacat yang akan diambil yang penetapannya atas dasar tidak ada bahaya bagi kesehatan.

7. Lain-lain. Ini termasuk pedoman lain seperti aturan pengunjung.

E. Sistem Jaminan Halal (SJH)

Sistem jaminan halal merupakan sistem kepengurusan yang terintegrasi, disusun, diterapkan, dan dipelihara untuk mengatur bahan, proses produksi, produk, sumber daya manusia, dan prosedur yang menjamin keberlangsungan proses produksi halal menurut persyaratan yang diberlakukan oleh lembaga sertifikasi melalui dokumen standar jaminan halal. Sebagai layaknya sebuah standar, maka sistem jaminan halal juga memuat beberapa seri yang masing-masing seri mengatur cakupan (*scope*), kriteria (*definition*), persyaratan (*requirements*), pemenuhan (*compliance*) dan sebagainya. Standar tersebut juga disusun melalui konsensus, transparansi, keterbukaan, dan mengadopsi standar international yang memungkinkan (LPPOM MUI, 2012).

SJH yang berkembang sekarang mengadopsi prinsip-prinsip sistem manajemen yang telah dikembangkan sebelumnya. Prinsip dalam SJH didasarkan atas komitmen, kebutuhan pelanggan, peningkatan mutu tanpa meningkatkan biaya dan memproduksi barang dari waktu ke waktu tanpa cacat, tanpa ada yang didaur ulang, dan tanpa adanya inspeksi sekalipun. Sistem jaminan halal juga mengadopsi prinsip lain dalam *Total Quality Management* model Ishikawa yang menuntut adanya peningkatan pengetahuan yang harus terjadi setiap saat pada setiap orang di seluruh jenjang organisasi, melalui pembelajaran, praktik dan partisipasi di dalam aktivitas manajemen untuk meningkatkan produktivitas.

Sistem jaminan halal mempersyaratkan bahwa proses produksi harus menerapkan cara produksi yang *halal* dan *thayyib*, artinya benar dan baik sejak dari penyediaan bahan baku sampai siap dikonsumsi oleh konsumen. Untuk memastikan itu, maka bahan

baku harus aman dari cemaran biologis, kimiawi, fisikawi, dan bahan haram. Proses produksi harus menggunakan alat dan tempat yang bersih dan higienis serta terhindar dari najis. Demikian juga penggunaan bahan tambahan dan penolong dalam produksi harus sesuai dengan ketentuan yang membolehkannya (Prabowo dan Abd Rahman, 2016). Dalam praktiknya, persyaratan-persyaratan tersebut sering digabungkan pada dokumen sertifikat lain seperti *Good Agriculture Practice* (GAP), *Good Manufacturing Practice* (GMP), *Good Handling Practice* (GHP), Cara Pengolahan Pangan yang Benar (CPPB), Cara Pengolahan Obat yang Benar (CPOB), Industri Rumah Tangga Pangan/Pangan Industri Rumah Tangga (IRTP/PIRT) dan lain-lain, yang memberikan jaminan keamanan dari segi hygiene dan sanitasi (Othman et al. 2016). Di industri besar implementasi Sistem Jaminan Halal juga sering digabung dengan sistem HACCP dengan menambahkan item haram sebagai komponen *hazard* yang harus diwaspadai. Dengan penerapan SJH, maka produsen dipastikan hanya akan menghasilkan produk yang aman untuk dikonsumsi oleh konsumen.

SJH memuat persyaratan yang dapat diaplikasikan pada semua kategori usaha termasuk industri pengolahan pangan, farmasi, dan kosmetika yang berbasis hasil pertanian, rumah potong hewan, restoran/katering, dan industri jasa (distributor, gudang, transportasi, eceran).

Di Indonesia, SJH yang berkembang adalah HAS 23000 yang dikeluarkan oleh Majelis Ulama Indonesia (MUI) sejak Maret 2012. HAS 23000 merupakan kompilasi aturan dalam memperoleh sertifikat halal dari LPPOM MUI (2012). HAS 23000 adalah suatu sistem manajemen terintegrasi yang menyusun, melaksanakan dan memelihara protokol untuk mengatur bahan, proses produksi, produk, sumber daya manusia dan prosedur untuk menjaga kelangsungan proses produksi halal sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan

oleh lembaga sertifikasi melalui standar dokumen jaminan halal. HAS 23000 merangkum regulasi yang telah lama dijalankan oleh LPPOM MUI dalam menjalankan tugas yang diberikan oleh MUI sejak tahun 1988. Sebagai standar, sistem jaminan halal juga memuat rangkaian dokumen yang mencakup ruang lingkup, definisi, persyaratan, kepatuhan, dan sebagainya. Standar tersebut juga dipilah melalui konsensus, transparansi, dan keterbukaan yang mengacu pada standar internasional yang diperbolehkan. Sistem jaminan halal juga memuat aturan, pedoman dan regulasi. HAS 23000 juga telah diakui secara internasional dan menjadi rujukan di beberapa negara lain.

Penerapan SJH harus sesuai dengan prinsip-prinsip tertentu seperti kejujuran, kepercayaan, keterlibatan partisipatif, dan penerimaan mutlak definisi halal. Kejujuran berarti organisasi harus menjelaskan spesifikasi dari setiap item yang digunakan dalam proses produksi di dalam industri, seperti yang disebutkan dalam manual SJH yang disediakan. Kepercayaan artinya industri diberi kewenangan untuk mengatur, melaksanakan dan memelihara SJH sesuai dengan situasi sebenarnya di industri. Keterlibatan partisipatif mengamanatkan bahwa organisasi harus melibatkan seluruh sumber daya manusia dari manajemen dan staf dalam memelihara penerapan SJH. Mutlak artinya semua bahan dalam keseluruhan proses harus tidak diragukan lagi status halalnya (LPPOM MUI, 2012).

Bagi perusahaan yang akan menerapkan SJH HAS 23000, ada sebelas kriteria yang harus dipenuhi yaitu:

1. Kebijakan Halal Perusahaan

Kebijakan halal adalah pernyataan tertulis komitmen manajemen puncak perusahaan untuk senantiasa menghasilkan produk halal secara konsisten serta menjadi dasar bagi penyusunan dan penerapan Sistem Jaminan Halal.

2. Tim Manajemen Halal

Tim Manajemen Halal adalah sekelompok orang yang ditunjuk oleh manajemen puncak sebagai penanggung jawab atas perencanaan, implementasi, evaluasi, dan perbaikan berkelanjutan sistem jaminan halal di perusahaan. Tim Manajemen Halal harus mencakup semua bagian yang terlibat dalam aktivitas kritis (wakil dari semua departemen/divisi/bagian yang bertanggung jawab atas perencanaan, implementasi, evaluasi, dan perbaikan berkelanjutan Sistem Jaminan Halal).

3. Pelatihan dan Edukasi

Pelatihan adalah suatu kegiatan yang bertujuan untuk meningkatkan pengetahuan (*knowledge*), keterampilan (*skill*) dan/atau perilaku (*attitude*) dari semua personel yang terlibat dalam aktivitas kritis. Aktivitas kritis mencakup seleksi pemasok dan persetujuan penggunaan bahan baku, formulasi produk, pembelian, pemeriksaan barang dagang, produksi, serta penyimpanan bahan dan produk.

4. Bahan

Bahan mencakup bahan baku, bahan tambahan, dan bahan penolong. Perusahaan harus menyusun prosedur yang dapat menjamin agar setiap bahan yang akan digunakan untuk produk yang disertifikasi telah disetujui LPPOM MUI.

5. Produk

Produk yang disertifikasi tidak boleh menggunakan nama yang mengarah pada sesuatu yang diharamkan atau ibadah yang tidak sesuai dengan syariah Islam.

6. Fasilitas Produksi

Fasilitas produksi yang pernah digunakan untuk menghasilkan produk yang mengandung babi atau turunannya, jika akan digunakan untuk menghasilkan produk halal, maka harus dicuci tu-

juh kali dengan air dan salah satunya dengan tanah atau bahan lain yang mempunyai kemampuan menghilangkan rasa, bau, dan warna.

7. **Prosedur Tertulis Aktivitas Kritis**

Prosedur harus menjamin tidak terjadinya kontaminasi bahan/produk oleh bahan haram/najis selama penyimpanan dan penanganan bahan/produk.

8. **Kemampuan Telusur**

Yang dimaksud dengan kemampuan telusur adalah kemampuan telusur produk yang disertifikasi berasal dari bahan yang memenuhi kriteria bahan (sudah disetujui LPPOM/tercantum dalam daftar bahan) dan diproduksi di fasilitas produksi yang memenuhi kriteria fasilitas produksi (bebas najis).

9. **Penanganan Produk yang Tidak Memenuhi Kriteria**

Produk yang tidak memenuhi kriteria adalah produk yang terlanjur dibuat dari bahan yang tidak disetujui LPPOM MUI atau di fasilitas yang tidak bebas najis atau haram (tidak memenuhi kriteria fasilitas halal).

10. **Audit Internal**

Audit internal adalah audit yang dilakukan oleh Tim Manajemen Halal untuk menilai pelaksanaan sistem jaminan halal di perusahaan dengan persyaratan sertifikasi halal.

11. **Kaji Ulang Manajemen**

Kaji ulang adalah evaluasi terhadap efektivitas penerapan sistem jaminan halal yang dilakukan oleh manajemen.

F. Sinergi SJH dengan HACCP

Dari sedikit sejarah yang disinggung di atas, maka dapat dilihat bahwa HACCP telah mengalami perkembangan lebih dahulu dibandingkan SJH. Namun, pada dasarnya proses HACCP dan

sistem jaminan Halal mempunyai tujuan yang sama yaitu menjamin keamanan pangan yang dihasilkan. Karena itu skema jaminan halal dapat dengan mudah diintegrasikan ke dalam sistem HACCP (Kohilavani, *et.al.*, 2015; Neio Demirci, *et.al.*, 2016) ataupun sebaliknya.

Perbedaan yang mendasar antara HACCP dan SJH adalah definisi bahaya (*hazard*) yang dipakai dalam kedua sistem. Sebagaimana diketahui, untuk menjalankan kedua sistem ini harus dimulai dengan pembentukan tim. Tim inilah yang harus membuat daftar bahaya yang mungkin terdapat pada tiap tahapan dari produksi utama, pengolahan, manufaktur, dan distribusi hingga sampai pada titik konsumen saat konsumsi. Tim harus mengadakan analisis bahaya untuk mengidentifikasi dimana bahaya yang terdapat secara alami, karena sifatnya mutlak harus ditiadakan atau dikurangi hingga batas-batas yang dapat diterima, sehingga produksi pangan tersebut dinyatakan aman. Cara penetapan titik kritis untuk HACCP dapat dilihat di Gambar 1, sedangkan untuk SJH dapat dilihat di Gambar 2.

Dalam mengadakan analisis bahaya, sebisa mungkin dicakup hal-hal sebagai berikut: kemungkinan timbulnya bahaya dan pengaruh yang merugikan terhadap kesehatan; evaluasi secara kualitatif dan/atau kuantitatif dari keberadaan bahaya; perkembangan dan daya tahan hidup mikroorganisme tertentu; produksi terus menerus toksin-toksin pangan, unsur-unsur fisika dan kimia; dan kondisi-kondisi yang memacu keadaan di atas.

Definisi bahaya (*hazard*) dalam HACCP adalah unsur biologi, kimia, fisika atau kondisi dari pangan yang berpotensi menyebabkan dampak buruk pada kesehatan. Definisi bahaya dalam SJH mungkin belum banyak dikemukakan, karena pembahasan mengenai bahaya dalam SJH lebih sering diarahkan kepada jenis bahan yang haram. Sebagaimana diketahui, Sistem Jaminan Halal (SJH) adalah sistem manajemen terintegrasi yang disusun, diterapkan dan dipelihara

yang mengatur bahan, proses produksi, produk, sumber daya manusia dan prosedur untuk menjaga kesinambungan proses produksi halal. Jadi definisi bahaya dalam SJH tidak hanya terbatas pada bahan yang dipakai, namun juga mencakup proses dan cara mendapatkan bahan tersebut perlu diperhatikan.

Jenis-jenis bahaya yang harus dipahami oleh tim jika ingin mengintegrasikan sistem HACCP dengan SJH dapat dilihat dalam Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Jenis bahaya menurut HACCP (Mortimore & Wallace, 2013) dan SJH

HACCP	Contoh
Bahaya biologis	
Makrobiologis	serangga, rodenta
Mikrobiologis	
Bakteri patogen	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Escherichia coli</i> STEC, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , and <i>Listeria monocytogenes</i>
Parasit dan protozoa	<i>Taenia saginata</i> , <i>Clonorchis sinensis</i> , <i>Trichinella spiralis</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cyclospora cayetenensis</i> , <i>Giardia</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> ,
Virus	Norovirus, Rotavirus, Astrovirus, Hepatitis A
Prion	<i>Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs): Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)</i>
Bahaya Kimia	
Mikotoksin	Aflatoxins, Patulin, Deoxynivalenol (DON), Fumonisin
Racun alami dalam bahan	Dinoflagelata pada kerang, ikan tinggi histidin, Tetrodotoksin,
Cairan kimia pembersih	<i>Non food grade</i>
Pestisida	Insektisida, Herbisida, Fungisida, Pengawet kayu, Masonry biocides, Pengusir burung dan binatang pengganggu, Rodentisida
Alergen	Kacang-kacangan, telur, susu, hasil laut

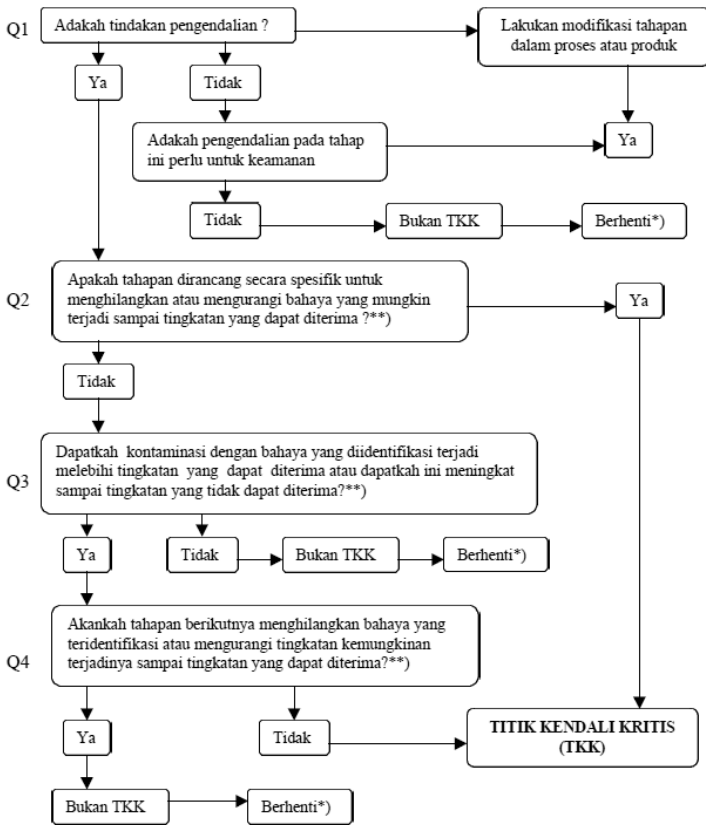
Logam berat	(kerang, ikan, kepiting, udang), kebele, gandum
Senyawa kontaminan	Polusi udara, tanah dan air, peralatan untuk pengolahan Nitrit, Nitrat dan N-nitroso; <i>Polychlorinated Biphenyls</i> Dioksin dan Furan, Polysiklik Aromatik Hidrokarbon Plasticizer dan migrasi bahan pengemas, Melamin dan Cyanuric Acid
Residu veteriner	hormon pengatur tumbuh, antibiotik
Bahaya Fisik	
Pecahan kaca	
Logam	Paku, sekrup, mur, baut, isi stapler, jarum, kawat sikat
Batu	
Kayu	Batang, ranting, duri, tusuk gigi
Plastik	
Serangga	Lalat, kecoa
Bahan intrinsik	Serpihan tulang, cangkang kulit, duri ikan
Bahaya radiologi	
SJH (Sarwat, 2014; https://mui.or.id/fatwa/)	
Contoh	
Zat	
Umum	
Najis	Darah, feses, urin, hewan <i>jallah</i> , muntah, sperma, nanah, mazi dan wadi
Memabukkan	Khamr, narkoba, ganja
Madharat	Racun, makanan kedaluwarsa, bahan kimia berbahaya, rokok
Khusus	
Eksplisit diharamkan	Babi, keledai peliharaan,
Bangkai	Tidak disembelih dengan benar: mati terbunuh, tercekik, terpukul, jatuh, ditanduk, diterkam hewan buas, untuk berhala, bagian hewan yang masih hidup
Bercakar, bertaring	Hewan buas: singa, macan, buaya, beruang, serigala, anjing, kucing
Dilarang membunuh	Semut, lebah, hud-hud, burung shurad, kodok
Diperintah membunuh	Gagak, elang, kalajengking, tikus, anjing, ular
Khabaits	hewan <i>jallah</i>
Organ tubuh	Ari-ari
Sumber pendapatan	
Hak orang	
Kriminal	Hasil mencuri, merampok, merampas, menjambret, menjarah,

Riba	menyelundupkan, korupsi
Judi	Bunga
Milik yatim	
Suap	

Dengan memahami jenis-jenis bahaya yang terdapat pada tabel di atas dan memahami produk turunannya, maka tim dapat melakukan tindakan pencegahan sebelum bahan tersebut masuk ke dalam sistem produksi.

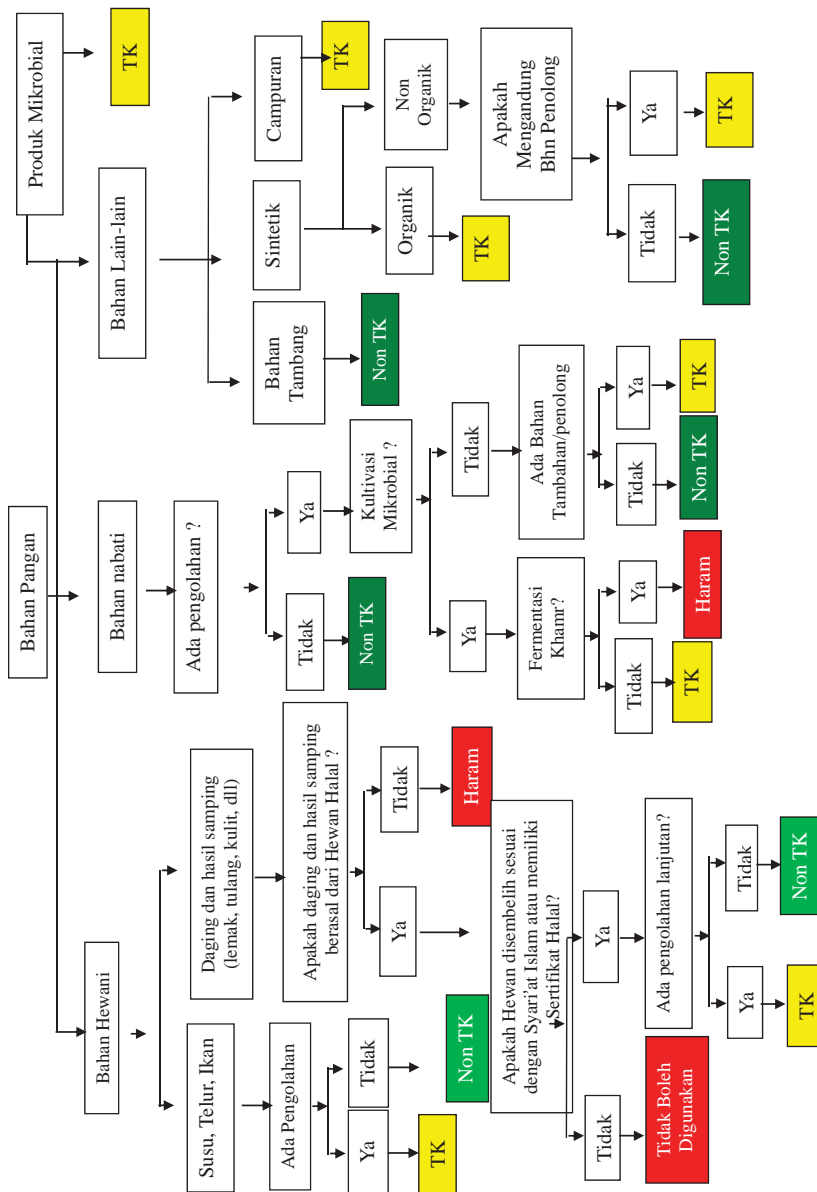
Perbedaan lain antara HACCP dengan SJH adalah penetapan batas kritis dan tindakan perbaikan. Dalam sistem HACCP masih dimungkinkan adanya toleransi keberadaan bahan berbahaya. Jika bahaya tersebut dihilangkan, maka hilang sifat bahayanya dan produk masih boleh dikonsumsi. Misalnya keberadaan bahaya fisik berupa serpihan logam yang tidak merubah sifat bahan masih bisa ditoleransi dengan menghilangkan logam tersebut. Berbeda dengan SJH, adanya bahan haram dalam produk menyebabkan status keseluruhan menjadi haram dan tidak boleh lagi dikonsumsi, meskipun bahan bahayanya sudah dihilangkan. Contoh yang cukup jelas adalah kasus produksi MSG yang menggunakan media penumbuh mikroba yang pernah bersinggungan dengan enzim dari babi.

CONTOH POHON KEPUTUSAN PENENTUAN TTK
(jawab pertanyaan secara berurutan)



*) Lanjutkan ke bahaya yang teridentifikasi berikutnya dalam proses yang dinyatakan
 **) Tingkatan yang dapat diterima dan tidak dapat diterima perlu ditentukan sesuai tujuan menyeluruh dalam mengidentifikasi TTK pada rencana HACCP

Gambar 3.1. Contoh diagram penentuan titik kendali kritis (BSN, 2012)



Gambar 3.2. Diagram penentuan titik kritis halal (LPPOM MUJI, 2012)

HACCP dan Sistem Jaminan Halal mempunyai tujuan yang sama yaitu menjamin agar konsumen yang menggunakan produk mendapatkan keamanan baik dari segi kesehatan jasmani maupun rohani. Jika dilihat dari konsep keamanan pangan yang disiratkan dalam Al Quran, maka semakin jelas bahwa Islam itu tinggi dan tidak ada yang mengalahkannya. Sistem Jaminan Halal melingkupi juga prinsip-prinsip yang digunakan dalam sistem keamanan pangan HACCP. Namun tujuan SJH jauh lebih luas lagi karena aspek keamanan yang dijamin tidak hanya faktor keamanan fisik di dunia, namun juga keamanan psikologis dan keselamatan di akhirat.

Referensi

- Badan Standar Nasional BSN (1998). Standar Nasional Indonesia SNI 01-4852-1998: Sistem analisa bahaya dan pengendalian titik kritis (HACCP) serta pedoman penerapannya. Jakarta
- Codex Alimentarius - Food Labelling - Complete Texts - Revised 2001. Diakses pada <http://www.fao.org/3/Y2770E/y2770e08.Htm#bm08>
- <https://risalahmuslim.id/quran/>
- <https://www.foodsafety.com.au/blog/what-is-food-safety>
- <https://islam.nu.or.id/post/read/112752/ragam-pendapat-fiqih-soal-kriteria-thayyiban-dalam-produk-halal>
- <https://www.halalmui.org/mui14/main/page/persyaratan-sertifikasi-halal-mui>
- Kamus Al Qur'an, PTS Islamika SDN BHD, Hal: 351-352 dalam <https://risalahmuslim.id/quran/>
- Kohilavani, Zzaman, W., Febrianto, N.A., Zakariya, N.S., Wan Abdullah, W.A. Yang , T.A. (2013). Embedding Islamic dietary requirements into HACCP approach. *Food Control* 34: 607-612
- Kohilavani, Zzaman, W., Abdullah, W. W. N., Tajul, A. Y. (2015). Embedding Islamic dietary law into an HACCP approach for application to the poultry slaughtering and processing industry. *International Food Research Journal* 22(6): 2684-2690

- Latif, I. A., Mohamed, Z., Sharifuddin, J., Abdullah, A. M., & Ismail, M. M. (2014). A Comparative Analysis of Global Halal Certification Requirements. *Journal of Food Products Marketing*, 20(S1), 85–101. <https://doi.org/10.1080/10454446.2014.921869>
- LPPOM MUI (2012). Seri Sistem Jaminan Halal HAS 23000, Lembaga Pengkajian Pangan Obat-obatan dan Kosmetika Majelis Ulama Indonesia, Jakarta
- Marriott, N.G. and Gravani, R.B. (2006). *Principles of Food Sanitation* 5th Edition. Springer Science+Business Media, Inc. New York.
- Mayes T. and Mortimore, S.(2001). Making the most of HACCP, Learning from others' experience. CRC Press LLC Boca Raton FL USA
- Mortimore, S., Wallace, C. (2013). HACCP: A Practical Approach. Third Edition. Springer. New York
- Majelis Ulama Indonesia (2000). Fatwa Musyawarah Nasional VI Majelis Ulama Indonesia Nomor: 2/Munas VI/MUI/2000 Tentang Penggunaan Organ Tubuh, Ari-Ari, Dan Air Seni Manusia Bagi Kepentingan Obat-Obatan Dan Kosmetika.
- Neio Demirci, M., Soon, J. M., & Wallace, C. A. (2016). Positioning food safety in Halal assurance. *Food Control*, 70, 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.059>
- Othman B, Shaarani SM, Bahron A, 2016. The potential of ASEAN in halal certification implementation: a review. *Pertanika J Soc Sci Hum*. 24(1):1-24.
- Prabowo, S., Abd Rahman, A. (2016). Sertifikasi Halal Sektor Industri Pengolahan Hasil Pertanian. *Forum Penelitian Agro Ekonomi*, Vol. 34 No. 1, Juli 2016: 57-70
- Rahman, R. A., Mohamed, Z., Rezai, G., Shamsudin, N. M., & Sharifuddin, J. (2014). Exploring the OIC food manufacturer intention towards adopting Malaysian Halal certification. *American Journal of Food Technology*, 9(5), 266-274.
- Regenstein, J.M., Chaudry, M.M., Regenstein, Carrie E. (2008) *Kosher and Halal Food Laws and Potential Implications for Food Safety*. In: Wilson, C.L. (Editor), *Microbial Food Contamination* 2nd Ed. CRC Press LLC. Hal. 286-317.
- Sarwat, Ahmad (2014). Halal atau Haram? Kejelasan Menuju Keberkahan. Penerbit Kalil. Jakarta.
- Somad, A. (2020). Pengertian Halal dan Haram Menurut Ajaran Islam. https://www.youtube.com/watch?v=g_Uli4WbUfw

- Wehr, H. Michael (2008). The Codex Alimentarius: What It Is and Why It Is Important. In: Wilson, C.L. (Editor), *Microbial Food Contamination* 2nd Ed . CRC Press LLC. Hal. 495-524
- WHF. (2009). World Halal Forum [Online] Available at: [http://www.worldhalalforum.org/download/WHF09Report\(compressed\).pdf](http://www.worldhalalforum.org/download/WHF09Report(compressed).pdf)

BAB IV

TITIK KRITIS KEHALALAN PRODUK

Dias Indrasti^{1,2,3} dan Joko Hermanianto^{1,2}

Pusat Studi Sains Halal, LPPM, IPB
Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan,
Fakultas Teknologi Pertanian, IPB
*Southeast Asian Food and Agricultural Science
and Technology (SEAFAST) Center, LPPM, IPB*

A. Pendahuluan

Halal sudah menjadi salah satu syarat produk pangan agar dapat menembus pasar global, termasuk di Indonesia. Apalagi mayoritas penduduk Indonesia beragama Islam. Undang-undang Jaminan Produk Halal (UU No. 33 tahun 2014) menetapkan kewajiban sertifikasi halal untuk semua produk yang masuk, beredar dan diperdagangkan di wilayah Indonesia. Secara internasional, pencantuman klaim halal pada label pangan mengacu pada aturan yang dikeluarkan oleh Codex (CAC, 1997). Namun, tahapan audit dalam sertifikasi halal pada beberapa produk pangan cukup rumit, perlu ketelitian dan kedetilan, serta pengetahuan mendalam.

Bahan baku dalam pembuatan produk pangan, obat, dan kosmetika dapat berasal dari tumbuhan/tanaman, hewan, mikroba, atau bahan kimia sintetik. Berdasarkan prinsip halal-haram dalam Islam, pada dasarnya hukum dasar segala sesuatu adalah mubah/boleh (Qardhawi, 1993). Pengecualian diberikan kepada beberapa bahan yang jelas disebutkan haram (dilarang) di dalam Al-Quran dan hadits Nabi Muhammad SAW. Jika bahan-bahan tersebut masih dalam bentuk asal atau bentuk mentahnya maka lebih mudah untuk menelusur status kehalalannya. Sebaliknya, jika bahan-bahan tersebut digunakan sebagai bahan baku produk dan sudah menga-

lami serangkaian proses pengolahan, akan lebih sulit untuk menelusur status kehalalan produk turunan atau produk olahannya.

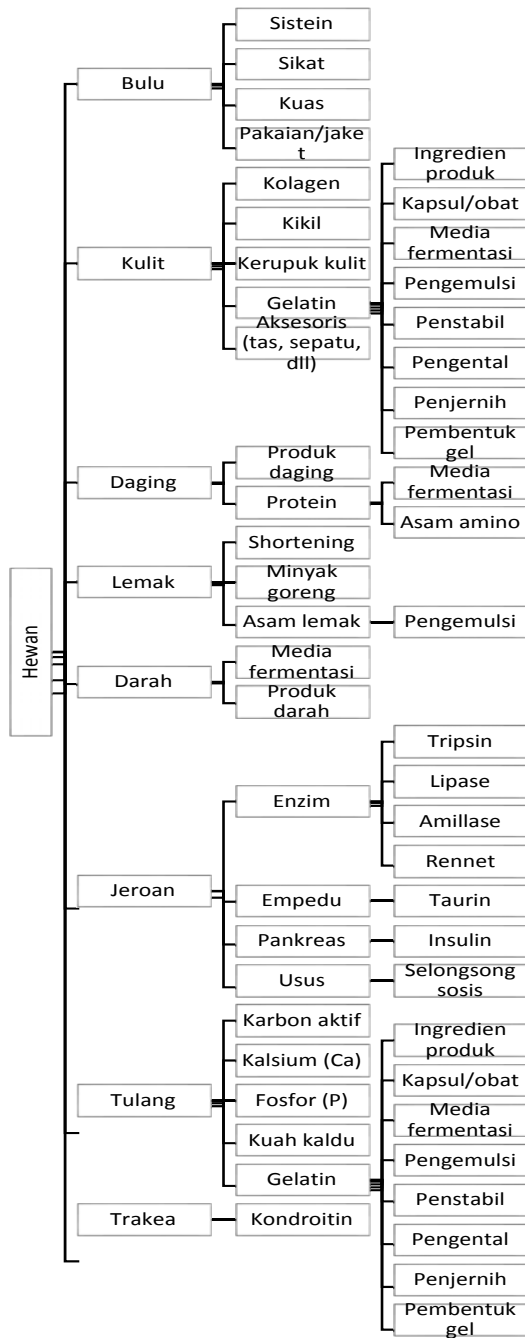
Seiring berkembangnya teknologi, bahan baku produk banyak yang telah mengalami modifikasi. Modifikasi tersebut adalah adanya proses atau penambahan zat tertentu yang ditujukan untuk memperoleh manfaat atau karakteristik produk yang optimal. Berdasarkan tingkat kritis dan kesulitan penelusuran kehalalannya, bahan/produk dikategorikan menjadi bahan yang tidak berisiko (bahan positif halal) dan berisiko. Bahan-bahan yang termasuk dalam daftar bahan positif halal secara umum berasal dari bahan yang dibuat secara sintesis melalui reaksi kimia dan boleh digunakan sebagai bahan baku atau bahan tambahan pangan (BTP) (LPPOM MUI, 2019). Sedangkan bahan yang termasuk kategori berisiko harus melalui tahapan pemeriksaan untuk menentukan status kehalalannya.

Pengendalian risiko tidak halal pada produk dilakukan dengan menetapkan titik kritis kehalalan produk tersebut. Pada bagian ini akan dibahas penentuan titik kritis kehalalan produk hewani dan turunanannya, produk nabati asal tumbuhan/tanaman, produk yang mengandung mikroba atau produk turunan mikroba, dan produk lain-lain. Titik kritis kehalalan yang dimaksud adalah bahan dan tahapan produksi atau proses pengolahan yang harus dicermati karena penambahan bahan atau proses tersebut dapat mempengaruhi status kehalalan produk (Hasan, 2014). Titik kritis ini dapat mengakibatkan suatu bahan yang semula halal menjadi haram. Adanya titik kritis tidak menunjukkan bahwa produk tersebut serta merta menjadi haram, melainkan menunjukkan adanya kemungkinan berubahnya status kehalalan produk menjadi haram yang perlu diwaspadai.

B. Titik Kritis Kehalalan Produk Hewani dan Turunannya

Produk hewani dalam bentuk asalnya lebih mudah ditelusur status halalannya. Namun dengan berkembangnya ilmu dan teknologi saat ini hampir semua produk hewani yang beredar merupakan produk turunan yang mempunyai bentuk dan sifat yang sangat berbeda dengan sifat asal hewannya. Selain produk utama hewani seperti daging dan lemak, produk samping berupa tulang dan kulit juga dapat diproses lebih lanjut menjadi kolagen dan gelatin. Kolagen banyak diaplikasikan pada produk kosmetika atau digunakan sebagai selongsong sosis. Gelatin sebagai produk turunan hewan digunakan sebagai bahan baku pembuatan kapsul obat, permen lunak, pudding, dan masih banyak produk lainnya. Karakteristik kolagen dan gelatin ini sangat berbeda dengan sifat bahan asalnya. Terlebih lagi jika sudah menjadi produk akhir tentu akan lebih sulit menelusur darimana gelatin tersebut bersumber. Berbagai contoh produk turunan hewan dan aplikasinya dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Hampir semua bahan haram yang disebutkan dalam Al-Quran dan Hadits adalah produk hewani. Dalam QS. Al-Maaidah ayat 3 disebutkan “Diharamkan bagimu (memakan) bangkai, darah, daging babi, dan (daging) hewan yang disembelih bukan atas (nama) Allah, yang tercekik, yang terpukul, yang jatuh, yang ditanduk, dan yang diterkam binatang buas, kecuali yang sempat kamu sembelih. Dan (diharamkan pula) yang disembelih untuk berhala” (Kemenag, 2020). Dalam Hadits juga disebutkan beberapa hewan yang haram dan tidak boleh dikonsumsi baik dalam bentuk asalnya maupun produk-produk olahan dan turunannya.



Gambar 4.1. Berbagai produk hewani dan aplikasinya

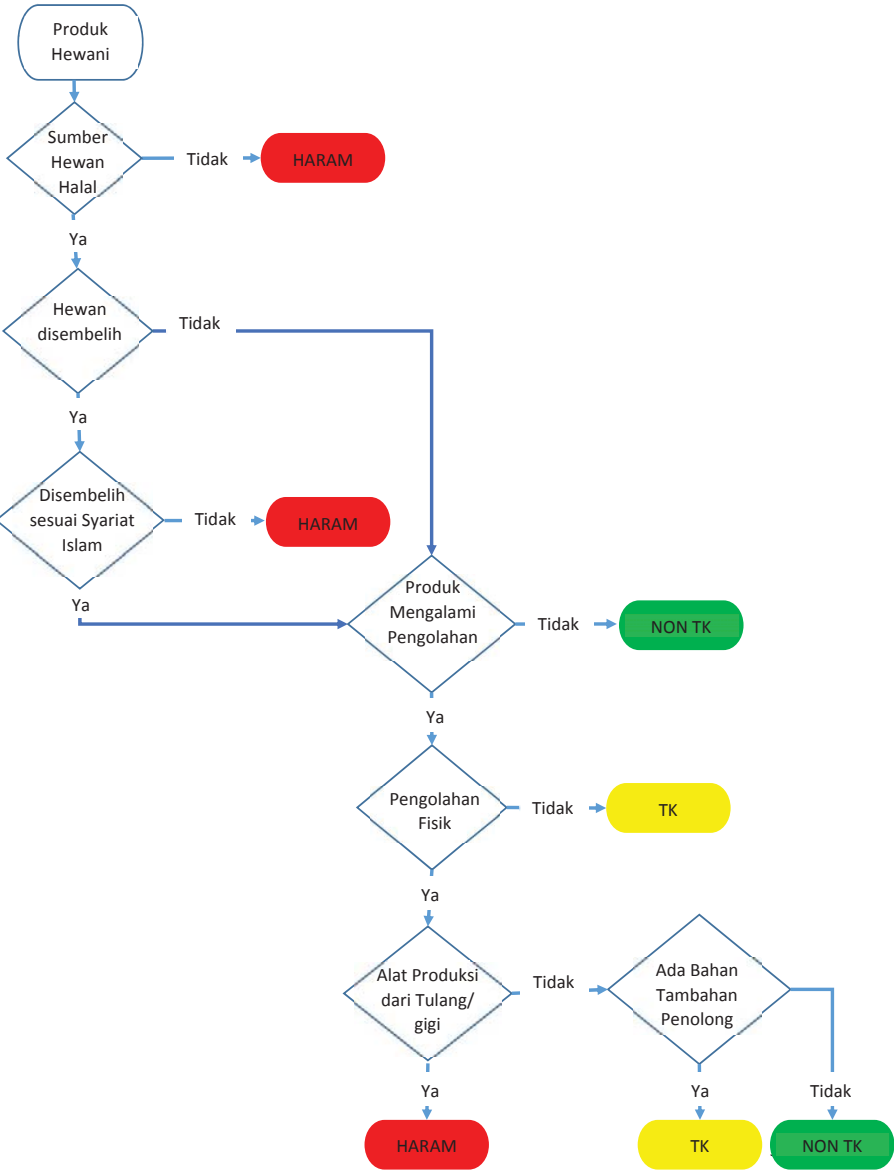
Hewan halal yang boleh dikonsumsi oleh muslim adalah ikan dan semua hewan yang hidup di air serta belalang Sebagaimana firman Allah SWT dalam surah Al-Maidah ayat 96 *"Dihalalkan bagimu hewan buruan laut dan makanan (yang berasal) dari laut sebagai makanan yang lezat bagimu, dan bagi orang-orang yang dalam perjalanan"* (Kemenag, 2020). Hadits riwayat Imam Abu Daud dan Tirmidzi, Nabi saw bersabda *"Laut itu suci airnya dan halal bangkainya"*. Rasulullah SAW juga menyatakan bahwa *"Dihalalkan bagimu khalial dua bangkai dan dua darah, dua bangkai yaitu bangkai belalang dan ikan, sedangkan dua darah yaitu limpa dan hati"* (HR. Baihaqi) (Mubarakfuri, 2008). Hewan-hewan tersebut boleh dikonsumsi meskipun tanpa disembelih atau sudah menjadi bangkai selama tidak membahayakan kesehatan.

Setiap bagian dari hewan, baik yang diperoleh tanpa atau melalui proses penyembelihan, dapat diolah menjadi produk turunan yang memiliki kegunaan dan nilai tambah yang jauh lebih tinggi dari produk asalnya. Penelusuran dan penentuan titik kritis kehalalan produk hewani dan turunannya dapat dilakukan dengan mengikuti tahapan seperti dapat dilihat pada Gambar 4.2.

Produk asal hewan halal yang umum diperoleh tanpa proses penyembelihan, seperti susu dan telur, boleh langsung dikonsumsi. Susu dan telur dari hewan halal, serta madu, tidak menjadi titik kritis selama produk tersebut dikonsumsi secara langsung tanpa diolah. Pengolahan menjadi titik kritis kehalalan karena pada prosesnya menggunakan alat pengolah dan umumnya dilakukan dengan penambahan bahan tambahan.

Produk hewani dan turunannya suci dan halal jika berasal dari hewan halal yang disembelih sesuai dengan syariat Islam, bukan darah, dan tidak bercampur atau bersentuhan dengan bahan haram atau najis. Faktor penting yang menentukan titik kritis kehalalan produk hewani adalah proses penyembelihan. Hewan yang

digunakan sebagai sumber bahan baku produk haruslah hewan halal dan proses penyembelihannya mengikuti syariat Islam.



Gambar 4.2. Diagram keputusan penentuan titik kritis kehalalan produk hewani

Jika hewannya halal namun tidak disembelih secara syariat Islam maka hewan tersebut termasuk kategori bangkai yang haram dikonsumsi. Cara dan metode penyembelihan secara syariat Islam dijelaskan di bagian lain dalam buku ini.

Fasilitas produksi juga menjadi faktor penentu status kehalalan produk hewani. Jika fasilitas produksi sebelumnya digunakan untuk memproduksi hewan haram selain babi dan produk turunannya maka fasilitas tersebut masih diizinkan digunakan untuk memproduksi bahan halal setelah dibersihkan secara menyeluruh sesuai syariat Islam dan dipastikan tidak ada residu yang tertinggal. Mesin, alat, dan fasilitas produksi tidak diizinkan digunakan bersama atau bergantian jika ada salah satu produk yang mengandung babi atau produk turunan babi.

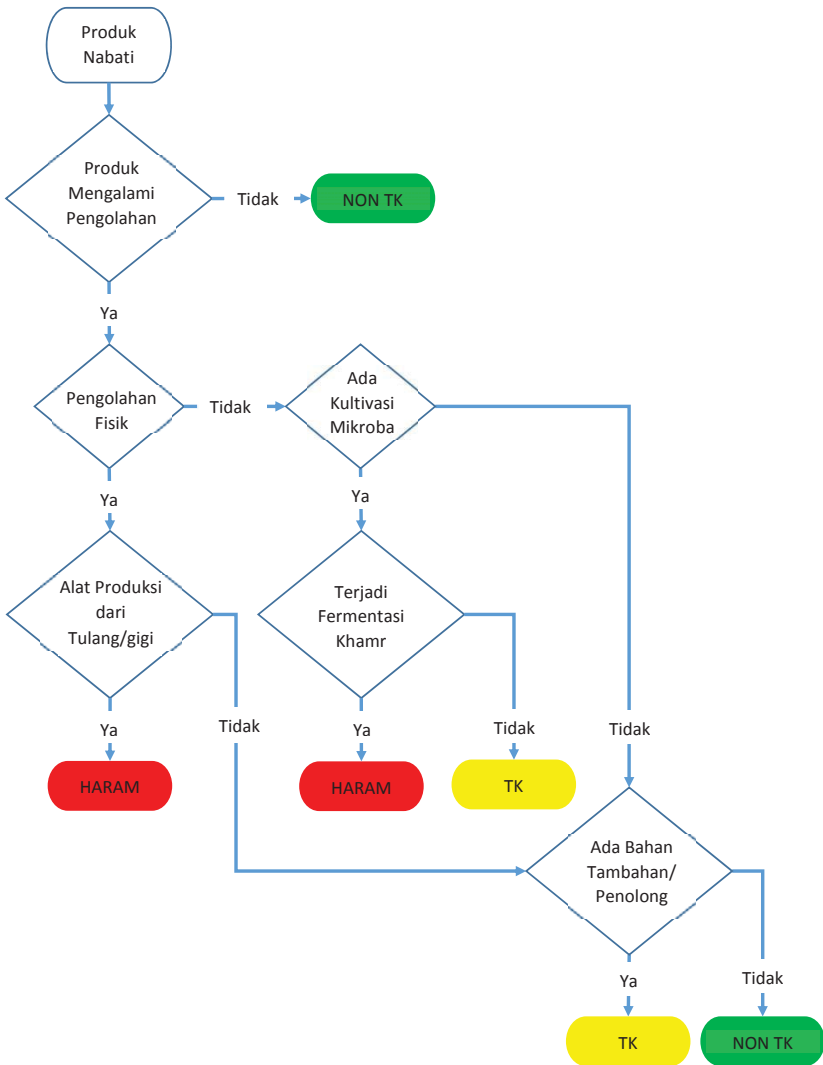
C. Titik Kritis Kehalalan Produk Nabati dan Turunannya

Jika diperhatikan lebih teliti, hampir semua bahan yang disebutkan haram dikonsumsi dalam Al-Quran dan Hadits berasal dari hewan dan produk turunannya. Tidak ada dalil yang menyebutkan bahan haram yang berasal dari tanaman/tumbuhan. Semua bahan nabati yang berasal tanaman/tumbuhan adalah halal, kecuali tumbuhan yang beracun, berbahaya, atau menyebabkan keburukan bagi manusia. Keburukan yang dimaksud bisa berupa kehilangan kesadaran (mabuk). Sebagaimana firman Allah swt dalam Al-Quran surat Al-A'raaf ayat 157: *"...dan menghalalkan segala yang baik bagi mereka dan mengharamkan segala yang buruk bagi mereka..."* (Kemenag, 2020). Rasulullah SAW dalam hadits riwayat Ahmad juga melarang tiap-tiap barang yang memabukkan dan melemahkan akal dan badan.

Status asal bahan nabati adalah halal. Namun terdapat beberapa titik kritis yang harus diperhatikan agar status kehalalan bahan nabati tidak berubah. Titik kritis tersebut adalah proses

pengolahan yang dilakukan, bahan tambahan dan bahan penolong yang digunakan, serta fasilitas produksi yang digunakan. Proses pengolahan bisa menjadi titik kritis kehalalan bahan nabati jika pada proses pengolahannya: (1) menggunakan bahan tambahan atau bahan penolong yang tidak halal, (2) terjadi kontak dengan bahan non-halal, atau (3) diproses menggunakan fasilitas produksi yang sama secara bergantian dengan bahan non-halal tanpa proses pembersihan. Penentuan titik kritis kehalalan produk nabati asal tumbuhan/tanaman dapat dilakukan dengan mengikuti pohon keputusan seperti pada Gambar 4.3 berikut ini.

Pengolahan bahan nabati dengan perlakuan fisik menggunakan alat yang bukan terbuat dari tulang atau gigi dan tanpa penambahan bahan lain tidak merubah status kehalalannya. Pengolahan secara fisik merupakan pengolahan bahan yang memanfaatkan perubahan sifat fisik bahan. Pengolahan fisik bisa berupa proses pengeringan, pengecilan ukuran, ekstraksi, dan pengolahan dengan suhu panas/dingin. Pengeringan bahan dapat dilakukan dengan penjemuran di bawah sinar matahari, pengeringan dengan oven, pengeringan semprot (*spray drying*), atau pengeringan beku (*freeze drying*). Pengecilan ukuran bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan sehingga lebih seragam dan lebih mudah dikemas. Pengecilan ukuran umumnya dilakukan melalui proses pemotongan dan dapat dilanjutkan dengan pembuatan serbuk/bubuk. Ekstraksi secara fisik dilakukan dengan memberikan tekanan sampai ekstrak keluar dari bahan. Sedangkan pengolahan dengan suhu dilakukan dengan sterilisasi, pasteurisasi, pendinginan, atau pembekuan bahan. Selama pengolahan fisik tersebut menggunakan alat yang tidak terkontaminasi bahan haram atau najis dan tidak ada penambahan bahan tambahan dan/atau bahan penolong, maka bahan nabati tersebut halal dikonsumsi.



Gambar 4.3. Diagram keputusan penentuan titik kritis kehalalan produk nabati

Bahan tambahan adalah bahan selain ingredien utama yang ditambahkan secara sengaja untuk mempengaruhi sifat atau bentuk produk. Jenis bahan tambahan digolongkan berdasarkan sifat fungsional yang dimiliki. Misalnya pewarna yang dapat menghasilkan warna tertentu, pengawet yang dapat memperpanjang masa simpan produk, pengemulsi, anti kempal, anti oksidan, pemutih, dan lain-lain. Sedangkan bahan penolong adalah bahan yang digunakan pada proses pengolahan untuk memenuhi tujuan teknologi tertentu dan tidak meninggalkan residu pada produk akhir. Contoh bahan penolong adalah arang (karbon) aktif pada proses penjernihan air. Air keruh dilewatkan pada arang yang akan menahan kotoran yang melewatinya. Arang tidak terdeteksi pada air yang telah disaring namun kontak antara air dan arang bisa menjadi titik kritis kehalalannya karena selain terbuat dari batok kelapa, arang juga bisa berasal dari tulang hewan. Pembahasan mendalam mengenai bahan tambahan dan bahan penolong dapat dibaca pada bagian lain di buku ini.

Selain proses pengolahan, bahan tambahan, dan bahan penolong, fasilitas produksi juga bisa menjadi titik kritis kehalalan produk nabati. Jika hanya digunakan untuk memproduksi bahan nabati maka fasilitas produksi tidak menjadi titik kritis. Namun jika fasilitas produksi tersebut digunakan bergantian antara produk nabati dan produk hewani atau produk lain, maka sangat mungkin terjadi kontak antara bahan nabati dengan bahan lain yang dapat menjadi titik kritis kehalalan.

Kemajuan teknologi menyebabkan produk yang banyak beredar di pasaran merupakan produk turunan yang bentuk dan sifatnya sudah jauh berbeda dari produk asalnya. Meskipun berasal dari tanaman/tumbuhan, namun proses produksi dan kontak dengan fasilitas produksi dapat mempengaruhi kehalalan produk. Kemampuan menelusur sumber dan proses produksi bahan/produk menjadi faktor kunci dalam menentukan kehalalan produk nabati.

D. Titik Kritis Kehalalan Produk Mikrobial

Pemanfaatan mikroorganisme dalam industri pangan, obat, dan kosmetika menjadi salah satu alternatif menciptakan produk yang tidak hanya bergizi namun juga memiliki nilai fungsionalitas tinggi. Produk tersebut dapat berupa mikroba utuh, hasil fermentasi, probiotik, sinbiotik, dan nutrasetikal (Kurniadi dan Frediansyah, 2016). Produk yang memanfaatkan mikroorganisme bisa disebut dengan produk mikrobial. Contoh produk mikrobial antara lain seperti protein sel tunggal, produk probiotik, asam organik, asam amino, biosurfaktan, penguat rasa (*monosodium glutamate*/MSG, *ribotide*), antibiotik, insulin, interferon, vitamin dan enzim (Atma et al., 2018).

Mikroorganisme yang banyak digunakan dalam produksi pangan, obat, dan kosmetika berasal dari jenis bakteri, kapang (jamur mikro), dan khamir (ragi). Mikroba dapat dimanfaatkan secara langsung sebagai bahan baku produk, sebagai agen bioproses penghasil metabolit dan senyawa baru, pemecah senyawa kompleks, serta penghasil flavor dan warna (Dufossé, 2018). Mikroba juga memegang peranan penting di era bioteknologi sekarang ini. Modifikasi gen dan proses rekayasa genetika banyak memanfaatkan berbagai jenis mikroba sebagai media pembawa. Mencermati banyaknya manfaat yang diperoleh dari produk mikrobial maka diperlukan pemahaman yang baik mengenai status kehalalannya.

Berbeda dengan sebagian besar produk yang titik kritisnya dapat diidentifikasi dari bahan baku dan bahan tambahan yang digunakan, maka produk mikrobial identifikasi titik kritis perlu pemahaman lebih mendalam. Titik kritis kehalalan produk mikrobial dapat berasal dari (1) sumber isolat mikroba, (2) media pertumbuhan, (3) produk metabolisme, (4) fasilitas produksi, dan (5) matrik atau bahan lain yang ditambahkan untuk tujuan tertentu (Gambar 4).

1. Sumber isolat/kultur mikroba

Mikroba murni pada dasarnya halal untuk dikonsumsi selama tidak membahayakan kesehatan manusia dan tidak terkena barang najis (MUI 2010). Mikroba yang digunakan untuk industri pangan haruslah bersifat tidak beracun bagi manusia. Mikroba dapat diisolasi dari berbagai sumber. Mikroba yang berasal dari babi haram untuk digunakan. Jika mikroba berasal dari sumber yang haram selain babi, misalnya darah dan kotoran manusia/hewan, masih diizinkan untuk digunakan setelah mengalami proses pencucian hingga sifat najisnya hilang. Beberapa bakteri probiotik, bakteri penghasil reuterin, dan bakteri penghasil equol/estrogen non-steroid adalah contoh mikroba yang diisolasi dari babi.

2. Media pertumbuhan mikroba

Seperti halnya makhluk hidup lain, mikroba juga memerlukan lingkungan yang nyaman untuk dapat tumbuh, berkembang biak, dan menghasilkan produk. Mikroba hanya dapat tumbuh pada media spesifik yang diperkaya nutrisi seperti karbon, nitrogen, vitamin, mineral, dan lain-lain. Substrat atau media pertumbuhan mikroba harus diperoleh dari bahan yang halal. Mikroba yang tumbuh pada media pertumbuhan yang suci hukumnya halal. Media tempat hidup mikroba tidak boleh berasal atau mengandung bahan dari babi. Media yang mengandung atau bersentuhan dengan babi atau produk turunannya adalah haram. Mikroba dan produk mikroba yang tumbuh pada media yang bersentuhan atau kontak dengan bahan najis, tapi bukan babi, halal jika produk dapat dipisahkan dari medianya dan dibersihkan (disucikan) (MUI, 2010).

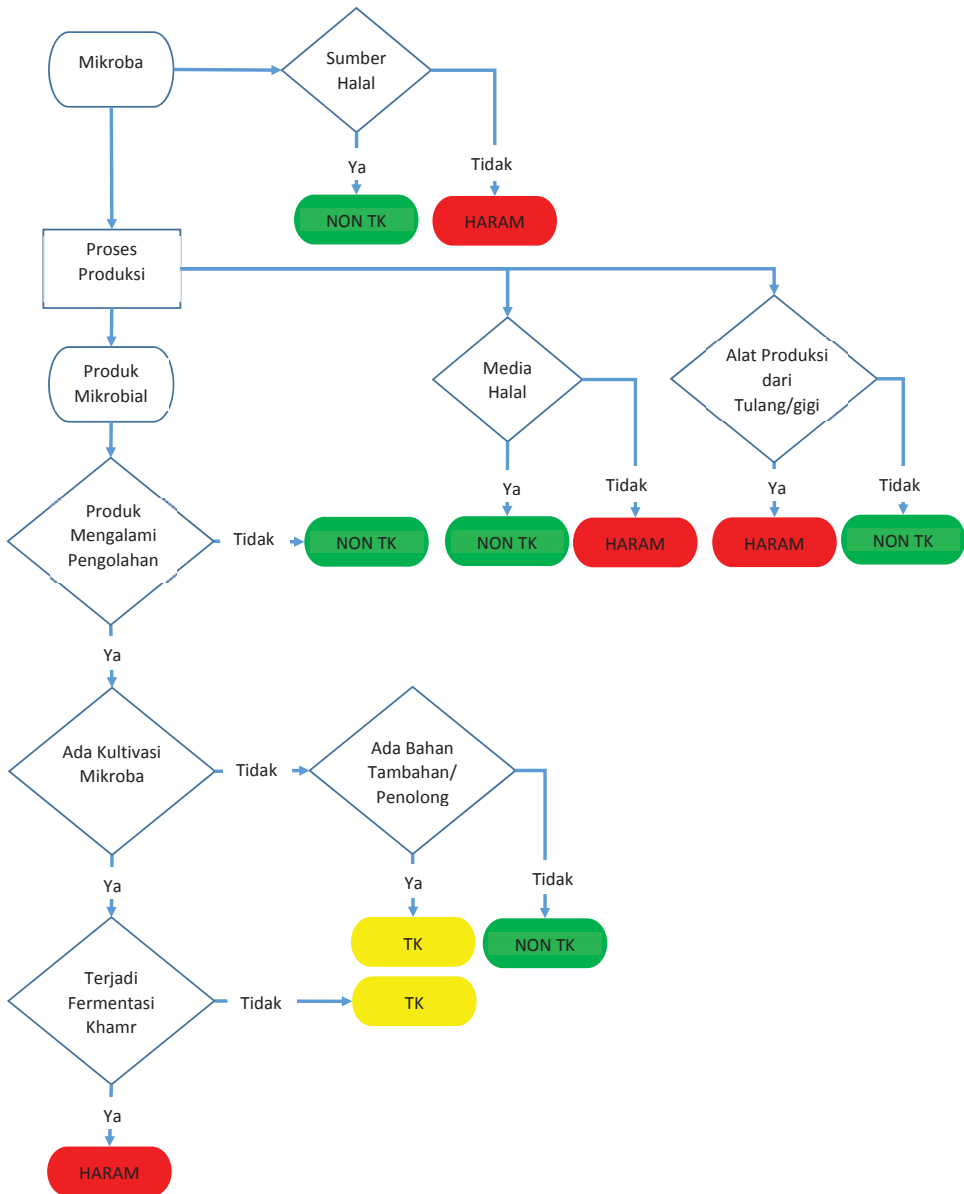
3. Produk metabolisme

Metabolit atau produk metabolisme mikroba perlu diperhatikan terkait produksi alkohol/etanol (C_2H_5OH) hasil fermentasi. Adanya khamir *Saccharomyces cerevisiae* pada produk pangan nabati

sumber karbohidrat dapat menyebabkan terjadinya proses fermentasi alkohol yang masuk kategori khamr atau minuman keras. Khamr merupakan salah satu produk yang haram dikonsumsi berdasarkan firman Allah swt dalam QS Al-Maaidah ayat 90 yang berbunyi “Hai orang-orang yang beriman, sesungguhnya (meminum) khamr, berjudi, (berkorban untuk) berhala, mengundi nasib dengan panah, adalah termasuk perbuatan syaitan. Maka jauhilah perbuatan-perbuatan itu agar kamu mendapat keberuntungan” (Kemenag, 2020). Merujuk pada Fatwa MUI, minuman beralkohol yang masuk kategori khamr adalah minuman yang mengandung alcohol/etanol minimal 0.5% dan minuman ini hukumnya haram. Etanol yang berasal dari khamr hukumnya adalah haram. Meskipun demikian, produk minuman hasil fermentasi yang mengandung etanol kurang dari 0.5% hukumnya halal jika secara medis tidak membahayakan (MUI, 2018).

4. Fasilitas produksi

Fasilitas produksi berupa mesin, peralatan, termasuk peralatan gelas (cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, dan lain-lain) yang digunakan untuk perbanyakan mikroba atau memproduksi produk mikrobial harus memenuhi persyaratan halal. Apabila fasilitas produksi terkontaminasi dengan bahan haram atau najis maka harus dibersihkan/disucikan terlebih dahulu sebelum digunakan. Titik kritis terkait fasilitas produksi yang menyebabkan suatu produk mikrobial menjadi tidak halal adalah tempat di mana produk tersebut diproduksi. Contoh yang tidak halal misalnya ragi/khamir yang diproduksi dari perusahaan bir (Kurniadi dan Frediansyah, 2016). Ragi atau ekstrak ragi kering dari industri bir masih boleh dikonsumsi setelah dipisahkan dari media pertumbuhannya dan disucikan (MUI, 2010).



Gambar 4.4. Titik Kritis Kehalalan Produk Mikrobial

5. Matrik atau bahan lain yang ditambahkan

Dalam produksi mikroba dan produk mikrobial sering kali diberi penambahan bahan untuk tujuan tertentu. Bahan atau matriks tersebut sengaja ditambahkan misalnya untuk mencegah oksidasi, membuatnya lebih larut, atau melindungi produk dari pengaruh lingkungan. Bahan tambahan tersebut umumnya merupakan bahan penyalut seperti pati jagung, laktosa monohidrat, povidon, mikrokrystal selulosa, susu skim, alginat, kitosan-alginat, dan whey protein (Kurniadi dan Frediansyah, 2016).

E. Titik Kritis Produk Bioteknologi

Bioteknologi yang memanfaatkan makhluk hidup maupun produk dari makhluk hidup dalam proses produksi untuk menghasilkan produk, terus berkembang seiring dengan majunya bidang biologi molekuler. Bioteknologi di bidang pangan antara lain aplikasi enzim untuk persiapan dan pengolahan produk, teknologi sel mikroba untuk menghasilkan pangan fermentasi dan BTP, serta DNA rekombinan untuk menghasilkan tanaman/hewan transgenik (Prakash et al., 2014). Teknologi DNA rekombinan adalah salah satu perkembangan terpenting untuk produksi bahan mikroba. Metode ini memberikan banyak keuntungan seperti hasil yang tinggi untuk produksi produk mikroba. Teknik DNA rekombinan dilakukan dengan cara memotong helai-helai DNA dari satu organisme dan kemudian ditempelkan ke dalam organisme lainnya. Teknik inilah yang dinamakan dengan rekayasa genetika (Hetami, 2009). Teknik gunting-tempel ini dilakukan dari satu organisme ke organisme lainnya yang bahkan tidak sekerabat. Aplikasi bioteknologi yang paling kontroversial melibatkan penggunaan hewan dan transfer gen dari hewan ke tanaman (Khattak et al., 2011). Secara teoritis, gen donor dapat berasal dari sumber biologis manapun, seperti tumbuhan, mikroorganisme, serangga, ikan, atau hewan lain (Zailani et al., 2010).

Makhluk hidup yang banyak dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi adalah mikroorganisme, terutama bakteri dan khamir (Atma et al., 2018). Mikroba digunakan sebagai pembawa materi genetik yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan produk akhir berupa enzim atau hormon yang bermanfaat terutama bagi kesehatan manusia. Bakteri *E. coli* digunakan sebagai pembawa DNA rekombinan dari gen babi untuk menghasilkan hormon insulin yang diperlukan oleh penderita diabetes. Enzim α -amilase dan protease dapat dihasilkan dari rekombinan khamir *Saccharomyces cerevisiae* dengan gen dari pankreas babi.

Pertimbangan yang dapat diambil untuk menentukan status kehalalan produk hasil bioteknologi adalah konsep Istihalah (perubahan bentuk/keadaan) (Riaz dan Chaudry, 2019). Apakah gen babi dapat diterima? Apakah ada perubahan yang terjadi pada transfer gen dari hewan haram ke hewan halal? Apakah gen cukup mengubah karakter hewan atau tumbuhan penerima sehingga menjadikannya haram? Sekalipun produk hasil rekayasa genetika aman, namun jika konsumen Muslim merasa penggunaan DNA babi melanggar keyakinan agama maka produk tersebut dianggap meragukan (Che Man dan Sazili, 2010).

Majelis Ulama Indonesia (MUI) melalui Fatwa No. 35/2013 menyatakan bahwa melakukan rekayasa genetika terhadap hewan, tumbuhan, dan mikroba adalah mubah (boleh). Sifat mubah tersebut memiliki syarat di antaranya bermanfaat, tidak membahayakan, dan sumber gen bukan berasal dari yang haram (MUI, 2013). Berdasarkan fatwa di atas, dapat dikatakan bahwa titik kritis keharaman suatu pangan GMO (*Genetically Modified Organism*) dapat dilihat dari bahan baku atau asal gen yang digunakan. Jika sumber gen atau adanya penggunaan bahan yang haram (gen babi dan manusia) saat pembuatan, maka produk hasil rekayasa genetika yang dihasilkan menjadi haram. Hal ini menjadi dasar pengambilan fatwa MUI

untuk memberikan sertifikasi produk pangan yang berbahan baku dari produk GMO.

Jika kembali ke konsep istilah, transformasi ini akan dianggap halal selama hewan sumbernya halal. Modifikasi mikroba dapat menjadi haram apabila menggunakan sumber gen yang didapatkan dari material haram seperti insersi gen pengkode α -amilase dari babi (Feller et al., 1996) dan insersi gen *mrc-1* sebagai antimicrobia yang berasal dari bakteri *Enterococcus* dari babi (Kurniadi dan Frediansyah, 2016). Meskipun produk akhir hasil rekayasa genetika berubah dari sifat asalnya dan gen yang ditransfer diterjemahkan sesuai dengan sel inang namun mengambil gen apapun dari babi adalah haram.

F. Titik Kritis Enzim

Salah satu produk mikrobial yang banyak diproduksi adalah enzim. Enzim merupakan produk akhir gen berupa protein dan berperan sebagai katalis pada proses pengolahan. Industri pangan banyak memanfaatkan sifat katalitik enzim untuk meningkatkan kuantitas produk dalam waktu dan biaya yang lebih sedikit serta meningkatkan karakteristik sensori produk. Enzim dapat diambil dari hewan, tumbuhan dan juga mikroorganisme (Tabel 4.1). Enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroba antara lain seperti α -amilase, selulase, glukamilase, lipase, dan protease. Sebagian besar enzim dikategorikan sebagai bahan penolong karena perannya pada proses pengolahan pangan meskipun keberadaannya tidak terdeteksi lagi di produk akhir.

Industri yang banyak memanfaatkan enzim pada proses produksinya adalah industri pengolah keju. Enzim chymosin membantu menggumpalkan susu, lipase mempercepat pematangan keju, dan laktase meningkatkan daya cerna susu sehingga mengurangi risiko alergi. Enzim yang digunakan bisa berasal dari mikroba atau hewani.

Sumber enzim harus menjadi perhatian konsumen Muslim. Keju dan whey (cairan kekuningan yang tersisa setelah dadih keju terbentuk) yang diproduksi menggunakan enzim dari sumber haram atau hewan yang tidak disembelih secara Islam adalah haram (Che Man dan Sazili, 2010).

Enzim yang diambil dari tumbuhan adalah halal untuk dikonsumsi. Contohnya enzim papain yang diekstrak dari pepaya dan enzim amilase yang diambil dari barley/malt. Jika enzim tersebut berasal dari sumber hewan yang halal maka dianggap halal selama hewan disembelih menurut syariat Islam. Jika tidak, maka enzim akan menjadi syubhat (diragukan). Misalnya enzim pepsin/protease dapat diekstraksi dari perut sapi/babi dan hati sapi (Mathewson, 1998).

Tabel 4.1. Asal enzim dan fungsinya

Asal	Jenis	Aktivitas	Penggunaan
Bakteri	<i>Bacillus</i>	Protease	Daging, minuman
Bakteri	<i>Streptomyces</i>	Isomerase	Minuman, pati
Kapang	<i>Aspergillus</i>	Protease	Keju
Kapang	<i>Mucor</i>	Lipase	Keju, lemak/minyak
Khamir	<i>Saccharomyces</i>	Invertase	Cokelat
Khamir	<i>Kluyveromyces</i>	Chymosin/ renin	Keju
Tumbuhan	Barley/ malt	Amilase	Roti, gula
Tumbuhan	Papaya	Papain/ protease	Roti, minuman
Hewan	Bovine liver	Katalase	Minuman, susu
Hewan	Ruminansia	Renin/ protease	Keju
Hewan	Perut babi/sapi	Pepsin/ protease	Keju/ sereal

Sumber: Mathewson, 1998

Beberapa enzim dihasilkan dari hasil rekayasa secara biologis menggunakan mikroba (bakteri, kapang, atau khamir) melalui proses fermentasi. Produk mikrobial (bahan penyusun, enzim, mikroba rekombinan, dan bahan penolong) sudah ditetapkan menjadi

titik kritis kehalalan produk (LPPOM MUI, 2010). Enzim sintetik akan dianggap halal hanya jika bahan dan bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi halal dan metode pengolahannya tidak melanggar prinsip dasar Halal. Terdapat enam titik kritis pada proses produksi enzim secara fermentasi, yaitu asal bahan baku, asal mikroba, bahan penolong yang dipakai, media pertumbuhan mikroba, *ingredient* yang dipakai, pengemasan, dan pelabelan (Riaz dan Chaudry, 2019). Kehalalan produksi enzim dengan prinsip bioteknologi antara lain sumber mikroba, media yang digunakan untuk pertumbuhan atau penyegaran, gen asing yang disisipkan ke mikroba, resin kromatografi yang digunakan untuk purifikasi, zat aditif yang ditambahkan untuk stabilitas enzim, dapat pula berasal dari bahan pemecah sel jika merupakan suatu enzim intraseluler. Enzim yang dihasilkan murni berasal dari mikroorganisme maka kemungkinan halal akan lebih tinggi meskipun perlu dianalisa media pertumbuhan yang digunakan. Namun jika berasal dari produk bioteknologi maka resiko tidak halal akan meningkat (Atma et al., 2018).

G. Titik Kritis Kehalalan Produk Lain-Lain

Produk lain-lain merupakan bahan yang digunakan dalam proses produksi pangan, obat, dan kosmetika yang bukan berasal dari sumber nabati, hewani, dan mikrobial. Produk yang termasuk produk lain-lain adalah bahan tambang/mineral, bahan sintetik hasil reaksi kimia (baik tunggal maupun campuran), dan bahan campuran yang banyak digunakan sebagai bahan tambahan dan bahan penolong pada proses pengolahan.

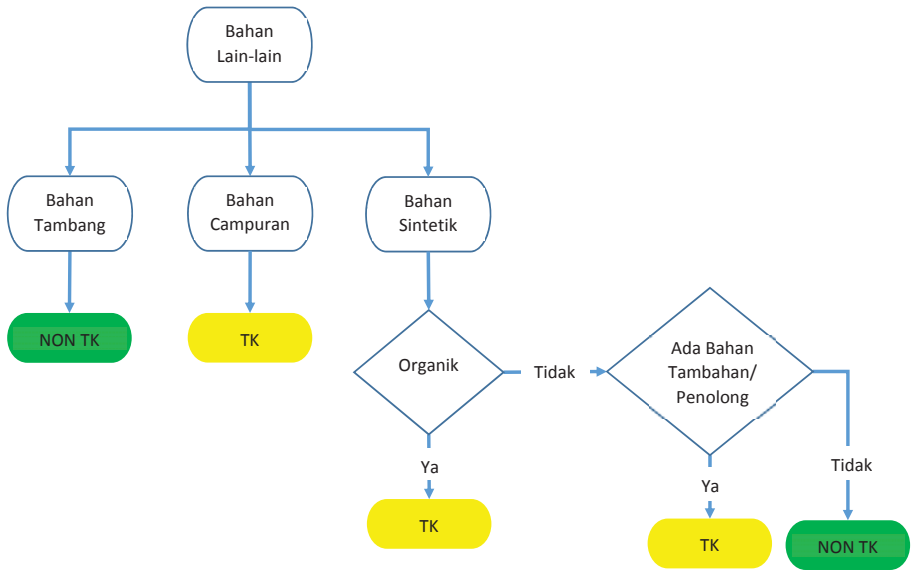
Kebanyakan produk lain-lain yang berasal dari bahan tambang merupakan produk yang pasti halal karena diambil langsung dari alam tanpa melalui proses pengolahan atau penambahan bahan lain. Misalnya bentonit yang dipakai pada proses penyaringan atau pemucatan. Demikian juga bahan kimia anorganik yang disintesis

secara kimia. LPPOM MUI mengategorikan bahan-bahan tersebut ke dalam Daftar Bahan Tidak Kritis (*Halal Positive List of Material*) (LPPOM MUI 2019). Bahan lain-lain yang patut dicermati titik kritisnya adalah bahan yang berasal dari bahan sintesis organik dan campuran. Bahan sintesis organik menjadi titik kritis karena dapat dibuat atau diproduksi dari bahan organik. Bahan campuran dibuat dengan mencampurkan atau menggabungkan beberapa bahan tanpa melalui reaksi kimia. Titik kritis kehalalan produk lain-lain dapat ditelusuri mengikuti pohon keputusan seperti dapat dilihat pada Gambar 5.

Dalam aplikasi di industri pangan, obat, dan kosmetika, produk yang termasuk produk lain-lain banyak digunakan sebagai bahan tambahan atau bahan penolong yang dapat meningkatkan sifat fungsional produk. Jenis dan jumlahnya sangat banyak sehingga pada proses pemeriksaan halal produk-produk golongan ini biasanya mendapat perhatian serius dari auditor. Pembahasan secara mendalam mengenai titik kritis kehalalan bahan tambahan dan bahan penolong proses produksi dapat dibaca pada bagian lain dalam buku ini.

1. Produk Campuran Perisa

Produk campuran menjadi titik kritis karena terbuat dari campuran beberapa bahan yang harus diteliti satu per satu untuk memastikan kehalalannya. Salah satu contoh produk campuran adalah BTP perisa (*flavouring*). Perisa merupakan BTP berupa preparat konsentrat, dengan atau tanpa ajudan perisa (*flavouring adjunct*) yang digunakan untuk memberi *flavour*, dengan pengecualian rasa asin, manis, dan asam (BPOM, 2016).



Gambar 4.5. Diagram keputusan penentuan titik kritis kehalalan produk lain-lain

Produk perisa tersedia dalam berbagai bentuk, dari campuran sederhana yang diracik dari beberapa bahan cair hingga campuran kompleks yang direkayasa menggunakan teknologi enkapsulasi. Bentuk sediaan perisa dapat memiliki karakteristik kelarutan dan stabilitas panas yang berbeda disesuaikan dengan aplikasinya pada produk. Bahan baku yang digunakan dalam pembuatan perisa harus diidentifikasi dan diteliti dengan cermat status kehalalannya. Secara umum, Butrym et al. (2019) memberikan empat prinsip aturan halal untuk produk campuran:

1. Produk hewani harus halal baik secara intrinsik (madu, telur, susu) atau dari hewan halal yang disembelih menurut hukum Islam. Bahan nabati secara umum halal kecuali GMO.
2. Minuman keras (khamr) dan etanol yang berasal dari industri khamr adalah haram. Alkohol/etanol non-khamr diperbolehkan dengan syarat tertentu.

3. Bahan hasil fermentasi (termasuk mikroba dan enzim) harus memenuhi prinsip halal.
4. Fasilitas produksi, peralatan, dan lingkungan produksi harus dikelola untuk mencegah kemungkinan kontaminasi produk halal dengan bahan haram.

Evaluasi status halal produk yang terdiri dari campuran banyak bahan dilakukan dengan berfokus pada bahan yang memiliki risiko tertinggi. Berikut ini beberapa ingredien bahan mentah penyusun produk campuran perisa yang harus diwaspadai kehalalannya.

2. Oleoresin dan minyak esensial

Bahan dasar produk campuran perisa yang berasal dari sumber nabati termasuk bahan yang rendah risiko ketidakhalalannya. Oleoresin dan minyak esensial dapat berasal dari ekstrak yang diperoleh dengan memisahkan (ekstraksi) senyawa aktif dari matriks biologisnya. Proses pemisahan tersebut umumnya menggunakan pelarut air atau etanol. Etanol yang digunakan diperbolehkan jika kadarnya kurang dari 0.5% dan tidak boleh berasal dari industri khamr (MUI, 2018). Selain etanol, gliserol juga sering digunakan sebagai pembawa (*carrier*) campuran perisa. Gliserol diperoleh dari hasil hidrolisis lemak hewan dan sekarang ini sudah banyak gliserol hasil sintesis organik menggunakan bahan dasar minyak bumi (da Silva et al., 2009; Rotondo et al., 2017). Etanol dan gliserol juga digunakan sebagai ajudan perisa (*flavouring adjunct*) pada produk. Selain itu, proses produksi oleoresin dan minyak esensial yang melibatkan fermentasi atau aktivitas enzim harus dievaluasi untuk memastikan bahwa semua komponen memenuhi standar halal.

3. Sari buah dan konsentrat

Bahan ini merupakan ingredient perisa alami yang paling banyak digunakan. Berdasarkan asalnya bahan ini termasuk bahan

halal kecuali jika ada penambahan bahan lain seperti penjernih, penstabil atau pengemulsi yang menjadi subjek pengawasan kehalalan (Butrym et al., 2019). Sari buah dan konsentrat dapat mengandung etanol yang terbentuk secara alami. Produk non fermentasi yang mengandung alkohol/etanol kurang dari 0.5% yang bukan berasal dari khamr hukumnya halal (MUI, 2018).

4. Asam amino

Asam amino banyak digunakan sebagai ingredien perisa untuk meningkatkan rasa gurih, misalnya asam glutamat. Asam amino diperoleh dari hasil hidrolisis protein, baik protein hewani maupun nabati. Sumber protein menjadi titik kritis kehalalan asam amino. Asam amino L-sistein dapat berasal dari rambut manusia, rambut hewan, bulu hewan, atau secara dibuat secara sintetis. Sistein yang terbuat dari rambut manusia dilarang digunakan dalam produksi produk halal. Sedangkan L-sistein dari bulu diperbolehkan jika berasal dari hewan halal yang disembelih dengan tepat. Jika dibuat secara sintetis atau hasil fermentasi, asam amino tersebut juga dapat dianggap halal, asalkan semua langkah dan bahan sesuai dengan prosedur halal (Butrym et al., 2019).

5. Lipida dan asam lemak

Lipida, termasuk lemak, asam lemak, lilin, dan sterol, banyak digunakan dalam perisa untuk memberi karakter sensori dan fisik. Dalam sistem enkapsulasi perisa, turunan lipida seperti campuran lesitin dan gliserol ester sering digunakan untuk menstabilkan sistem dan membantu retensi *flavor* (Butrym et al., 2019). Selain sintetis, sebagian besar bahan ini tersedia sebagai bahan alami dari sumber tumbuhan dan hewan. Lipida hewani dan hasil bioteknologi harus diwaspadai kehalalannya. Pada produk perisa daging, saat prosesnya diperlukan *base* yang dibuat dari hasil reaksi asam amino

atau protein hidrolisat, gula, dan lemak (Lieske dan Konrad, 1994). Pada saat formulasi perisa daging, sering kali diperlukan penambahan lemak hewani sehingga harus jelas cara penyembelihan hewannya.

6. Bahan hewani

Beberapa produk perisa juga sangat mungkin menggunakan bahan asal hewan, seperti ekstrak *castoreum* pada perisa vanilla. *Castoreum* diperoleh dengan ekstraksi alkohol dari kelenjar aroma hewan berang-berang (Burdock, 2007). Karena berang-berang hanya mengkonsumsi daun dan kulit kayu, *castoreum* tidak berbau seperti sekresi hewan lainnya. Ekstrak *castoreum* digunakan sebagai komponen *flavour* perisa sebab mempunyai aroma harum vanilla yang tajam sehingga ketika ekstrak ini dilarutkan dalam alkohol akan memberikan sensasi buah yang menyenangkan (Angayarkanni et al., 2019). Bahan tersebut sudah tersedia dalam bentuk sintesis, namun bahan alaminya masih digunakan untuk beberapa produk perisa karena dianggap memiliki karakteristik sensori yang khas. Perisa vanilla yang mengandung *castoreum* ini digunakan sebagai BTP pada produk minuman, makanan penutup dari susu, permen, roti, gelatin dan puding (Burdock, 1995). *Castoreum* sebagai aditif dikategorikan sebagai GRAS (*Generally Recognized as Safe*) oleh FDA (US *Food and Drug Administration*) sehingga produsen boleh menyebutkannya sebagai perisa alami pada label (US FDA, 2020).

Perisa bersertifikat halal menjadi bagian penting pada proses pembuatan produk karena perisa dapat diproses dengan berbagai cara dan melibatkan berbagai jenis ingredien dalam produksinya. Meskipun perisa yang digunakan sebagai BTP sangat kecil persentasenya dalam formulasi pangan, namun adanya bahan-bahan yang kritikal membuat produk campuran perisa harus diwaspadai status kehalalan. Sertifikasi halal perisa memberikan jaminan kepada pro-

dusen pangan dan konsumen bahwa semua bahan dalam komposisi perisa tersebut mengikuti aturan halal.

Referensi

- Angayarkanni, R., Sridevi, G., Mohanambaal, D., Nagamuruga, B. 2019. A Perilous Consequence of Ice-Cream. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 8 (09): 824–829.
- Atma, Y., Taufik, M., Seftiono, H. 2018. Identifikasi Resiko Titik Kritis Kehalalan Produk Pangan: Studi Produk Bioteknologi. *Jurnal Teknologi*, 10 (1): 59–66. <https://doi.org/10.24853/jurtek.10.1.59-66>
- [BPOM]. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2016. Persyaratan Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Perisa. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI No. 22 tahun 2016.
- Burdock, G.A. 1995. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*, 3rd ed., Vol. 1 and 2. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Burdock, G. A. 2007. Safety Assessment of Castoreum Extract as a Food Ingredient. *International Journal of Toxicology*, 26: 51–55. <https://doi.org/10.1080/10915810601120145>
- Butrym, E., LaCourse, L., Riaz, M. N., Chaudry, M. M. 2019. Flavors, Flavoring, and Essences in Halal Food. In M. N. Riaz & M. M. Chaudry (Eds.), *Handbook of Halal Food Production* (pp. 185–199). Boca Raton.
- [CAC]. The Codex Alimentarius Commission. 1997. General Guidelines for Use of the Term “Halal”. CAC/GL 24-1997.
- Che Man, Y. B., Sazili, A. Q. 2010. Food Production from the Halal Perspective. In I. Guerrero-Legarreta (Ed.), *Handbook of Poultry Science and Technology* (pp. 183–215). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- da Silva, G. P., Mack, M., Contiero, J. 2009. Glycerol : A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27: 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>
- Dufossé, L. 2018. Microbial Pigments From Bacteria, Yeasts, Fungi, and Microalgae for the Food and Feed Industries. In *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes* (pp. 113–132).
- Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J. L., Aittaleb, M., Baise, E., Genicot, S., Gerday, C. (1996). *Enzymes from Psychrophilic Organisms*.

- Hasan, K. S. 2014. Kepastian Hukum Sertifikasi dan Labelisasi Halal Produk Pangan. *Jurnal Dinamika Hukum*, 14 (2): 227–238.
- Hetami, K. 2009. Pelabelan Produk Pangan yang Mengandung Bahan Rekayasa Genetika Sebagai Wujud Asas Keterbukaan Informasi. Tesis. Program Magister Ilmu Hukum. Universitas Diponegoro.
- [Kemenag]. Kementerian Agama Republik Indonesia. 2020. Qur'an Kemenag. www.kemenag.go.id [diakses 1 September 2020].
- Khattak, J. Z. K., Mir, A., Anwar, Z., Wahedi, H. M., Abbas, G., Khattak, H. Z. K., Ismatullah, H. 2011. Concept of Halal Food and Biotechnology. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(5): 385–389.
- Kurniadi, M., Frediansyah, A. 2016. Halal Perspective of Microbial Bioprocess Based-Food Products. *Reaktor*, 16(3): 147–160. <https://doi.org/10.14710/reaktor.16.3.147-160>
- Lieske, B., Konrad, G. 1994. Protein Hydrolysis-The Key to Meat Flavoring Systems. *Food Review International*, 10(3): 287–312. <https://doi.org/10.1080/87559129409541004>
- [LPPOM MUI]. Lembaga Pengkajian Pangan, Obat-obatan dan Kosmetik Majelis Ulama Indonesia. 2019. Daftar Bahan Tidak Kritis (Halal Positive List of Materials). Surat Keputusan LPPOM MUI No. SK15/DIR/LPPOM MUI/XI/19.
- Mathewson, P. R. 1998. *Enzymes*. St. Paul. Minnesota: American Association of Cereal Chemists.
- Mubarakfuri, A.U. M.A. A. 2008. *Tuhfatul Ahwadzi Bi Syarh Jami' At Tirmidzi*. Pustaka Azzam
- [MUI]. Majelis Ulama Indonesia. 2010. Fatwa Majelis Ulama Indonesia Nomor 01 Tahun 2010 tentang Penggunaan Mikroba dan Produk Mikrobal dalam Produk Pangan.
- [MUI]. Majelis Ulama Indonesia. 2013. Fatwa Majelis Ulama Indonesia Nomor 35 Tahun 2013 tentang Rekayasa Genetika dan Produknya.
- [MUI]. Majelis Ulama Indonesia. 2018. Fatwa Majelis Ulama Indonesia Nomor 10 Tahun 2018 tentang Produk Makanan dan Minuman yang Mengandung Alkohol/Etanol.
- Pramashinta, A., Riska, L., Hadiyanto. 2014. Bioteknologi Pangan : Sejarah, Manfaat dan Potensi Risiko. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 1: 1–6.

- Qardhawi, Y. 1993. Halal Dan Haram Dalam Islam. PT. Bina Ilmu.
- Riaz, M. N., Chaudry, M. M. 2019. Enzymes in Halal Food Production. In M. N. Riaz & M. M. Chaudry (Eds.), Handbook of Halal Food Production (pp. 167–175). Boca Raton.
- Rotondo, F., Ho-Palma, A. C., Remesar, X., Fernández-Lopez, J. A., Romero, M. del M., Alemany, M. 2017. Glycerol is Synthesized and Secreted by Adipocytes to Dispose of Excess Glucose, Via Glycerogenesis and Increased Acyl-glycerol Turnover. *Nature*, 7(8983): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09450-4>
- [US FDA]. US Food and Drug Administration. 2019. CFR-Code of Federal Regulations Title 21. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=582.50>. [diakses 10 November 2020].
- Zailani, S. H. M., Ahmad, Z. A., Wahid, N. A., Othman, R., and Fernando, Y. 2010. Recommendations to Strengthen Halal Food Supply Chain for Food Industry in Malaysia. *Journal of Agribusiness Marketing*, Special edition, October: 91– 105.

BAB V

BAHAN HALAL DALAM PENGOLAHAN MAKANAN DAN ADITIF MAKANAN

Miftakhur Rohmah¹, Kartika Sari², Anton Rahmadi^{1,3}

¹ *Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Mulawarman*

² *Alumni Jurusan Teknologi Hasil Pertanian,
Universitas Mulawarman*

³ *PUI-PT Oktal, Universitas Mulawarman*

A. Pengantar

Konsep halal dan haram bagi kehidupan umat muslim sangat penting sesuai dengan ajaran dalam Al Quran dan Hadits, hal ini berhubungan dengan semua aktivitas yang dijalani. Konsep halal dan haram tidak hanya sekedar diterapkan pada pemenuhan syariat islam seperti penyembelihan hewan, namun juga mencakup semua hal yang berkaitan dengan produk yang dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari, meliputi pangan halal, kosmetik, farmasi, gaya hidup maupun pelayan yang sesuai dengan syariat agama islam (Elasrag 2016). Dalam islam, pangan halal selalu beriringan dengan istilah *Thoyyib*, atau juga disebut dengan *halalan thoyyiban*. *Halalan thoyyiban* meliputi makanan halal yang aman, berkualitas, dan juga bernutrisi, yang sedianya bermanfaat untuk kesehatan tubuh dan tidak membahayakan fisik, jiwa serta akal bagi yang mengkonsumsinya (Nafis 2019).

Industri makanan berkembang sangat pesat saat ini berimbas pada peningkatan kebutuhan pasar untuk makanan halal secara global (Fathoni dan Syahputri 2020). Populasi umat muslim merupakan segmentasi pasar yang cukup banyak dalam hal pemilihan produk makanan, sehingga aturan peredaran makanan halal dimuat

secara nasional maupun Internasional. Aturan tersebut memuat aturan terkait pedoman pangan halal dan thoyib yang meliputi ruang lingkup, definisi, kriteria, dan persyaratan pelabelan untuk digunakan. Dalam standar halal, regulasi menjadi sangat penting untuk memastikan bahwa setiap orang mematuhi prosedur atau spesifikasi produk yang sama, yang sebagai imbalannya memfasilitasi prosedur logistik, perdagangan, mencegah penipuan konsumen, dan meningkatkan kualitas produk (Dankers, 2003).

Produk makanan olahan sebagian besar menggunakan bahan tambahan pangan/aditif dengan berbagai tujuan, seperti; meningkatkan kualitas bahan pangan, meningkatkan stabilitas, mengawetkan makanan, dan meningkatkan rasa, tekstur, konsistensi atau warna serta tujuan lainnya (Gherezghier *et al.* 2017). Perhatian besar terhadap penggunaan aditif perlu dikritisi terkait sumber aditif dan juga takaran aditif yang ditambahkan pada bahan makanan, terutama penggunaan aditif yang sintetis untuk menjaga kualitas dan keamanan pangan. Perhatian terkait penggunaan aditif yang dapat terindikasi mengakibatkan toksisitas apabila tidak digunakan dengan bijak juga perlu dilakukan.

Uni Eropa (UE) merupakan persatuan politik dan ekonomi yang saat ini berkembang dengan baik dalam upaya mengembangkan regulasi keamanan pangan, dan menghasilkan kebijakan dengan standar yang tinggi untuk menjamin produk aman dikonsumsi untuk kesehatan (Broberg 2009). Standar sertifikasi kehalalan produk dalam sistem perdagangan Internasional mulai mendapat perhatian lebih dalam upaya memberikan perlindungan konsumen untuk memakan produk halal. Sistem regulasi Internasional memastikan semua jenis aditif yang digunakan tidak memberikan pengaruh negatif terhadap konsumen dan memberi perlindungan konsumen. Praktek perdagangan bahan pangan diawasi dengan resmi dan secara ketat diberlakukan regulasi yang harus dipatuhi. Gherezghier

et al. (2017) menyebutkan bahwa aditif yang termasuk dalam daftar positif disetujui oleh organisasi pengatur regulasi untuk tersedia di pasar dan digunakan, sedangkan bahan aditif yang berdampak buruk bagi kesehatan masuk ke dalam daftar negatif dan tidak boleh dipasarkan. Hal ini juga selaras dalam upaya menjaga kehalalan produk pangan yang menggunakan berbagai jenis aditif serta metode produksi yang dilakukan sesuai dengan undang-undang yang berlaku.

B. Definisi Aditif Makanan

Codex Alimentarius mendefinisikan zat aditif sebagai suatu zat yang biasanya tidak dikonsumsi sebagai makanan langsung, tidak berfungsi sebagai penciri produk, memiliki atau tidak memiliki nilai gizi, yang sengaja ditambahkan pada makanan untuk tujuan teknologi (termasuk organoleptik). Tujuan teknologi dari penggunaan zat aditif digunakan dalam proses persiapan, pengolahan, pengemasan, pengangkutan, dimana semua bahan tersebut secara langsung maupun tidak langsung memiliki efek samping yang mempengaruhi karakteristik makanan baik secara fisik, kimia maupun mikrobiologi. Sedangkan Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat (FDA) mendefinisikan aditif makanan sebagai “zat apapun yang diharapkan dapat mempengaruhi secara wajar karakteristik makanan langsung atau tidak langsung”. Definisi ini mencakup substansi apapun digunakan dalam produksi, pemrosesan, perawatan, pengemasan, pengangkutan atau penyimpanan makanan (Griffiths dan Borzelleca 2014).

Penggunaan aditif dari bahan alami sebenarnya sudah dilakukan sejak turun-temurun, seperti penggunaan garam atau gula serta rempah-rempah yang bertujuan untuk mengawetkan produk makanan serta mendapatkan aroma dan rasa baru pada produk yang dihasilkan. Namun perkembangan industri saat ini memberi-

kan pengaruh yang signifikan terhadap hadirnya produk-produk pangan olahan yang modern, baik secara teknologi maupun bahan yang digunakan. Dalam industri modern, penggunaan aditif pada proses produksi biasanya berasal dari bahan sintetik yang digunakan untuk tujuan tertentu. Penggunaan aditif digunakan untuk mencapai suatu tujuan tertentu dalam upaya menjaga kualitas produk untuk tetap baik dan aman untuk dikonsumsi. Beberapa pengelompokan aditif yang digunakan pada proses produksi makanan, meliputi fungsi sebagai:

- pengawet
- pemanis
- aditif warna
- rasa, rempah-rempah
- penambah rasa
- pengganti lemak
- nutrisi
- pengemulsi
- stabilisator, pengental, pengikat, dan pembuat tekstur
- agen ragi
- agen anti-caking
- humektan
- nutrisi ragi
- penguat adonan dan kondisioner
- agen firming
- persiapan enzim
- gas.

Indonesia biasa menyebut zat aditif sebagai Bahan Tambahan Pangan (BTP) yang menurut Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) Indonesia BTP didefinisikan sebagai bahan yang ditambahkan ke dalam pangan yang difungsikan untuk mempengaruhi sifat atau bentuk Pangan. Dalam Peraturan yang dikeluarkan oleh BPOM Nomor 11 Tahun 2019 Tentang BTP menyebutkan bahwa: (1) BTP bukan merupakan bahan baku dalam pengolahan pangan dan tidak dikonsumsi sebagai makanan (2) BTP dapat mem-

punyai nilai gizi, yang sengaja ditambahkan ke dalam Pangan untuk tujuan teknologi pada pembuatan, pengolahan, penyiapan, perlakuan, pengepakan, pengemasan, penyimpanan dan/atau pengangkutan pangan untuk suatu komponen atau mempengaruhi sifat pangan tersebut, secara langsung atau tidak langsung. (3) BTP yang merupakan senyawa gizi dan digunakan sebagai sumber Zat Gizi, penggunaannya dinyatakan sebagai Zat Gizi (BPOM 2019).

Secara keseluruhan tujuan dari definisi tersebut secara hukum adalah untuk membuat regulasi yang jelas terhadap peredaran zat aditif dalam bahan pangan sehingga bisa dipastikan aman bagi yang menggunakan dan mengkonsumsi. Sedangkan definisi lainnya dari penggunaan zat aditif adalah untuk mempengaruhi rasa, sifat dan bentuk pangan. Jenis jenis bahan tambahan pangan (BTP) atau zat aditif yang digunakan pada pengolahan makanan bervariasi, mulai dari BTP alami ataupun sintetis.

C. Kelompok BTP Makanan

Berbagai jenis BTP dalam proses produksi digunakan untuk membantu memperbaiki kualitas makanan yang bertujuan meningkatkan flavour, rasa, nilai gizi, penampilan, kesegaran dan keamanan. Berdasarkan manfaatnya, zat aditif dibagi menjadi beberapa kelompok, yaitu ;

1. BTP sebagai pewarna

Pewarna biasanya digunakan dalam proses produksi dengan tujuan menyeimbangkan warna produk, yang mungkin akan pudar karena beberapa kondisi eksternal seperti paparan cahaya, udara, suhu ekstrim, kelembaban, dan kondisi penyimpanan untuk meningkatkan warna alami pada bahan yang berubah karena proses pengolahan (Cejudo-Bastante *et al.* 2014; Sagdic *et al.* 2013; Türker dan Erdogdu 2006). Beberapa pewarna yang umum sering digunakan seperti karamel,

yang digunakan dalam produk seperti saus dan minuman ringan, dan kurkumin, warna kuning yang diekstrak dari akar kunyit (Damat 2011).

2. BTP sebagai pengawet

Pengawet bertujuan memperpanjang umur simpan produk, memastikan bahwa makanan aman jika disimpan dalam waktu yang lebih lama (Martyn *et al.* 2013; Pongsavee 2015). Sebagian besar makanan yang memiliki masa simpan yang lama kemungkinan besar menyertakan pengawet, kecuali metode pengawetan lain telah digunakan, seperti pembekuan, pengalengan, atau pengeringan. Misalnya, untuk menghentikan pertumbuhan jamur atau bakteri, buah kering sering diberi sulfur dioksida, *corned beef* dan daging yang diawetkan lainnya sering diperlakukan dengan nitrit dan nitrat selama proses pengawetan. Pengawet yang lebih tradisional seperti gula, garam, dan cuka juga masih digunakan untuk mengawetkan beberapa makanan.

3. BTP sebagai sumber antioksidan

Makanan apa pun yang dibuat menggunakan lemak atau minyak margarin, mentega, mayonaise - kemungkinan besar mengandung antioksidan. Ini membuat makanan bertahan lebih lama dengan membantu menghentikan proses oksidasi sehingga meminimalkan makanan menjadi tengik dan kehilangan warna.

4. BTP sebagai pemanis

Kebanyakan produk makanan yang disukai merupakan makanan dengan rasa yang manis. Sehingga upaya untuk menambahkan pemanis dilakukan untuk memenuhi keinginan menikmati makanan manis. Selain berfungsi sebagai pengikat rasa, pemanis juga dapat berfungsi mengawetkan produk makanan. Sukrosa atau gula pasir merupakan bahan yang

banyak digunakan. Saat ini jenis beberapa jenis pemanis yang digunakan berasal dari gula yang mengandung kalori, atau gula rendah kalori atau bebas kalori.

5. BTP sebagai pengemulsi, stabilisator, pengental, dan zat pembentuk gel.

BTP pengemulsi, stabilisator, pengental, dan zat pembentuk gel. digunakan untuk membantu mencampur bahan agar tidak terpisah antara bahan yang mengandung minyak dan air. Produk makanan yang mengandung air dan minyak membutuhkan BTP yang berfungsi mengemulsi dan juga sebagai stabilisator agar struktur bahan pangan bisa kompak menyatu. Berbagai jenis BTP yang berfungsi sebagai pengemulsi, penstabil atau pengental digunakan dalam produk pangan, seperti lesitin, dan pektin memberikan pengaruh yang positif agar tekstur makanan konsisten

6. Penambah Rasa dan Perasa

BTP penambah dan penguat rasa digunakan untuk meningkatkan rasa bahan makanan menjadi lebih gurih, biasanya ditambahkan pada makan siap saji atau juga camilan yang diberikan dengan tujuan sebagai penguat rasa. Salah satu contoh BTP penguat rasa yang ditambahkan dalam produk pangan adalah *Monosodium glutamat* (MSG). Penguat rasa digunakan untuk memunculkan rasa dalam berbagai makanan gurih dan manis tanpa menambahkan rasa sendiri.

Mengapa Menggunakan BTP?

BTP makanan ditambahkan ke makanan untuk melakukan fungsi tertentu: mengawetkan makanan, meningkatkan umur simpan, memperlambat pertumbuhan mikroorganisme, mengubah tampilan atau rasa, membantu dalam pemrosesan, mengikat, dan lain-lain. Beberapa perusahaan makanan menggunakan BTP untuk membuat

makanan tampak lebih segar dan lebih berwarna untuk menarik pelanggan. Pada beberapa negara, bahan makanan mengalami keadaan makanan rusak yang disebabkan terjadinya pertumbuhan mikroba pembusuk sebelum produk dapat dimakan, adanya kejadian keracunan makanan menunjukkan bahaya dari makanan yang rusak karena kontaminasi. Semua makanan yang kita makan terdiri dari bahan kimia dalam satu bentuk atau lainnya, yang mengakibatkan adanya reaksi lanjutan. BTP alami sebenarnya merupakan bahan kimia yang bersumber dari bahan alam, seperti antioksidan, asam askorbat (vitamin C), dan asam sitrat, yang terdapat pada buah jeruk. Namun, dengan kemajuan teknologi, banyak BTP lainnya kini dibuat secara sintesis untuk menjalankan fungsi teknologi tertentu (Al-Teinaz *et al.* 2020)

Terdapat beberapa BTP yang biasa digunakan pada bahan makanan. Lesitin merupakan contoh BTP yang berfungsi sebagai pengemulsi. Lesitin dikenali dengan kode numbers E322. Lesitin merupakan BTP alami yang berasal dari campuran fosfolipid seperti fosfatidilkolin dan fosfatidiletanolamin. Sumber-sumber lesitin adalah ekstrak dari kedelai dan kuning telur. Lesitin biasa digunakan untuk saus *salad dressing*, makanan yang dipanggang, es krim. Komposisi fosfolipid yang tepat bergantung pada sumbernya. Penggunaannya termasuk saus salad, makanan yang dipanggang, dan coklat, Contoh BTP sebagai pengemulsi adalah Mono- dan digliserida asam lemak yang dikodekan dengan numbers E471, merupakan pengemulsi semi-sintetik yang terbuat dari dari gliserol dan asam lemak alami dari hewan atau tumbuhan. Umumnya digunakan untuk produk seperti roti, kue, dan margarin.

D. Legislasi terkait Aditif Makanan

Secara Internasional Legislasi tentang aditif makanan disepakati oleh dewan Bersama yang dikenali dengan nama *Codex*

Allimentarius Committee. Namun beberapa negara lain memiliki aturan-aturan tambahan terkait jenis dan standar yang diijinkan. Beberapa negara sudah memiliki legislasi yang jelas dan terstandar. Secara umum, peraturan tentang BTP menurut Codex dituangkan dalam CODEX STAN 192-1995, Rev. 3-2001. Penggunaan aditif hanya diizinkan untuk jenis aditif yang sudah mendapatkan Evaluasi dan persetujuan dari *Food and Agriculture Organization* (FAO) dan *World Health Organization* (WHO), yang selanjutnya masuk dalam standar *Codex General Standard for Food Additives* (GSFA). Standar ini memberikan ketentuan tentang spesifikasi aditif makanan, evaluasi keamanan, pada bagian mana bahan tersebut digunakan, tujuan penggunaan aditif yang secara rinci akan memuat peraturan tingkat penggunaan pada standar maksimum yang sesuai dengan *Acceptance Daily Intake* (ADI). ADI dihitung berdasarkan berat badan yang tidak mengakibatkan resiko kesehatan berarti selama konsumsi yang dikonversi dengan rata-rata berat badan normal pria dewasa, yaitu 60 kg (*Codex Alimentarius Commission* 2008).

Di Amerika Serikat (USA), legislasi penggunaan aditif disebutkan dalam peraturan yang pada umumnya aditif yang diizinkan harus diakui aman menurut *Generally Recognized as Safe* (GRAS) yang diatur oleh FDA (Neltner *et al.* 2011). Beberapa aditif sintetik dimasukkan dalam daftar 21 CFR 172.515. Peraturan penggunaan aditif di Inggris (UK) memberikan tambahan informasi terkait penggunaan pewarna pada makanan. Beberapa pewarna makanan yang mempengaruhi respon anak menjadi hiperaktif ketika mengkonsumsi makanan yang mengandung aditif, jenis aditif tersebut yaitu: sunset yellow FCF (E110), quinoline yellow (E104), carmoisine (E122), allura red (E129), tartrazine (E102), ponceau 4R (E124). Setiap aditif secara ketat diatur untuk menjaga keamanan pangan dan meminimalkan terjadinya resiko kesehatan manusia.

E. Kesepakatan Penggunaan *E-code* di Indonesia

E-numbers adalah singkatan dari "E"="Eropa", merupakan kode untuk zat yang digunakan sebagai aditif makanan di Uni Eropa (UE) dan *European Food Safety Authority* (EFSA). Biasanya ditemukan pada label makanan, penilaian keamanan dan persetujuannya adalah tanggung jawab the *European Food Safety Authority* (EFSA). *E-numbers* digunakan sebagai sistem yang mengatur penomoran khusus untuk mengidentifikasi adanya bahan tambahan makanan yang digunakan dalam industri makanan, kode tersebut biasa ditemukan pada label produk dan menunjukkan bahwa BTP tersebut disetujui di UE (Al-Harthy *et al.* 2017). Pada prinsipnya, aditif digunakan apabila diperlukan secara teknologi, aditif tidak digunakan untuk menyembunyikan bahan lain yang tidak memenuhi persyaratan, menyembunyikan teknik produksi yang tidak memenuhi syarat ataupun bertujuan untuk menutupi kerusakan. Penggunaan BTP harus memenuhi aturan dan hukum yang berlaku, tidak melebihi batas dosis takaran. Penggunaan BTP yang aman adalah semua bahan yang sudah masuk dalam peredaran yang dibuat atau diatur oleh negara setempat. Semua jenis BTP yang memiliki *E-numbers* telah diuji toksisitas dan keamanannya. Namun, setiap jenis BTP memiliki efek samping berbeda yang secara pasti akan mempengaruhi karakteristik produk.

Di Indonesia penggunaan *E-code* disebut sebagai *E-numbers* yang digunakan untuk memudahkan dalam mengidentifikasi penggunaan BTP yang terbukti aman dan juga resmi digunakan pada produk pangan olahan sesuai dengan standar Internasional Uni Eropa. Saat ini ada sembilan golongan *E-numbers* yang diatur oleh BPOM Indonesia, meliputi pewarna, pengawet, antioksidan, pengatur keasaman, pengental, penstabil, anti kempal, penguat rasa, antibiotik, serta beberapa bahan tambahan kimia lainnya (Tabel 1).

Tabel 5.1. Kategori BTP berdasarkan kelompok nomor “E”

Nomor E	Kategori
E 100 - E 199	Warna
E 200 - E 299	Pengawet
E 300 - E 399	Antioksidan, Pengatur Keasaman
E 400 - E 499	Pengental, Penstabil, Pengemulsi
E 500 - E 599	Regulator Keasaman, Agen Anti-Caking
E 600 - E 699	Penambah Rasa
E 900 - E 999	Agen Pelapis Permukaan, Gas, Pemanis
E 1000 - E 1999	Bahan Kimia Tambahan

Penggunaan *E-numbers* tergantung dari asal bahan baku yang dipakai, BTP ada yang diproduksi dari bahan organik baik hewani/nabati dan juga BTP anorganik yang berasal dari hasil sintesis bahan kimia. Namun kode *E-numbers* tidak merujuk kehalalan BTP tetapi menunjukkan BTP jenis apa yang digunakan dalam produk pangan olahan tersebut. Beberapa sumber E numbers berdasarkan sumber asal bahan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 5.2. E Number BTP berdasarkan asal bahan

Nomor E	Nama	Asal
E120	Carmine, cochineal	
E322	Lecithin	
E430	Polyoxyethylene (8) stearate	
E431	Polyoxyethylene (40) stearate	
E432	Polyoxyethylene-20-sorbitan monolaurate	
E433	Polyoxyethylene-20-sorbitan monooleate	
E434	Polyoxyethylene-20-sorbitan monopalmitate	

Nomor E	Nama	Asal
E435	Polyoxyethylene-20-sorbitan monostearate	
E436	Polyoxyethylene-20-sorbitan tristearate	
E441 (invalid)	Gelatin	Dari tulang hewan. Sejak krisis BSE utamanya dari daging babi, tetapi tulang hewan lain digunakan. Gelatin halal tersedia di toko-toko khusus.
E470	Garam asam lemak	
E471	Mono- dan di-glycerides dari asam lemak	
E472	Esters dari mono- dan di-glycerides	
E473	Ester gula dari asam lemak	
E474	Gula glycerides	Kombinasi gula dan asam lemak
E475	Polyglycerol esters dari asam lemak	
E477	Propylene-glycol esters dari asam lemak	
478	Campuran dari glycerol- dan propylene- glycol esters dari asam laktat dan asam lemak	
E479 dan 479b	Minyak kedelai yang diesterifikasi	
E481/2	Natrium(sodium)/calciu m-stearyl lactate	Campuran asam laktat dan asam stearat, suatu asam lemak
E483	Stearyl tartrate	Campuran asam tartarat dan asam stearat, asam lemak
484	Stearyl citrate	Campuran asam sitrat dan asam stearat, asam lemak

Nomor E	Nama	Asal
E485 (invalid number)	Gelatin	Dari tulang hewan. Sejak krisis BSE utamanya dari daging babi, tetapi tulang hewan lain digunakan. Gelatin halal tersedia di toko-toko khusus.
E491-495	Campuran dari sorbitol dan asam lemak	
542	Fosfat tulang yang bisa dikonsumsi	Dari tulang hewan. Sejak krisis BSE utamanya dari daging babi, tetapi tulang hewan lain digunakan.
E570-573	Stearic acid dan stearate	Asam stearat adalah asam lemak
E626-629	Guanylic acid dan guanyllinates	Terutama dari ragi, juga dari sarden dan daging
E630-635	Inosinic acid dan inosinates	Terutama dari daging dan ikan, juga dibuat dengan bakteri
636 and 637	Maltosa dan isomaltosa	Dari malt (barley), terkadang juga dari pemanasan gula susu
E640	Glycine	Terutama dari gelatin (lihat 441 di atas), juga dibuat secara sintesis
E901	Lilin lebah	Dibuat oleh lebah, tetapi tidak mengandung serangga
E904	Shellac	Polimer alami yang berasal dari spesies kutu tertentu dari India. Serangga terjebak di resin
913	Lanolin	Lilin dari domba. Itu diekstraksi oleh kulit domba dan diekstraksi dari wol.
920-21	l-Cysteine/l-cystine	Berasal dari protein, termasuk protein hewani dan rambut
E966	Lactitol	Terbuat dari gula susu
1000	Cholic acid	Dari daging sapi (empedu)
E1105	Lysozyme	Dari telur ayam

a Source: taken from <http://www.food-info.net>

Selain *E-Numbers* yang berasal dari sumber bahan, dalam islam juga terdapat golongan *E-Numbers* yang dilarang dan *E-Number* syubhat (Tabel 3). Di Negara lain penggunaan kode “E” pada label makanan memiliki aturan pelabelan yang berbeda, sebagai contoh :

- E120: cochineal (warna merah dari serangga), menurut Mazhab Hanafi
- E124: jika cochineal red A digunakan
- E441: gelatin, jika dari babi
- E542: fosfat tulang yang dapat dimakan jika berasal dari tulang babi.

Tabel 5.3 E-Numbers yang termasuk golongan haram dan atau syubhat

Nomor E	Bahan Makanan	Syubhat/Haram
E106	Riboflavin 5-sodium phosphate	Syubhat
E120	Cochineal, carmines (hewan)	Haram
E140	Chlorophyll, chlorophyll	Haram
E161b	Lutein	Haram
E252	Potassium nitrate, saltpetre	Haram
E304	Ester asam lemak dari asam askorbat	Syubhat
E322	Lesitin dari lemak hewani	Syubhat
E431	Polyoxyethylene	Haram

Pada dasarnya E Number di izinkan dan digunakan secara luas di Negara Islam. Namun, bukan berarti semua zat aditif selalu halal, ada beberapa aditif yang dilarang, contohnya E120 dan E904 dilarang karena terbuat dari atau mengandung serangga. E901 dibuat oleh serangga, seperti madu, tetapi tidak mengandung serangga sehingga umumnya dianggap halal. Contoh lain adalah yang menjadi perhatian adalah bahan aditif yang bersumber dari asam lemak,

karena perlu diketahui asalnya dari tumbuhan atau hewan, walaupun secara kimiawi asam lemak identik, namun komposisi kimianya tidak dapat ditentukan apakah lemak nabati atau hewani. Beberapa aditif yang berfungsi sebagai emulsi juga diketahui bersumber dari bahan yang haram, berikut beberapa pengemulsi yang ditemukan dalam makanan kaleng dan kemasan yang masuk dalam kategori halal.

Tabel 5.4 Beberapa kode number BTP Pengemulsi yang masuk dalam kategori haram

Nomor E	Deskripsi pengemulsi
E120	Cochineal: asam lemak dan kuning telur
E140	Asam lemak dan fosfat
E141	Asam lemak
E252	Limbah hewani dan nabati
E422	Asam lemak, produk sampingan dalam pembuatan sabun
E430	Molekul asam lemak
E431	Asam lemak
E470	Pengemulsi dan stabilisator - garam atau ester asam lemak dari lemak babi
E471	Gliserin dan asam lemak
E472(a)	Ester asam asetat dari mono- dan digliserida dari asam lemak
E472(b)	Acid ester dari mono- dan diglycerides dari asam lemak
E472(c.)	Ester asam lemak dari mono dan di-glycerides dari asam lemak
E472(d)	Ester asam tartarat dari mono- dan digliserida dari asam lemak
E472(e)	Ester asam mono-diacetyltartaric dari mono- dan digliserida asam lemak
E473	Ester sukrosa dari asam lemak
E474	Lemak (lemak babi), lemak (lemak hewan keras), minyak sawit, dll.
E475	Ester poliglicerol dari asam lemak
E477	Propilen glikol ester dari asam lemak

Nomor E	Deskripsi pengemulsi
E478	Ester asam laktat dari gliserol dan propena - 1,2 - diol
E481	Sodium stearoyl-2 lactylate
E482	Calcium stearoyl-2 lactylate
E483	Stearyl tartrate
E491	Sorbitan monostearate
E492	Sorbitan tristearate (span 65)
E494	Sorbitan monooleate (span 80)
Kode Nomer termasuk kategori Haram (tanpa menggunakan awalan 'E'):	
476	Ester poligliserol dari asam polikondensasi minyak jarak
542	Fosfat tulang yang dapat dikonsumsi
570	Asam stearat
572	Magnesium Stearate
631	Ekstrak daging, sarden kering, dan natrium 5 - inosinate
Pengemulsi haram lainnya:	
120, 141, 160(A), 161, 252, 300, 301, 433, 435, 422, 430, 431, 471, 472(a.e), 436, 441, 470, 476, 477, 473, 474, 475, 491, 492, 481, 482, 483, 570, 572, 494, 542	

F. Tinjauan Singkat Kehalalan dalam Aditif Makanan

Makanan sebagai salah satu kebutuhan pokok bagi kehidupan manusia, umumnya memberikan gambaran lingkungan atau sejarah suatu komunitas atau kelompok. Setiap pengolahan makanan halal dan thoyyib akan merujuk pada proses produksi yang bersentuhan dengan penggunaan aditif makanan. Pada umumnya, semua makanan yang dikonsumsi terdiri dari satu kesatuan unsur-unsur kimia yang secara alami ada dalam sumber bahan pangan. Dalam melakukan proses produksi, metode dan teknik digunakan untuk merubah bahan segar menjadi makanan yang siap dikonsumsi. Bagian proses atau tahapan serta bahan baku yang digunakan akan bersentuhan dengan penggunaan aditif yang bertujuan merubah karakteristik pangan olahan. Pada dasarnya, pengolahan makan ber-

tujuan untuk memastikan produk makanan aman, meningkatkan keamanan dan kesegaran produk, meningkatkan dan mengontrol fungsionalitas konstituen makanan, meningkatkan masa penyimpanan produk makanan, meningkatkan atau mempertahankan nilai gizi, menjaga kualitas produk makanan, mengembangkan produk makanan tradisional dan inovatif, dan dapat mengisolasi senyawa tertentu dan memanfaatkan potensi biologis konstituen.

Penggunaan aditif bertujuan meningkatkan variasi makanan sehingga membantu memenuhi kebutuhan konsumen memperoleh makanan yang lebih lezat, dengan aroma dan rasa yang berbeda dan tujuan lain mampu memberikan manfaat bagi kesehatan (Pasca *et al.* 2018). Pada setiap tujuan proses tersebut penting diperhatikan titik kritis yang menjamin kehalalan makanan, dalam hal ini perlu identifikasi sumber bahan makanan yang digunakan mampu menjamin kehalalan produk (Kamaruddin *et al.* 2012). Sumber bahan dari hewani seperti daging sebagai salah satu titik kritis halal atau tidaknya produk yang dihasilkan. Penggunaan bahan aditif yang perlu ditelusuri asal sumber bahan aditif tersebut. Sehingga memastikan semua telah memenuhi standar halal yang selanjutnya akan berimplikasi pada penerapan pangan yang thoyib. Meningkatnya perkembangan pangan modern mengakibatkan fenomena terjadinya penggunaan bahan kimia yang diluar regulasi, hal ini akan memberi dampak negatif. Islam menetapkan pedoman dan prinsip hukum yang jelas tentang legalitas bahan dari sumber yang haram, baik dari hewan maupun yang tidak bersih. Penggunaan sumber bahan yang jelas halal dan haramnya. Berikut beberapa sumber bahan pangan olahan serta pengelompokan bahan yang halal dan haram yang dirangkum dalam Al-teinaz (2020) :

Sumber bahan makanan yang umum adalah:

- hewan (susu, telur, daging, makanan laut)

- tanaman (buah-buahan, sayuran, rempah-rempah, makanan laut)
- sintetis (perasa, warna, aditif)
- difermentasi (asam organik, kultur, enzim).

Sumber Bahan Halal, Sumber bahan-bahan halal dapat diringkas sebagai berikut:

- sayuran : semua sayuran halal kecuali yang memabukkan (mis. Apel yang difermentasi, anggur yang difermentasi, dll.)
- hewan yang digolongkan halal.
- hewan halal yang disembelih oleh seorang Muslim dengan memastikan pengambilan darah dari bangkai secara lengkap dan penanganan yang baik terhadap hewan yang disembelih
- bahan sintetis.

Selanjutnya adalah pangan haram diartikan sebagai makanan atau minuman yang dilarang oleh Al-Qur'an dan Sunnah, meliputi beberapa contoh :

- babi,
- alkohol
- darah
- hewan mati
- hewan disembelih tanpa menyebut nama Allah

Selain kelompok Halal dan Haram pada bahan baku, proses produksi termasuk metodologi yang digunakan, dalam agama Islam mengelompokkan alam istilah yang disebut Syubhat yang dalam istilah Arab yang berarti 'dicurigai' atau 'diragukan'. Di antaranya bahan-bahan tersebut meliputi:

- gelatin : dari daging babi, daging sapi, ikan
- gliserin/gliselerol: dari saponifikasi lemak hewani
- pengemulsi : dari hewan
- enzim : hewan, mikroba, bioteknologi
- bahan susu : *whey*, keju

- minuman beralkohol
- protein/lemak hewani
- perasa dan senyawa campuran
- taurin : sering digunakan dalam minuman energi, sebagian besar berasal dari empedu babi
- pepsin, penjernih, dan penstabil: digunakan untuk membuat minuman terlihat jernih
- *cloudifier* : digunakan untuk membuat jus terlihat keruh
- karbon aktif dan perasa : untuk aroma buah

Dengan mengetahui mana yang halal, haram dan syubhat ada beberapa hal yang perlu diperhatikan, meliputi (Riaz 1998):

- Proses pengolahan dilakukan sesuai dengan ajaran islam
- Produk harus diperiksa untuk melihat apakah ada keterlibatan produk beralkohol selama pemrosesan.
- Dalam produk akhir, bahan beralkohol tidak boleh melebihi batas yang diizinkan.
- Bahan kemasan tidak boleh mengandung bahan haram.
- Kontaminasi silang dengan bahan haram apa pun harus dihindari.
- Peralatan harus dicuci dengan penggunaan deterjen yang diperbolehkan.

G. Titik Kritis Halal Aditif Makanan

Penggunaan BTP dalam proses produksi sangat diperhatikan, terkait pengaruh yang dihasilkan. Jaminan keamanan pangan (*food safety*) dari penggunaan aditif menjadi hal krusial yang telah diatur dalam undang-undang pangan (Ghany 2005). Produksi makanan dalam skala rumah tangga ataupun industri pada dasarnya selalu menggunakan aditif, baik yang secara langsung maupun tidak langsung ditambahkan. Penggunaan dalam pangan olahan rumah tangga relatif dalam jumlah yang kecil dan tidak bervariasi, karena

makanan yang diolah segera dimakan. Namun penggunaan aditif dalam industri skala besar lebih variatif dengan tujuan distribusi yang jauh, serta kebutuhan distribusi yang lebih besar seperti supermarket atau toko dan juga didistribusikan pada daerah yang jauh sehingga memerlukan waktu simpan sebelum dikonsumsi.

Faktor keamanan pangan menjadi perhatian utama dalam penggunaan aditif, pengendalian resiko tidak halal pada produk pangan olahan dilakukan dengan menetapkan titik kritis kehalalan pangan olahan tersebut. Titik kritis kehalalan produk pangan merupakan suatu tahapan produksi pangan di mana akan ada kemungkinan suatu produk menjadi haram. Setiap bahan dan metode produksi memiliki titik kritis yang menjamin halal atau tidaknya produk tersebut. Sebagai contoh, produk pangan yang merupakan hasil bioteknologi seperti keju, yogurt, kecap, dan lain-lain. Identifikasi titik kritis kehalalan produk baru yang berasal dari hewani maupun nabati perlu diuraikan melalui alur produksi, sehingga penentuan tingkat resiko yang bisa mengakibatkan ketidakhalalan bisa dipastikan dengan benar (Adawiyah dan Kulsum 2019).

Pada pembuatan keju terdapat titik kritis pada saat proses koagulasi, di mana diperlukan BTP yang membantu proses penggumpalan, metode yang dilakukan bisa melalui metode enzimatis dengan menggunakan enzim renin atau bisa juga dengan metode mikrobiologi (Atma *et al.* 2017). Titik kritis paling tinggi adalah dari bahan baku yang bersumber dari hewan yang harusnya melalui proses penyembelihan yang benar terlebih dahulu menurut syariat islam (Apriyantono 2012)

H. **Teknologi Baru dalam Pengolahan Menggunakan Bahan Tambahan Pangan**

Bahasan BTP yang bermanfaat sebagai komponen pangan fungsional berkaitan dengan skenario nutrisi berteknologi tinggi dapat mencakup produk-produk dan komponen-komponen pangan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan, perkembangan, pemeliharaan dan kecerdasan manusia. Berdasarkan ilmu genetika dan epigenetika, BTP yang terlibat sebagai sumber nutrisi berteknologi tinggi dapat menjadi pembawa komponen-komponen fungsional yang berhubungan dengan kecerdasan. Terdapat tiga dimensi kecerdasan yang dipengaruhi oleh pangan fungsional secara langsung, yaitu kecerdasan intelektual, emosional, dan mental.

Hubungan penambahan BTP sebagai komponen pangan fungsional yang berfungsi untuk peningkatan kecerdasan intelektual dapat dicontohkan dengan asam lemak tidak jenuh (*polyunsaturated fatty acid*, PUFA), misalnya linoleat, oleat, *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA). Komponen BTP sebagai pangan fungsional yang terdapat dalam sayuran seperti asam lipoat dapat meningkatkan daya tangkap pada memori temporer. Contoh lain adalah BTP berupa vitamin A (asam retinoat) disebutkan memiliki peran dalam menjaga plastisitas saraf dan fungsi kognitif (Olson dan Mello 2010).

BTP sebagai pangan fungsional juga dapat ditambahkan dengan maksud meningkatkan kecerdasan emosional, misalnya BTP yang menyebabkan terjadinya penurunan asupan makanan atau restriksi kalori. Efek dari penurunan nafsu makan adalah perbaikan sensitivitas terhadap leptin. Sensitivitas leptin dan keseimbangannya dengan ghrelin dapat memunculkan efek dopamine yang lebih awal, sehingga tubuh memiliki kemampuan menahan diri terhadap makan dalam jumlah yang lebih banyak. Pangan fungsional berpengaruh terhadap penurunan produksi hormon kortisol, sehingga

stress yang dialami di tingkat seluler akan menurun. BTP sebagai komponen pangan fungsional tertentu juga dapat bertujuan untuk menurunkan pengaruh negatif makanan beralkohol. Sebagai akibatnya, potensi depresi dan cepat emosi atau sumbu pendek akan berkurang.

Hubungan BTP sebagai komponen pangan fungsional dengan kesehatan mental dapat terdiri dari peranan BTP dalam membantu antioksidan glutathione (GSH) dalam memproteksi tubuh dari stress tingkat seluler. BTP sebagai bagian pangan fungsional dapat pula membantu tubuh untuk *recovery* dari asupan yang tidak sehat yang dapat menimbulkan depresi atau stress. BTP yang berperan sebagai nutrisi berteknologi tinggi memungkinkan penggunaannya untuk terhindar dari protein yang tercemar prion. Mutasi prion yang diakibatkan oleh asupan pangan tidak sehat dapat menyebabkan kelainan-kelainan seperti *bovine spongiform encephalopathy* (BSE), Sharpie, dan Kuru. Nutrisi berteknologi tinggi diharapkan juga mampu mencegah timbulnya alergi dan autisme sebagai akibat dari asupan makanan tertentu. Sebagai contoh BTP dalam pangan adalah Vitamin D. Penambahan vitamin ini merupakan salah satu trend saat ini, utamanya dikonsumsi dalam rangka meningkatkan kesehatan mental manula.

I. Teknologi dalam Penggunaan BTP

Faktor pendorong penggunaan BTP dari sisi teknologi adalah tersedianya *aseptic packaging technology*, *UHT*, *pasteurization*, *nano production technology*, *non-thermal processing technology*, *microwave-ready food & packaging*, *improved low-oil frying technology*, *vacuum frying & boiling technology*, *starter culture fermentation*, *drying*, *milling*, dan *niche* yang spesifik untuk produk tertentu. Sebagai contoh, UKM-UKM yang memproduksi *cracker* dapat memanfaatkan mesin-mesin seperti pengaduk BTP perisa pangan (flavor) otomatis.

Contoh lain adalah BTP sebagai hasil ekstraksi sayuran dan buah-buahan dapat diperoleh dengan bantuan teknologi microwave tanpa penggunaan tambahan pelarut. Jus (*juice*) yang dihasilkan dan ampasnya dimanfaatkan secara efisien dalam produk-produk turunan yang berperan sebagai BTP pada produk-produk pangan yang lain.

Produk pangan hasil fermentasi tradisional pada umumnya dilakukan di tempat terbuka dan dengan menggunakan peralatan yang kurang higienis. Upaya peningkatan produk tersebut dapat dilakukan dengan penambahan BTP seperti prebiotik, kultur pemula, niasin yang mencegah pertumbuhan mikroba patogen, selain dengan menghindari kontak langsung dengan pekerja dan lingkungan, melakukan pasteurisasi, dan menerapkan sanitasi *hygiene* dalam setiap penanganan pangan sesuai dengan *Good Manufacturing Procedure* (GMP).

Prinsip penambahan BTP, penerapan hygiene, dan sanitasi makanan melingkupi empat aspek, yaitu pekerja, bahan baku, peralatan, dan lingkungan tempat pengolahan. Untuk menghasilkan produk pangan hasil fermentasi lokal yang berkualitas tinggi, perilaku saniter dan higienis adalah faktor terpenting yang diaplikasikan dalam proses pengolahan, peralatan, lingkungan, dan pekerja. Upaya yang integratif perlu dilakukan di industri pengolahan pangan hasil fermentasi lokal untuk mencegah terkontaminasinya pangan oleh mikroba patogen dan pembusuk maupun konversi menjadi *alcoholic beverage* yang secara kehalalan tidak diperkenankan.

J. Fungsi Fisiologis Penggunaan BTP

Penggunaan BTP yang berasal dari sumber nabati atau hewani pada produk pangan dapat mempengaruhi fungsi fisiologis tubuh. Secara umum, fungsi fisiologis dan pengurangan terhadap penyakit dari nutrisi berteknologi tinggi dapat dibagi berdasarkan kelompok pangannya, yaitu karbohidrat, protein dan lemak, serta

vitamin dan mineral. Dalam kelompok pangan yang tinggi karbohidrat, jenis-jenis industri pada tahun 2035 yang berkembang dan bertahan adalah industri makanan khusus untuk anak-anak, manula, penderita diabetes, penderita alergi (gluten, kacang, dkk); makanan untuk olahragawan, penurunan berat badan; makanan untuk manusia normal, energi dan pertumbuhan. Dalam kelompok pangan tinggi protein dan lemak, jenis-jenis industri yang diperkirakan akan tumbuh dan berkembang di 15 tahun ke depan adalah makanan khusus formulasi untuk anak-anak, pra-stunting dan stunting, manula; makanan kesehatan: penderita alergi protein, penderita ginjal, jantung, & fenilketonuria; makanan untuk manusia normal (pemuahan kebutuhan protein); pemeliharaan tubuh dan pertumbuhan.

BTP yang terdapat dalam kelompok pangan kaya akan vitamin dan mineral, industri nutrisi berteknologi tinggi akan berfokus pada makanan khusus formulasi untuk anak-anak, pra-stunting dan stunting, manula; makanan kesehatan: prekursor enzim, metabolisme; makanan untuk manusia normal: kecukupan vitamin dan mineral, pemeliharaan tubuh dan pertumbuhan. Contoh-contoh hubungan fungsi fisiologis dengan nutrisi berteknologi tinggi dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5.5. Contoh-contoh BTP yang memiliki hubungan Fungsi fisiologis dengan nutrisi atau diet.

Fungsi	Nutrisi atau diet
Perkembangan embrio	Folat
	Kolin
	Pembatasan protein
Sel Induk	Butirat
	Asam Retinoat
(anti) Penuaan	Folat

Fungsi	Nutrisi atau diet
	Pembatasan Kalori
Fungsi Kekebalan Tubuh	Folat
(anti) Kanker	Genistein
	(-)-Epigallocatechin-3-gallate
	Curcumin dari rempah/bumbu
Kegemukan, Resistensi Insulin	Diet Tinggi Lemak
	Methyl-deficient diet (defisiensi metil)
	Curcumin dari rempah/bumbu
(anti) Peradangan	Resveratrol
	AdoMet
	Methyl-deficient diet
Neurokognisi	Kolin

Sumber: Rahmadi, A & Bohari, Y. 2018.

K. Bahan baku Sumber BTP

Jenis-jenis industri pangan yang memanfaatkan BTP dalam skenario nutrisi berteknologi tinggi juga dapat dikelompokkan berdasarkan bahan baku yang kaya akan karbohidrat, protein dan lemak, serta vitamin dan mineral. Kelompok industri pangan dengan BTP yang bersumber dari derivatif karbohidrat dalam skenario nutrisi berteknologi tinggi akan mengambil sumber pangan dari biji-bijian, sereal, sayuran dan buah, dan agar/ *seaweed*. Kelompok industri pangan kaya BTP dari kelompok derivatif protein dan lemak akan berfokus pada sumber bahan baku susu hewan dan turunannya, kedelai dan kacang-kacangan, daging hewan dan turunannya, *single cell microbe*, ekstrak albumin dan sejenisnya, *lipid equivalent* (seperti cocoa butter equivalent), dan pelarut organik untuk flavor tertentu. Kelompok industri pangan kaya BTP yang bersumber dari

vitamin dan mineral akan berfokus pada sumber bahan baku yang berasal dari sayuran dan buah-buahan, susu dan turunannya, telur dan turunannya, produk fermentasi, hati hewan, ekstrak mikroba, dan biji-bijian.

L. Penggunaan BTP pada Jenis Produk

Penggunaan BTP tergantung dari jenis produk pangan yang akan dikembangkan. Misalnya, penggunaan BTP di industri pangan fungsional yang terkait dengan nutrisi berteknologi tinggi. Pengelompokan industri nutrisi berteknologi tinggi dapat dilihat dari kekayaan komposisi bahan, yaitu karbohidrat, protein dan lemak, serta vitamin dan mineral. Dari kelompok karbohidrat, jenis produk yang muncul dari industri nutrisi berteknologi tinggi dapat berupa *nutritious product* seperti *breakfast*, *weight management*, *sport high/low/maintenance energy product*, *snack bar*, beras dan turunannya, gandum dan turunannya, biji-bijian lain dan turunannya. Penggunaan BTP dari kelompok derivatif protein dan lemak, industri nutrisi berteknologi tinggi dapat berupa industri *nutritious product* seperti *high protein content*. Industri *niche* nutrisi berteknologi tinggi dapat berkembang dengan tersedianya BTP khusus, misalnya untuk produk *low LDL*, *less trans lipid*, *less saturated lipid*, *less allergenic product*, *digested protein*, *(partially) hydrolyzed protein*, *peptide based product*. Industri lain misalnya *fermented protein product* seperti *high phytochemical* (fenol, flavonoid, *isoflavone*), dan *fiber*.

Industri berteknologi tinggi dari kelompok yang terakhir yang banyak memanfaatkan BTP adalah kelompok vitamin dan mineral. Contoh produk yang muncul adalah makanan khusus, misalnya suplemen bentuk emulsi, sirup, roti, mentega, atau derivat telur. Industri yang lain misalnya makanan fortifikasi dalam bentuk tepung dan turunannya, garam, dan *cooking oil*.

Contoh Kasus BTP Tidak Aman dalam Pengolahan Pangan

Dalam Islam konsep halal selalu menyatu dengan Thoyib, penggunaan BTP sumbernya jelas halal dan thoyib. Perkembangan teknologi berimplikasi pada banyaknya modernisasi di bidang pangan, mulai dari sumber bahan baku yang digunakan dan teknik dalam memproduksi makanan. Salah satu produk hasil teknologi yang merupakan hasil rekayasa genetik (GMO) dikategorikan dalam salah satu item yang menjadi titik kritis. Produk pangan rekayasa atau rekayasa genetik yang mengandung gen yang berasal dari hewan seperti babi tidak bisa diterima dalam sebuah produk, karena melanggar ajaran islam (Fadzlillah et al. 2011). Kurient (2002) menjelaskan pangan transgenik produk hasil modifikasi tersebut memiliki efek yang tidak thoyyib dan berbahaya bagi kesehatan, sumber enzim dari babi yang dilarang dalam Islam karena alasan kebersihan dan penyakit, tanaman transgenik meragukan karena berasal dari modifikasi gen hewan yang asal usulnya dari hewan yang dilarang.

Perkembangan teknologi memberikan peluang banyaknya produk pangan yang harus ditelusuri halal dan thoyibnya. Bioteknologi merupakan salah satu bidang yang berperan dalam modernisasi produk pangan harus memastikan implementasi keilmuan di bidang pangan tidak berakibat buruk terhadap keamanan produk pangan. Sebagai contoh penggunaan *porcine pepsin* digunakan untuk memperluas pasokan *rennet* anak sapi dalam pembuatan keju, teknologi baru diperkenalkannya kimosin yang diturunkan transgenik, penggunaan pepsin sebagai pengganti *rennet* tergantikan (Chaudhry dan Regenstein 1994).

Kasus lain dilaporkan sebagai akibat penggunaan BTP pada proses produksi pangan. Penggunaan pupuk ZA atau dikenal dengan urea sebagai salah satu substrat pembuatan *nata de coco*. Kejadian Ini menimbulkan kontroversi di kalangan *food technologists* dan masyarakat awam. Namun proses lanjutan berupa pencucian beru-

lang pada pembuatan *nata de coco* sangat memungkinkan substrat tersisa (jika ada) akan terbuang. Komposisi utama pupuk urea amino methanamide ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) dan pupuk ZA adalah ammonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), keduanya dapat digunakan sebagai sumber N, namun yang lebih populer adalah pupuk ZA. Secara komersial, ammonium sulfat tersebut tersedia dalam dua kategori yaitu kategori *food grade* (aman untuk dikonsumsi) berstatus *generally recognized as safe* (GRAS) dalam batasan tertentu dan *non food grade* (bukan untuk konsumsi). Namun yang menjadi permasalahan adalah, ammonium sulfat dalam bentuk pupuk memiliki harga yang lebih murah dan banyak tersedia.

Menurut *Science Company*, bahan kimia yang dapat digolongkan sebagai *food grade* adalah bahan kimia yang telah layak konsumsi sebagaimana ditentukan secara global oleh United States Pharmacopeia (USP) dan National Formulary (USP-NF). Dibawah kategori ini adalah untuk penggunaan laboratorium non makanan dan teknis, seperti pupuk dan industri non-makanan. Standar FCC (*food chemical codex*) merupakan salah satu standar yang digunakan untuk penggunaan bahan baku makanan. FCC untuk *ammonium sulfat* yang boleh digunakan sebagai bahan pangan adalah tidak boleh mengandung logam berat yang terdiri dari arsenik lebih dari 0.5 ppm, besi 15 ppm, dan selenium 5 ppm.

Standar produk *nata de coco* sebenarnya sudah ditetapkan Pemerintah melalui SNI nomor 01-4317-1996, di mana produk akhir tidak diperkenankan mengandung bahan asing. Yang dimaksud bahan asing disini sepertinya lebih ke arah cemaran kasat mata seperti debu, potongan kayu, serangga, dsb. Akan tetapi, *trace element* yang diakibatkan impuritas substrat belum menjadi fokus dari standar produk *nata de coco*.

M. Bahan Makanan yang menggunakan BTP

Beberapa makanan menggunakan BTP untuk tujuan tertentu, contohnya gelatin, enzim koagulasi, pengemulsi, dan penstabil adalah bahan makanan yang biasa digunakan. Gelatin adalah protein serat yang dihasilkan dengan cara menghidrolisis kolagen yang diperoleh dari kulit, tulang, serta tulang rawan hewan (Gumilar *et al.* 2019). Gelatin memiliki kemampuan membentuk gel, kemampuan kapasitas penahan air, dan kemampuan pengemulsi (Haddar *et al.* 2011). Selanjutnya Adalah BTP yang berfungsi sebagai pengemulsi, pengemulsi adalah molekul yang menahan aktivitas permukaan karena sifat amfifilik, di mana daerah hidrofilik dan lipofilik ada dalam struktur molekul yang sama. Pengemulsi digunakan dalam margarin, mayones, saus krim, permen, es krim, makanan olahan dalam kemasan, dan makanan yang dipanggang (Aponso *et al.* 2017). Molekul dalam pengemulsi memiliki satu ujung yang suka berada di lingkungan berminyak dan ujung yang menyukai lingkungan berair. Bahan baku yang paling sering digunakan untuk pengemulsi adalah: minyak sawit, minyak biji bunga matahari, minyak zaitun, lesitin kedelai, telur (Ningtyas *et al.* 2019; Teh dan Mah 2018; Qi *et al.* 2019).

BTP lain yang digunakan dalam makanan berfungsi sebagai stabilizer yang akan menjaga kondisi bahan pangan selalu terjaga secara fisikokimia. Beberapa jenis hidrokoloid digunakan untuk penstabil seperti: agar, gelatin, guar gum, gum arab, pektin, xanthan selulosa dan juga pati-patian (Herawati 2018).

N. Kesimpulan

Bahan pengolahan makanan halal harus berasal dari sumber yang halal dan pengolahannya harus dilakukan sesuai dengan aturan dan ketentuan Islam. Komposisi akhir harus diperiksa jika ada keterlibatan produk beralkohol selama pemrosesan. Dalam komposisi akhir, bahan beralkohol tidak boleh melebihi batas yang diizin-

kan. Bahan kemasan tidak boleh mengandung bahan haram. Kontaminasi silang dengan bahan non-halal harus dihindari. Peralatan harus dicuci bersih dengan deterjen yang diizinkan

Dalam pengolahan pangan, semua peralatan harus dibersihkan setelah produksi bahan non-halal (jika pangan halal dan haram diproses dengan peralatan yang sama). Semua produk halal harus dipisahkan selama penyimpanan untuk menghindari kontaminasi silang.

Pemalsuan sumber babi dalam produksi pangan dilarang dalam Islam. Dalam pandangan Islam, larangan ini mencakup semua bagian dari babi, yaitu daging, kulit, dan turunannya (lemak babi, enzim, dll.) (Sakr 1991). Produk yang mengandung lemak babi harus dinyatakan dengan jelas pada labelnya. Belakangan ini, beberapa teknik bioteknologi telah dikembangkan untuk mendeteksi pemalsuan makanan dan ini akan membantu konsumen Muslim dalam memilih produk makanan halal.

Dari perspektif halal, kepatuhan beberapa bahan dan produk dalam industri makanan dan farmasi masih belum terselesaikan. Tantangan bagi komunitas Islam adalah mendirikan laboratorium makanan di mana bahan-bahan dapat dianalisis dan kemudian hasilnya tersedia untuk komunitas Muslim. Penting untuk memastikan bahwa bahan tambahan makanan berasal dari sumber yang dapat diterima dan diproses sesuai dengan persyaratan halal tanpa menggunakan pembawa berbasis alkohol (Ruževičius 2012).

Bahan pengemas tidak boleh disiapkan, diproses atau diproduksi menggunakan peralatan yang terkontaminasi dengan hal-hal yang tidak diizinkan oleh hukum makanan Islam (Eliasi 2002). Selama persiapan, pengolahan, penyimpanan atau pengangkutan bahan pengemas harus dipisahkan secara fisik dari bahan pengemas yang tidak memenuhi persyaratan halal. Selain itu, bahan pengemas tidak boleh mengandung bahan baku yang dianggap berbahaya bagi kese-

hatan manusia. Proses pengepakan harus dilakukan dengan cara yang bersih dan higienis serta dalam kondisi sanitasi yang baik.

Referensi

- Adawiyah A, Kulsum Y. 2019. Study of critical point analysis on meat-based foods in Bandung. *Indonesian Journal of Halal Research*. 1(2): 40-45. DOI: 10.5575/ijhar.v1i2.5780
- Al-harthy AM, Harib A, Al-Shaabi AJ, Al-Toubi SS, Abukhader MM. 2007. Food additives content in selected snack foods and beverages and public perception of E-Numbers in Muscat, Oman. *Athens Journal of Health*. 4(1): 83-96
- Al-Teinaz YR, Spear S, El-Rahim IHAA. 2020. *The Halal Food Handbook. 1st Edition*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd
- Aponso MMW, DeSilva GO, Abeysundara AT. 2017. Emulsifiers as food additives: An overview on the impact to obesity and gut diseases. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(3): 485-487
- Apriyantono A. 2012. *Titik Kritis Kehalalan Makanan dan Minuman*. Materi Kuliah Universitas Bakrie, Jakarta.
- Atma Y, Taufik M, Seftiono H. 2017. Identifikasi resiko titik kritis kehalalan produk pangan: Studi prouk bioeknologi. 10(1): 60-66
- BPOM. 2003. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 20 Tahun 2003: Bahan Tambahan Pangan
- Broberg M. 2009. European food safety regulation and the developing countries: Regulatory problems and possibilities. *DIIS working paper*. No. 2009:9, ISBN 978-87-7605-325-3
- Cejudo-Bastante MJ, Hurtado N, Mosquera N, Heredia FJ. 2014. Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. *Food Research International*. 64: 465-471. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.036>
- Chaudry MM, Regenstein JM. 1994. Implication of biotechnology and genetic engineering for kosher and halal foods. *Trends Food Science & Technology*. 5: 165.
- Cheeseman MA. 2012. Artificial Food Color Additives and Child Behavior. *Environmental Health Perspectives*. 120(1):a15-a16. doi:10.1289/ehp.1104409

- Codex Alimentarius Commission. 2008. Codex committee on Food Additives. FAO/WHO Food Standards.
- Damant AP. 2011. Food colourants. Handbook of Textile and Industrial Dyeing. 252–305. doi:10.1533/9780857094919. 2.252
- Dankers C. 2003. *Environmental And Social Standards, Certification And Labelling For Cash Crops*. Rome:FAO
- Elasrag H. 2016. *Halal Industry: Key Challenges and Opportunities*. ISBN: ISBN-13: 978-1530029976.
- Eliasi JR. 2002. Kosher and halal: religious observances affecting dietary intakes. *J. Am. Diet. Assoc.* 101 (7): 911–913.
- Fadzlillah NA, Man YBC, Jamaludin MA, et al. 2011. Halal food issues from Islamic and modern science perspectives. 2nd International Conference on Humanities, Historical and Social Sciences. IPEDR vol.17 (2011). IACSIT Press, Singapore. https://www.academia.edu/4089569/Halal_Food_Issues_from_Islamic_and_Modern_Science_Perspectives (accessed September 2019).
- Fathoni, MA dan Syahputri TH. 2020. Potret industry halal Indonesia: Peluang dan Tantangan. *Jurnal Ilmiah Ekonomi Islam*. 6(03): 428-435. doi: <http://dx.doi.org/10.29040/jiei.v6i3.1146>
- Ghany TMA. 2005. Safe food additives: A review. *Journal of Biological And Chemical Research*. 32(1): 402-437.
- Gherezghier BA, Mahmud A, Admassu H, Shui XW, Fang Y, Tsighe N, Mohammed JK. 2017. Food additives: Function, effect, regulations, approval and safety evaluation. *Journal of Academia and Industrial Research*. 6(4):62-68
- Griffiths JC, Borzelleca JF. 2014. Food Additives. *Encyclopedia of Toxicology*, 622–627. doi:10.1016/b978-0-12-386454-3.00-386-9
- Gumilar J, Putranto WS, Wulandari E. 2019. Kualitas gelatin yang diproduksi dari limbah proses shaving kulit domba menggunakan curing HCl dengan konsentrasi dan waktu yang berbeda. *Majalah Kulit, Karet, dan Plastik*, 35(1): 01-06.
- Haddar A, Bougatef A, Balti R, Souissi N, Koched W, Nasri M. 2011. Physicochemical and functional properties of gelatin from tuna (*Thunnus thynnus*) head bones. *Journal of Food and Nutrition Research*. 50(3): 150-159.
- Herawati H. 2018. Potensi hidrokoloid sebagai bahan tambahan pada produk pangan dan nonpangan bermutu. *Jurnal Litbang*

Pertanian. 37(1 Juni 2018): 17-25.

- Kamaruddin R, Iberahim H, Shabudin A. 2012. Halal compliance critical control point (HACCP) analysis of processed food. *Business, Engineering & Industrial Applications Colloquium*. 383-387. DOI: 10.1109/BEIAC.2012.6226088
- Kurient D. 2002. *Malaysia: studying GM foods acceptability of Islam*. Dow Jones, Online News via News Edge Corporation, Kuala Lumpur, Malaysia (9 August 2002).
- Martyn DM, McNulty BA, Nugget AP, Gibney MJ. 2013. Food additives and preschool children. *Proceedings of the Nutrition Society*. 72(1):109-116.
- Nafis MC. 2019. The concept of *halal* and *thayyib* and Its implementation in Indonesia. *Journal of Halal Product and Research*. 2(1):1-5
- Ningtyas KR, Muslihudin M, Afifah DA. 2019. Substitusi minyak sawit merah (MSM) dan minyak biji bunga matahari pada pembuatan mayonnaise kaya betakaroten. *Prosiding seminar nasional pengembangan teknologi pertanian*. Lampung: Politeknik Negeri Lampung.
- Olson CR, Mello CV. 2010. Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Molecular Nutrition & Food Research*. 54(4):489-495.
- Pasca C, Coroian A, Socaci S. 2018. Risk and benefits of food additives- Review. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*. 75(2):72-79. DOI:10.15835/buasvmcn-asb: 2018.0026
- Pongsavee M. 2015. Effect of sodium benzoate preservative on micro-nucleus induction, chromosome break, and Ala40Thr superoxide dismutase gene mutation in lymphocytes, *Biomed Research International*. 2015:1-5.
- Qi J, Wang X, Wang X, Akoh CC, Jin Q. 2019. Effect of Oil Type and Emulsifier on Oil Absorption of Steam-and-fried Instant Noodles. *Journal of Oleo Science*. doi:10.5650/jos.ess18217
- Riaz MN. 1998. Halal food. An insight into a growing food industry segment. *Int. Food Mark. Technol*. 12 (6): 6.
- Ružević J. 2012. Products quality religious-ethnic requirements and certification. *Econo. Manage*. 17 (2): 761-767.
- Sagdic O, Ekici L, Ozturk I, Tekinay T, Polat B, Tastemur B, Senturk B. 2013. Cytotoxic and bioactive properties of different color

tulip flowers and degradation kinetic of tulip flower anthocyanins. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 58: 432–9. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.021>

Sakr AH. 1991. Pork: Possible Reasons for Its Prohibition. Lombard: Foundation for Islamic Knowledge.

The SS, Mah SH. 2018. Stability Evaluations of Different Types of Vegetable Oil-based Emulsions. *Journal of Oleo Science*. 67(11):1381–1387.

Türker, N., & Erdogdu, F. (2006). Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota var. L.*). *Journal of Food Engineering*. 76: 579–583. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.005>

BAB VI

ANALISIS DERIVAT BABI DENGAN *DIFFERENTIAL* SCANNING CALORIMETER

Abdul Rohman^{1*} dan Anjar Windarsih²

¹*Centre of Excellence Institute for Halal Industry & Systems (IHIS),
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281, Indonesia.*

²*Research Division for Natural Product Technology (BPTBA), National
Research and Innovation Agency (BRIN), Yogyakarta, 55861,
Indonesia.*

A. Pendahuluan

Differential scanning calorimetry (DSC) merupakan salah satu analisis dengan mendasarkan pada sifat panas (termal) yang banyak digunakan dalam bidang farmasi dan Makanan. DSC pertama kali dikembangkan pertama kali di tahun 1960-an oleh Watson dan O'Neill (1962) serta dikenalkan secara komersial di pasaran pada acara *the Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy* tahun 1963 [1]. DSC merupakan salah satu teknik analisis termal yang tersedia bagi analis dan menawarkan metode yang cepat dan mudah untuk memperoleh informasi bahan yang bernilai. Selain itu, DSC juga teknik analisis yang ramah terhadap lingkungan karena metode ini tidak memerlukan penggunaan reagen dan pelarut kimia, atau sangat minim sekali menggunakan reagensinya. DSC digunakan dalam berbagai bidang termasuk polimer dan plastik, makanan dan bahan farmasetik, kaca dan keramik, protein dan bahan hayati; dan pada kenyataannya semua bahan, yang memungkinkan seorang analis untuk melakukan pengukuran sifat dasar bahan secara cepat. Metode DSC terlibat dalam studi efek termal komponen-komponen dalam suatu sistem makanan, mengevaluasi

gelatinisasi serta degradasi protein. Lebih lanjut, DSC juga digunakan untuk analisis keaslian lemak dan minyak makan (*edible fats and oils*) termasuk analisis lemak babi untuk analisis autentikasi halal terutama untuk kelas lipid [2] [3].

Analisis termal merupakan teknik yang luas digunakan untuk analisis lemak dan minyak, termasuk lemak babi atau lemak yang diekstraksi dari daging babi. Sebagaimana telah telah didefinisikan oleh *the Nomenclature Committee of the International Confederation for Thermal Analysis* (ICTA), yang selanjutnya dikenal dengan *the International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry* (ICTAC), analisis termal adalah “sekelompok teknik yang mana sifat fisik suatu senyawa diukur sebagai fungsi suhu, dan senyawa dikenai dengan program suhu dikendalikan” [1][4]. DSC banyak digunakan untuk analisis lemak babi dalam kaitannya dengan perbedaannya dengan minyak dan lemak makan yang lain [5].

Prinsip DSC adalah dengan menempatkan sampel dan referensi dalam suatu oven kecil dengan menggunakan suhu yang sama. Daya listrik yang diperlukan setara dengan efek kalorimetriknya [6]. Analisis dengan DSC menawarkan metode langsung untuk mengkaji sifat-sifat termal (panas) berbagai macam bahan. DSC banyak digunakan untuk analisis jenis daging melalui analisis termal lipid-nya [7]. Selain itu, DSC juga sering dikombinasikan dengan berbagai teknik analisis yang lain seperti spektroskopi inframerah dan NMR untuk karakterisasi suatu bahan [8]. DSC mengukur perubahan energi yang terjadi ketika sampel dipanaskan, didinginkan, atau ditahan secara isothermal, bersama-sama dengan suhu terjadinya perubahan. Perubahan energi memungkinkan pengguna untuk menemukan dan mengukur perubahan yang terjadi pada sampel secara kuantitatif, dan untuk mencatat suhu terjadinya, dan juga untuk mengkarakterisasi suatu bahan pada proses pelelehan, pengukuran perpindahan gelas dan kejadian-kejadian lain yang lebih kompleks.

Salah satu keuntungan DSC yang besar adalah mudah digunakan, biasanya dengan sedikit atau tanpa persiapan sampel, mudah dilakukan pergantian sehingga pengukuran dapat dilakukan secara cepat dan lebih mudah.

DSC dapat digunakan untuk mengukur suhu mula (*onset*) transisi sampel, suhu terjadinya reaksi maksimal, serta suhu akhir reaksi. Teknik ini juga bermanfaat untuk memantau perbedaan dan persamaan sampel-sampel yang diuji. Untuk pembicaraan dalam bab ini, DSC digunakan untuk analisis turunan babi baik dalam keadaan tunggal atau dalam campuran. Sifat utama yang diukur dengan DSC adalah aliran panas, suatu aliran energi ke dalam atau keluar sampel sebagai fungsi suhu atau waktu dan biasanya ditunjukkan dalam satuan mW pada sumbu $-y$. Karena mW adalah suatu mJ/detik, maka hal ini secara harfiah merupakan aliran energi dalam satuan waktu. Nilai aliran panas sebenarnya yang terukur, tergantung pada pengaruh referensi (rujukan) dan tidak absolut. Titik awal kurva pada sumbu $-y$ dapat dipilih sebagai satu parameter awal, dan harus diatur nol (0) atau mendekati nol (0) [9].

Ada 2 konvensi yang berbeda yang muncul pada tampilan kurva aliran panas; satu menunjukkan endoterm (*endo*) dalam arah ke bawah, dan yang lain ke arah atas. Karenanya, operator harus memilih perangkat lunak (*software*) mana yang paling sesuai. Secara tradisional, dengan sistem perubahan panas secara terus-menerus (*heat flux*), endoterm ditunjukkan ke arah menurun (bawah) karena transisi endotermis menghasilkan perbedaan suhu yang negatif, sementara dengan sistem kompensasi tenaga (*power compensation*), endoterm ditunjukkan ke atas, karena prinsip transisi endotermis ini menghasilkan peningkatan tenaga yang diberikan pada sampel.

B. Sistem Instrumentasi

Ada 2 jenis instrumen untuk analisis termal yang banyak di-

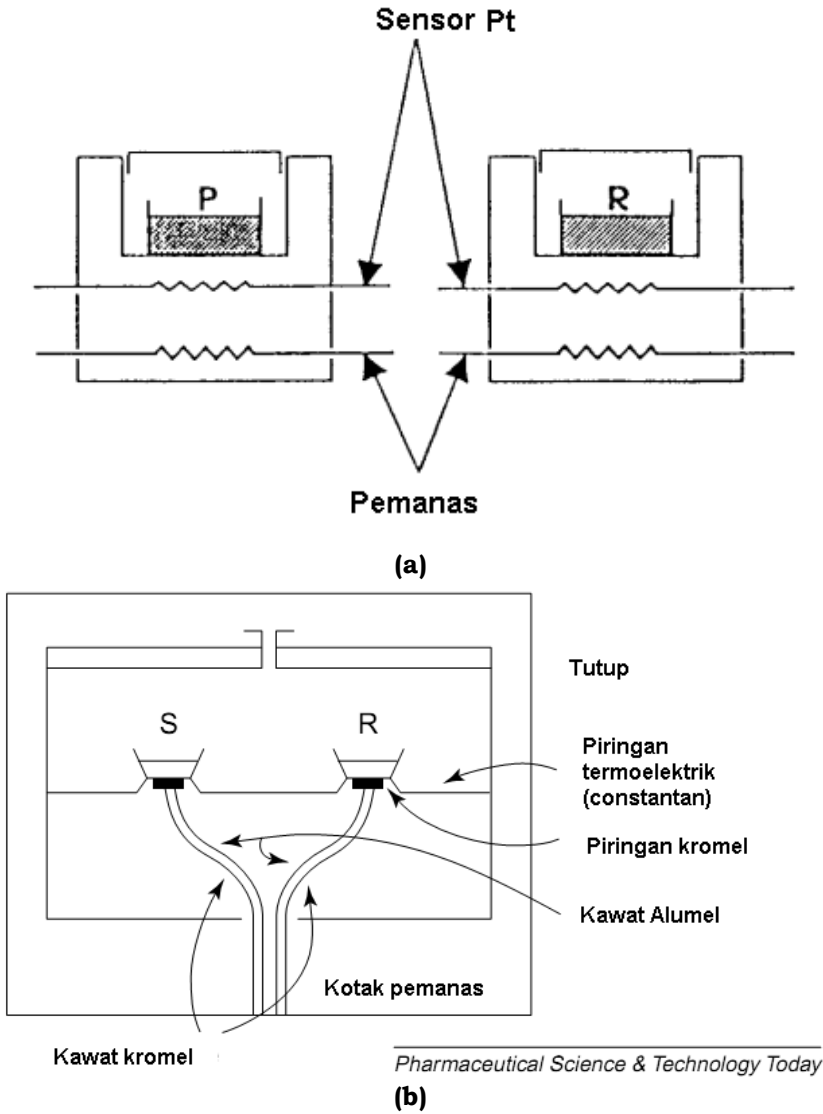
aplikasikan untuk analisis derivat babi, yakni *differential thermal analyzer* (DTA) dan *differential scanning calorimeter* (DSC). Kedua instrumen ini memberikan informasi kuantitatif terkait dengan perubahan eksotermis, endotermis dan kapasitas panas sebagai fungsi suhu dan waktu (seperti suhu peleburan atau *melting*, kemurnian dan suhu transisi gelas). Kedua instrumen ini terdiri atas/dilengkapi dengan 2 konfigurasi panci (untuk sampel dan untuk rujukan). Perbedaan utama DTA dan DSC adalah bahwa DTA mengukur perbedaan suhu antara sampel dan referens, sementara DSC mengukur perbedaan energi di antara keduanya [9].

DTA merupakan suatu teknik analisis yang mana perbedaan suhu (ΔT) antara sampel dan bahan referens *inert* diukur sebagai fungsi suhu. Baik sampel atau bahan referens harus dipanaskan di bawah kondisi-kondisi yang dikendalikan. Jika sampel mengalami perubahan fisika atau reaksi kimia, maka suhunya akan berubah, sementara suhu referens akan tetap sama. Hal ini disebabkan karena perubahan-perubahan fisik dalam suatu bahan seperti perubahan-perubahan fase dan reaksi-reaksi kimia biasanya melibatkan perubahan-perubahan dalam *entalpi*, suatu kandungan panas suatu bahan. Beberapa perubahan menghasilkan panas yang diserap oleh sampel. Jenis perubahan ini disebut dengan *endotermik*. Beberapa perubahan menghasilkan pelepasan panas oleh sampel, dan perubahan seperti ini disebut dengan *eksotermik* [10].

Terdapat dua jenis instrumentasi untuk memperoleh data DSC, yakni DSC yang terkompensasi oleh daya (*power-compensated DSC*) dan DSC fluks panas. *Power-compensated DSC* mempunyai 2 *furnace* individual. Perbedaan suhu antara sampel dan referens di"kompensasi" dengan variasi panas yang diperlukan untuk menjaga kedua panci pada suhu yang sama. Perbedaan suhu ini diplotkan sebagai suatu fungsi suhu sampel (Gambar 6.1 a). DSC fluks panas menggunakan tungku (*furnace*) tunggal. Panas mengalir ke

dalam keduanya (bahan sampel dan referens) melalui suatu disk termoelektrik dan besarnya proporsional dengan perbedaan *output* antara jembatan/junction termokopel (Gambar 6.1.b). Alat DSC komersial dapat beroperasi pada suhu dari -180°C sampai 700°C , sementara itu ada juga suatu instrument DSC yang secara khusus mampu mencapai suhu maksimum 1600°C . DSC harus mampu dipanaskan atau didinginkan dengan cara yang dikendalikan. Untuk menghasilkan suhu dengan batas yang sangat rendah, diperlukan suatu aksesoris pendingin nitrogen cair; untuk penggunaan suhu yang tidak terlalu rendah dapat digunakan pendingin elektrik [11].

DSC termodulasi (*modulated DSC*) merupakan suatu teknik yang serupa dengan DSC konvensional, karena DSC termodulasi juga mengukur perbedaan aliran panas dari bahan sampel dan referens sebagai fungsi suhu dan waktu. DSC termodulasi didasarkan pada desain tungku DSC fluks panas konvensional. Dalam DSC termodulasi, suatu modulasi suhu terkontrol di-*overlay*-kan pada suatu kecepatan pemanasan atau pendinginan linier untuk menghasilkan suhu sampel non-linier yang terus menerus. Hal ini dapat dilihat sebagai *running* dua percobaan dalam sekali waktu. Percobaan pertama meliputi pemanasan sampel pada kecepatan linier konstan untuk memperoleh aliran panas total, kebanyakan sebagaimana dalam DSC konvensional. Selama percobaan kedua, kapasitas panas komponen aliran panas diperoleh dengan menggunakan modulasi suhu osilasi yang terkontrol dengan perubahan suhu bersih nol (0) selama terjadinya modulasi. Pemilihan kecepatan pemanasan rata-rata, periode modulasi, serta suhu amplitudo modulasi merupakan 3 variabel yang dapat dimodifikasi untuk melakukan optimasi parameter-parameter percobaan.



Gambar 6.1. Skema instrumen *power-compensated DSC* (a) dan DSC fluks panas (b). Gambar diambil atas izin [12].

Aliran panas total terdiri atas komponen kapasitas panas dan komponen kinetik. Tidak seperti DSC konvensional, DSC termodulasi menentukan aliran panas total dan komponen kapasitas panas dari suatu aliran panas. Karena kecepatan pemanasan berubah se-

cara terus-menerus selama siklus modulasi, kapasitas panas sampel ditentukan dengan membagi amplitudo aliran panas termodulasi dengan amplitudo kecepatan pemanasan termodulasi. Amplitudo-amplitudo suhu sampel dan modulasi aliran panas terukur dibandingkan dengan suatu gelombang referens dari suatu frekuensi yang sama. Komponen kinetik aliran panas diperoleh dari perbedaan aliran panas total dan komponen kapasitas panas dari suatu aliran panas.

DSC dinamik (*dynamic differential scanning calorimetry*) memberikan informasi kapasitas panas dan komponen kinetika dalam suatu cara yang berbeda dengan DSC termodulasi. Pengguna dapat memilih metode DSC yang sesuai tergantung pada jenis percobaan yang dilakukan.

Kapasitas panas kompleks dapat dihitung dari komponen dinamik respons sampel. Kapasitas panas kompleks (C_p^*) merupakan jumlah vektor kapasitas panas penyimpanan (C_p') dan kapasitas panas yang berkurang/hilang (C_p''). Pada umumnya, kapasitas panas kompleks sama dengan kapasitas panas penyimpanan, kecuali di daerah peleburan (*melting*), yang mana kehilangan panas mendominasi. Kapasitas panas penyimpanan dihubungkan dengan gerakan-gerakan molekuler dalam sampel dengan suatu cara yang sama dengan modulus penyimpanan dalam pengukuran mekanika dinamik. Keluarnya komponen fase (*out-of phase component*), kapasitas panas yang hilang (C_p'') dihubungkan dengan sifat-sifat penghamburan (disipatif) bahan. Kapasitas panas yang hilang merupakan keluar fase (*out-of-phase*) dengan perubahan suhu, karena aliran panas telah menghasilkan perubahan struktur dalam suatu bahan. Tangen kekurangan (*loss tangent*) merupakan perbandingan kapasitas panas yang hilang dengan kapasitas panas penyimpanan, dan merupakan ukuran pentingnya relatif tiap komponen [13].

C. Kalibrasi Instrumen DSC

Reliabilitas hasil-hasil DSC tergantung pada kehati-hatian dalam melakukan kalibrasi instrument sedekat mungkin dengan suhu transisi yang diinginkan. Luas puncak DSC harus dikalibrasi untuk pengukuran-pengukuran entalpi. Akurasi hasil-hasil-hasil analisis sangat tergantung pada penggunaan standar kalibrator berkualitas tinggi dan sensor-sensor DSC yang bersih. Penggunaan standar dan kalibrator yang terdefinisi dengan baik sangat penting ketika membandingkan hasil-hasil analisis yang dilakukan dengan instrument yang berbeda atau pada waktu yang berbeda.

Bahan-bahan dari NIST dengan kemurnian yang tinggi yang digunakan untuk kalibrasi DTA dapat juga digunakan untuk kalibrasi DSC. Sebagai contoh, NIST SRM 2232 adalah 1 keping 1 g logam indium dengan kemurnian tinggi untuk kalibrasi instrument DSC dan DTA. SRM indium disertifikasi mempunyai suhu peleburan (fusion) setara dengan $156,5985\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,00034\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan entalpi peleburan yang tersertifikasi sebesar $28,51 \pm 0,19\text{ J/g}$. NIST menawarkan kisaran standar yang serupa. Bahan-bahan ini dan nilai-nilai sertifikatnya dapat ditemukan di website NIST di alamat www.nist.gov. Organisasi-organisasi pemerintahan yang lain di Negara-negara lain juga menawarkan bahan-bahan yang serupa. Pishchur dan Drebuschak (2015) membuat berbagai rekomendasi terkait dengan kalibrasi DSC [14].

D. Penyiapan Sampel

Suksesnya percobaan DSC tergantung pada kehati-hatian penyiapan sampel dan ketelitian pemilihan kondisi percobaan yang sesuai (seperti kecepatan *scanning* dan ukuran sampel). Secara umum, sampel DSC dianalisis dalam jumlah kecil dalam panci logam yang dirancang supaya memberikan konduktivitas termal maksimal dan bereaksi seminimal mungkin dengan sampel (misalnya *alloy*

aluminium, platinum, tembaga tahan karat dan perak) yang biasanya diberikan oleh pemasok instrumen. Panci dapat terbuka, *pin-hole*, tertutup (Gambar 6.2) dan digunakan dalam kombinasi dengan suatu panci rujukan dengan konfigurasi sama, yang diisi dengan bahan *inert* seperti alumina atau udara. Untuk analisis kuantitatif yang akurat, maka massa termal panci sampel dan referensi harus berseesuaian. Panci tertutup digunakan ketika diperlukan pencegahan perlepasan sampel atau produk reaksi sampel yang diinduksi oleh panas. Sampel yang diambil untuk analisis DSC biasanya 1 – 10 mg.



Gambar 6.2. Berbagai jenis panci DSC (Sumber: Clas dkk. [15]). Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Elsevier.

Ukuran sampel DSC untuk analisis derivat babi dalam sediaa farmasetik adalah 3-5 mg, dan hasil yang baik seringkali diperoleh dengan sampel kurang dari 1 mg. Sampel-sampel dalam jumlah yang kecil dipilih dalam kebanyakan kasus karena lebih hemat bahan. Kebanyakan sampel serbuk atau padatan harus sedikit ditekan ke dalam bagian bawah panci untuk memastikan kontak termal yang baik. Hal ini sangat penting terutama untuk bahan-bahan berkera-patan rendah seperti sampel yang bersifat liofil. Ukuran partikel serbuk dan parameter-parameter bentuk partikel dapat secara nyata berpengaruh pada kemasan sampel, dan karenanya mungkin perlu untuk sedikit menggerus sampel untuk memperoleh hasil-hasil yang reproduсібel. Sampel-sampel untuk analisis DSC harus ditimbang secara akurat pada tiap awal dan akhir percobaan [16].

E. Analisis Derivat Babi dengan DSC

Banyak publikasi ilmiah yang melaporkan penggunaan DSC untuk analisis derivat babi dalam berbagai produk. Tabel 6.1. meringkas penggunaan DSC untuk analisis derivat babi bersama-sama dengan isu yang menyertainya. Lemak babi secara kimiawi adalah triasilgliserol (suatu ester gliserol dengan 3 asam lemak). Tingkat kristalisasi lemak babi berkorelasi dengan kandungan triasilgliserol dalam hal kandungan asam lemak baik asam lemak jenuh, tidak jenuh tunggal (monounsaturated), tidak jenuh ganda (disaturated) atau asam lemak tidak jenuh dengan 3 ikatan rangkap (trisaturated). Sifat termal lemak dapat digunakan untuk karekterisasi jenis lemak atau TAG yang menyusun minyak atau lemak tertentu, sehingga DSC diaplikasikan secara luas untuk analisis lemak babi [17].

Tabel 6.1. Penggunaan *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) untuk analisis derivat babi dalam berbagai produk.

Derivat babi	Isu	Karakteristik	Referensi
Daging babi	Pemalsuan daging babi dalam daging lainnya	-	[18]
Lemak babi	Karakterisasi lemak babi dan perbedaan dengan lemak sapi, lemak kambing dan lemak ayam	Lemak babi menunjukkan profil DSC dengan puncak-puncak eksotermik yang tajam di suhu 4,9°C dan 16,9°C.	[19]
Lemak babi	Karakterisasi lemak babi asal dan lemak babi terandomisasi.	-	[18]
Lemak babi	Analisis lemak babi dalam coklat	Termogram DSC pemanasan menunjukkan bahwa pada peningkatan konsentrasi lemak babi dari 3% ke 30% menghasilkan dua puncak minor di -26°C dan 34,5 °C	[20]

Lemak babi	Lemak babi dalam campuran kacang tanah, tempe, ayam, dan sapi	-	[21]
Asilgliserol lemak babi	Karakterisasi asilgliserol lemak babi	-	[18]
Lemak babi	Analisis lemak babi (lard), dalam bentuk lard stearin dan lard olein	-	[22]
Lemak babi	Nugget ayam yang digoreng dengan palm olein yang dicampur dengan lemak babi	-	[23]
Lemak babi	Pemalsuan lemak babi dalam minyak bunga matahari	Kalibrasi dengan SMLR	[24]
Lemak babi	Pembedaan profil termal lemak babi dengan minyak nabati	-	[24]
Lemak babi	Pemalsuan VCO dengan lemak babi	Kalibrasi dengan SMLR	[25]
Diasilgliserol lemak babi	Karakterisasi termal diasilgliserol dari lemak babi dengan lemak babi	-	[26]
Lard <i>stearin</i>	Keberadaan lard stearin dalam minyak <i>canola</i>	Kalibrasi dengan SMLR	[22]
Lemak babi	Pemalsuan butter dengan lemak babi	Kalibrasi dengan SMLR	[27]

SMLR = *stepwise multiple linear regression*

Lemak babi mempunyai sifat fisika yang hampir mirip dengan minyak kelapa dara (*virgin coconut oil*, VCO), yakni sama-sama berwarna putih kekuningan dan memadat pada suhu ruangan; karenanya, lemak babi merupakan bahan pemalsu yang potensial pada VCO. Berdasarkan hal ini, maka peneliti berusaha menggunakan berbagai teknik analisis untuk mendeteksi dan mengkuan-

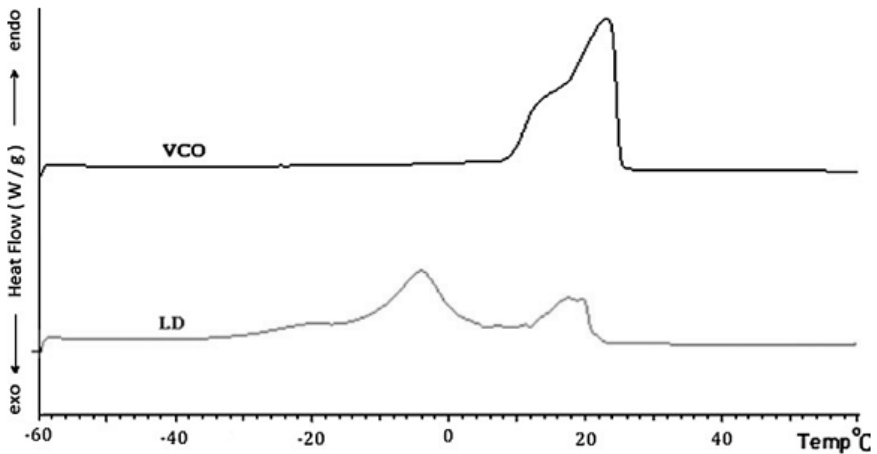
tifikasi lemak babi dalam VCO. Mansor dkk. [28] menggunakan DSC untuk analisis lemak babi dalam VCO. Selain dengan DSC, sekelompok peneliti ini juga menggunakan kromatografi gas untuk melihat profil perubahan asam lemak, penentuan bilangan penyabunan campuran lemak babi dalam VCO secara titrimetri serta penentuan komposisi triasilgliserol dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi.

Untuk analisis termal dengan DSC, sebanyak 9 mg sampel (VCO, lemak babi atau campuran VCO-lemak babi) ditimbang dalam suatu panci aluminium lalu ditutup dan diletakkan dalam tempatnya. Instrumen DSC dikalibrasi dengan indium dan *n*-dodekana. Sebagai referens digunakan panci aluminium kosong yang sama dengan yang digunakan dalam sampel. Sampel dikenai suhu pemrograman sebagai berikut: 60 °C secara isothermal selama 5 menit, didinginkan sampai -5 °C (dengan kecepatan 5 °C/menit) lalu ditahan selama 5 menit. Sampel selanjutnya dipanaskan kembali dari -60 °C sampai 60 °C pada kecepatan 5 °C/menit. Karakteristik termal yang digunakan pada penelitian ini adalah suhu-suhu transisi peleburan (*melting*) dan pendinginan (*cooling*), yang diukur dari kurva DSC, sebagai suhu puncak maksimal, suhu-suhu *onset* (T_o), dan *endset* (T_e) (diukur sebagai titik yang mana ujung kurva mula-mula atau ujung kurva akhir memotong *baseline*), serta kisaran suhu untuk fase pendinginan dan peleburan (Tr), yang ditentukan dari perbedaan antara suhu *onset* dan suhu *endset*.

Meskipun VCO dan lemak babi mempunyai sifat fisika yang sama, akan tetapi lemak babi dan VCO mempunyai jumlah asam lemak dan triasilgliserol (TAG) jenuh dan tidak jenuh yang berbeda. Rasio asam lemak jenuh dengan asam lemak tidak jenuh pada VCO adalah 15,26, sementara pada lemak babi adalah 0,67. Semakin jenuh komponen triasilgliserol, maka semakin tinggi suhu lebur; dan sebaliknya, semakin rendah komponen tidak jenuh TAG, maka suhu

leburnya semakin rendah.

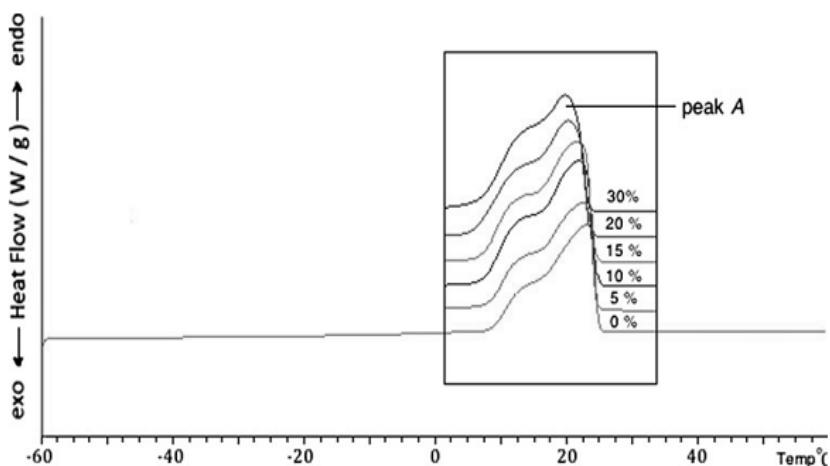
Minyak/lemak yang mengandung asam lemak dan TAG jenuh yang banyak akan mempunyai titik lebur yang lebih tinggi yang mana terbukti dari hasil penelitian Mansor dkk. [28] yang mana titik lebur VCO adalah sebesar 23,16 °C dan VCO menunjukkan 2 puncak endotermik yang tumpang suh. Terdapat suatu puncak bahu (*shoulder*) dengan ukuran yang lebih kecil yang menempel/terikat dalam puncak endotermik yang disebabkan oleh perbedaan kandungan asam lemak dan TAG jenuh dengan asam lemak dan TAG tidak jenuh dalam VCO. Puncak bahu yang kecil ini bersesuaian dengan fraksi lebur asam lemak dan TAG dengan titik lebur yang lebih tinggi. Sebaliknya, lemak babi mengandung asam lemak dan TAG tidak jenuh yang lebih banyak dibandingkan VCO; dengan demikian, adanya asam lemak dan TAG tidak jenuh ini berkontribusi terhadap pengembangan titik lebur yang lebih rendah, sebagaimana terlihat pada munculnya 2 puncak endotermik utama pada -3,93 dan 18,83 °C (Gambar 6.3.).



Gambar 6.3. Termogram pemanasan DSC virgin coconut oil (VCO) murni dan lemak babi (LD) murni [28]. Gambar diambil atas izin dari Springer.

Dalam lemak babi, puncak utama pertama di $-3,93\text{ }^{\circ}\text{C}$ terutama disebabkan oleh asam lemak dan TAG tidak jenuh (rasio-rasio tidak jenuh: jenuh adalah 61,41: 20,43 untuk TAG dan sebesar 59,69: 40,31 untuk asam lemak), dan puncak kedua terutama disebabkan oleh asam lemak dan TAG tidak jenuh. Disebabkan oleh lebih tingginya rasio asam lemak dan TAG tidak jenuh, puncak utama yang pertama nampak lebih tinggi dibandingkan dengan puncak endotermis kedua.

Karena lemak babi ditambahkan secara berturut-turut ke dalam VCO mulai dari 0 % sampai 30 %, maka termogram peleburan menunjukkan satu puncak endotermik dengan bahu yang lebih kecil yang terikat dalam puncak utama. Puncak ini untuk selanjutnya disebut dengan puncak A, sebagaimana dalam Gambar 6.4. sebagaimana dijelaskan oleh peneliti-peneliti sebelumnya seperti oleh Tan dkk. (2000), adanya puncak bahu yang tidak terpisah disebabkan oleh kompleksnya sifat TAG yang dapat meleleh pada kisaran suhu yang sama, dan adanya puncak bahu yang lebih kecil disebabkan oleh jenis TAG yang berbeda.

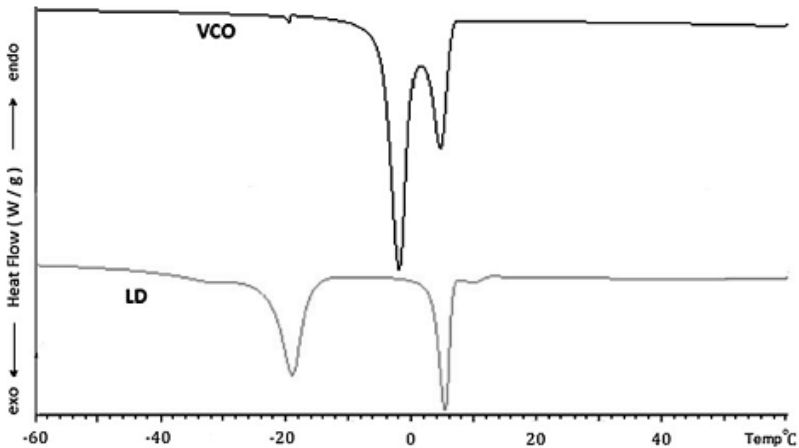


Gambar 6.4. Termogram pemanasan DSC *virgin coconut oil* (VCO) murni dan VCO yang dipalsukan dengan lemak babi [28].

DSC mampu melakukan analisis kualitatif untuk mendeteksi adanya pemalsuan lemak babi dalam konsentrasi 1 – 30 % ke dalam VCO. Puncak suhu (T) maksimal puncak A terbentuk secara perlahan-lahan pada suhu rendah seiring dengan meningkatnya konsentrasi lemak babi (Gambar 6.5).

Termogram pendinginan

Termogram pendinginan DSC VCO dan lemak babi murni ditunjukkan oleh Gambar 6.5. terdapat satu puncak eksotermik minor pada $-18,95\text{ }^{\circ}\text{C}$ diikuti dengan 2 puncak eksotermik mayor yang dapat diamati di $3,95\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan $-2,14\text{ }^{\circ}\text{C}$ (untuk VCO). Adanya dua puncak eksotermik VCO ini terkait dengan kristalisasi TAG. Adanya puncak eksotermik yang kecil terkait dengan TAG tidak jenuh, terutama palmitilpalmitiloleat (PPO).



Gambar 6.5. Termogram DSC pendinginan VCO murni dan lemak babi murni [28].

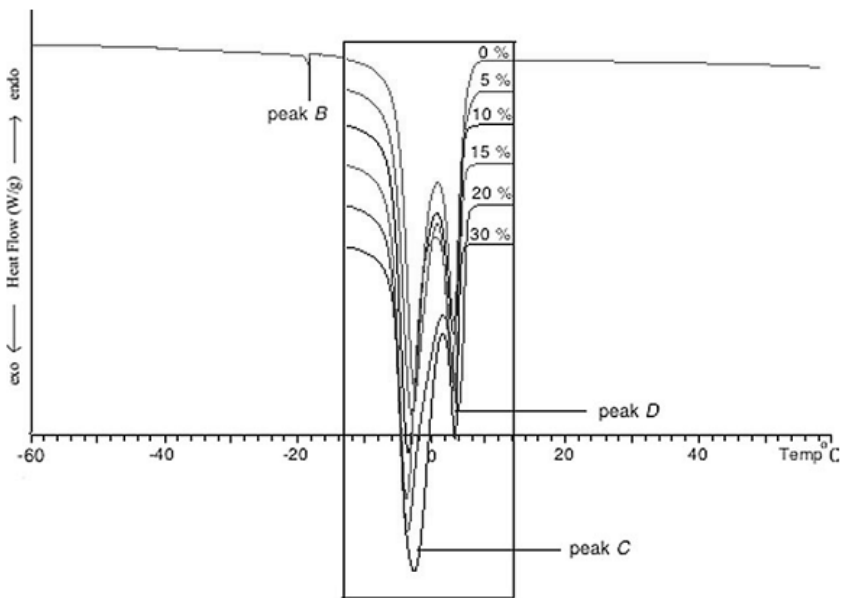
Sementara itu, lemak babi mempunyai 2 puncak eksotermik mayor yang teramati di $8,84$ dan $-16,13\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kedua puncak ini lebih terpisah secara sempurna dibandingkan kedua puncak dalam VCO, dan lemak babi mempunyai fase transisi pada kisaran suhu yang

lebih luas. Hal ini terkait dengan profil kristalisasi tiap gugus asam lemak dan TAG yang berbeda. Asam lemak dan TAG jenuh akan mengalami kristalisasi pada suhu yang lebih tinggi, sementara asam lemak dan TAG tidak jenuh akan mengalami kristalisasi pada suhu yang lebih rendah.

Adanya puncak eksotermis kecil pada VCO di $-18,95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (puncak B) terdapat dalam semua VCO yang terpalsukan. Puncak maksimum puncak B terletak di sekitar $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ karena penambahan 1 – 5 % lemak babi, lalu menurun ketika persentase pemalsuan lemak babi dinaikkan sampai 20 %. Meskipun demikian, pada pemalsuan lemak babi sebesar 30 %, suhu maksimal puncak B meningkat kembali ke $-15,41\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hal ini dapat dijelaskan dengan adanya kemungkinan beberapa TAG tidak jenuh bergabung dengan TAG jenuh untuk membentuk puncak eksotermik mayor lainnya pada suhu kristalisasi yang lebih tinggi, yang menunjukkan mengapa puncak pemalsu C mempunyai kisaran suhu kristalisasi yang lebih luas (Gambar 3.6). Gambar ini juga menunjukkan adanya puncak eksotermik C yang dapat teramati sebagai puncak yang meningkat ketika persentase bahan pemalsu (lemak babi) ditingkatkan, sementara puncak D akan mengalami penurunan ukuran ketika persentase lemak babi ditingkatkan. Ketika lemak babi ditambahkan ke VCO, dua puncak yang tumpang suh dalam VCO (masing-masing ditandai sebagai puncak C dan D) masih dapat diamati dengan perubahan morfologis yang kecil dalam kurva termal, ketika lemak babi ditingkatkan dari 1 – 30 %.

Marikkar dkk. (2012) [29] telah menggunakan termogram pemanasan DSC untuk mendeteksi adanya lemak babi, lemak sapi dan lemak ayam sebagai kontaminan dalam minyak bunga matahari (*sunflower oil*). Minyak bunga matahari yang di-*spiking* secara terpisah dengan lemak babi, lemak sapi dan lemak ayam pada level 1 – 20 % (b/b) dianalisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi untuk

melihat profil triasilgliserol, dan dengan DSC untuk memperoleh profil pemanasan. Untuk analisis DSC, digunakan instrumen DSC dari Perkin Elmer. Sebagai gas *purge* adalah nitrogen dengan kemurnian 99,999 % dengan kecepatan 20 mL/menit. Sejumlah 6 – 8 mg sampel yang telah dilelehkan diletakkan dalam panci aluminium standar DSC dan selanjutnya ditutup secara rapat. Panci aluminium yang kosong dan yang ditutup digunakan sebagai rujukan (referens). Pengukuran-pengukuran pemanasan DSC dilakukan pada tiap sampel sebagai berikut: isothermal pada -100 °C selama 2 menit, dipanaskan dari -100 sampai 50 °C pada kecepatan 5 °C/menit. Sebelum dilakukan tiap pengukuran, instrumen dikalibrasi dengan standar sampel indium.

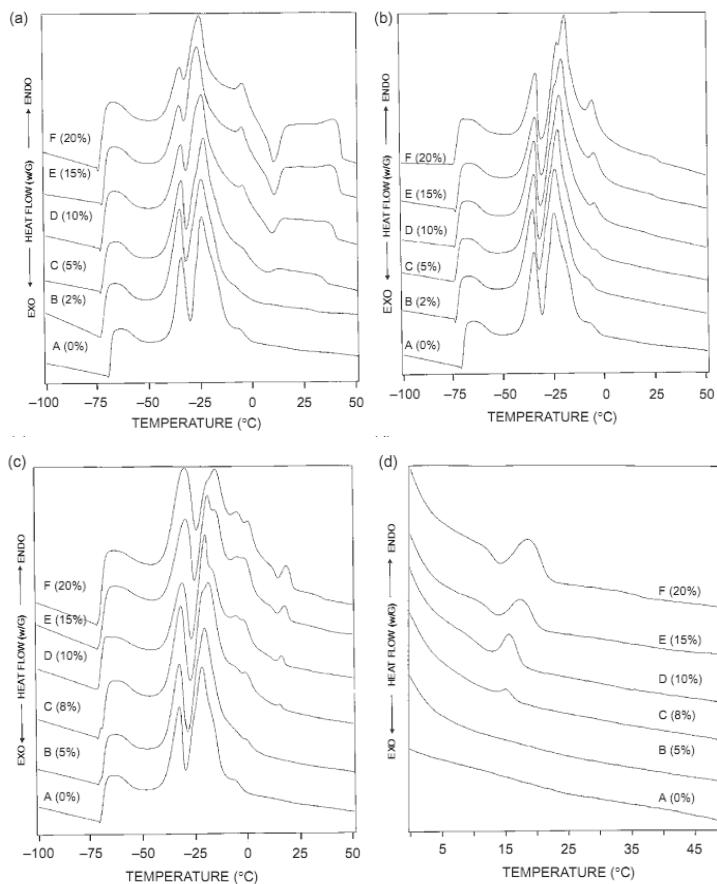


Gambar 6.6. Termogram pendinginan DSC VCO yang dipalsukan dengan lemak babi (v/v) [28].

Hasil penelitian menunjukkan bahwa di bawah kontaminasi pada level 20 % b/b, baik lemak babi dan lemak sapi dalam minyak bunga matahari dapat dideteksi dengan menggunakan puncak yang

bersifat karakteristik untuk kontaminan yang muncul di daerah suhu yang lebih tinggi (0 – 50 °C) pada kurva DSC. Profil peleburan DSC minyak bunga matahari dan sampel-sampel bunga matahari yang terkontaminasi dengan lemak sapi, lemak ayam dan lemak babi ditunjukkan dalam Gambar 6.7.(a) – 6.7(c). Kurva A dalam Gambar 6.7.(a) yang menggambarkan sampel yang tidak terkontaminasi menunjukkan transisi endotermik yang nyata di -39,0 dan -25,1 °C. Transisi di -25,1 °C dikaitkan dengan puncak bahu (*shoulder*) yang lebih kecil yang muncul di -8 °C. Nampak jelas bahwa daerah suhu -5,5 sampai 50 °C kurva pemanasan A ditemukan tanpa adanya transisi pemanasan yang signifikan. Kurva B sampai F merupakan kurva DSC minyak bunga matahari yang terkontaminasi dengan lemak hewani pada berbagai level yang berbeda (konsentrasi kontaminan dalam kurung).

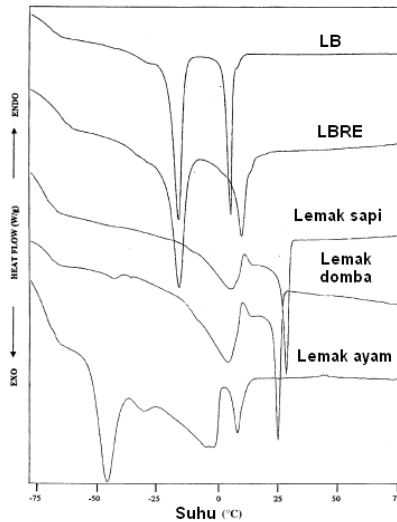
Rashood dkk. [30] melakukan karakterisasi termal lemak babi (LB) asal dan LB terandomisasi. Transisi termal LB terjadi pada 3 tahap dengan puncak maksimal di -0,35; 30,25; dan 44,28 °C, sementara itu transisi termal LB yang dirandomisasi terjadi dengan 5 tahap dengan puncak maksimal di -51,26; -1,44; 4,3; 19,04; dan 27,8°C. Termogram DSC dan termodinamika fase transisi kedua sampel (LB dan LB randomisasi) cukup berbeda dan tidak menampilkan karakteristik umum yang dapat digunakan untuk deteksi segera adanya LB dalam campuran lemak. Lambelet dan Ganguli [31] telah mengembangkan DSC untuk mendeteksi adanya daging babi dalam daging lainnya. Pemalsuan daging babi dapat dideteksi dengan adanya puncak tambahan pada kurva kristalisasi DSC di suhu tinggi. Luas relatif puncak ini pada kurva DSC mengukur tingkat pemalsuan daging babi.



Gambar 6.7. Kurva pemanasan DSC (a) minyak bunga matahari yang terkontaminasi dengan berbagai level lemak sapi, (b) minyak bunga matahari yang terkontaminasi dengan berbagai level minyak ayam, (c) minyak bunga matahari yang terkontaminasi dengan berbagai level minyak babi, dan (d) puncak lemak babi yang diperbesar pada berbagai level konsentrasi lemak babi sebagai kontaminan (Sumber: Marikkar dkk., 2012) [29]. Gambar diambil atas kebaikan dan izin dari Taylor and Francis.

DSC juga telah digunakan untuk mendeteksi adanya LB asal dan LB yang telah dirandomisasi dalam minyak sawit yang telah dimurnikan. Profil DSC LB asal dan LB terandomisasi dibandingkan dengan profil DSC lemak hewani lainnya (lemak ayam, lemak domba, dan lemak sapi). Hasilnya menunjukkan bahwa profil pendinginan

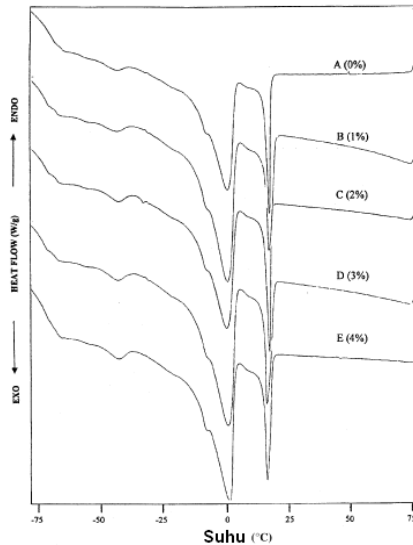
DSC minyak sawit yang dicampur dengan LB (asal dan terandomisasi) mempunyai puncak tambahan yang bersesuaian dengan puncak LB pada daerah suhu rendah (Gambar 3.8). Puncak ini digunakan sebagai petunjuk adanya LB dalam minyak sawit. Batas deteksi LB yang dilaporkan adalah 1 % [32].



Gambar 6.8. Thermogram pendinginan DSC lemak babi (LB), lemak babi yang dirandomisasi enzimatik (LBRE), serta lemak hewani yang lain (Sumber: Marikkar dkk. [32]).

Lebih lanjut, Marikkar dkk. [33] juga menentukan adanya LB yang dirandomisasi secara enzimatik (LBRE) sebagai pemalsu dalam minyak sawit olein. Karakteristik termal LBRE dibandingkan dengan LB asal. Suatu termogram pendinginan minyak sawit olein yang tidak dipalsukan menunjukkan 2 puncak transisi eksotermik, masing-masing di 17,75 dan 1,25 °C serta 2 puncak bau (*shoulder*) minor di -6,82 dan -43,86 °C. Puncak bau yang muncul di -43,86 °C bersifat peka terhadap penambahan LB atau LBRE. Puncak ini mengalami pelebaran dengan meningkatnya konsentrasi LBRE di kisaran konsentrasi 1 – 20 %. Kelompok peneliti ini juga menggunakan

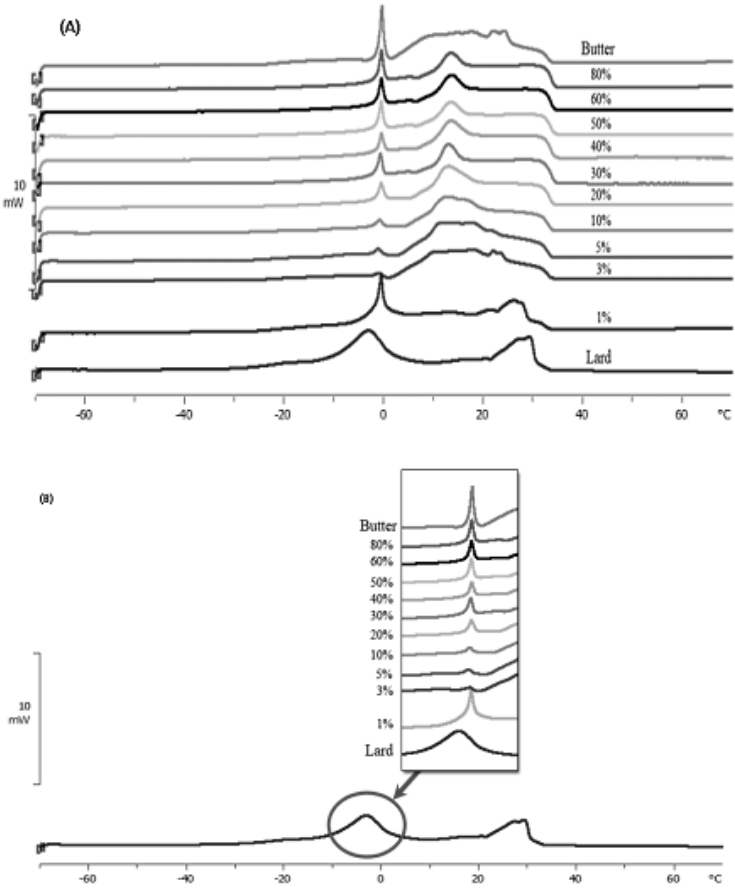
termogram pemanasan dan pendinginan DSC untuk memantau adanya pemalsuan LB dalam minyak canola. Termogram pendinginan kurang sesuai untuk deteksi LB, sementara termogram pemanasan memungkinkan untuk dideteksinya LB dengan level 8 % (v/v). Profil DSC yang dihasilkan sebagaimana dalam Gambar 6.9.



Gambar 6.9. Termogram pendinginan DSC dari (A) RBD-minyak sawit dan minyak sawit yang telah dipalsukan dengan 1 % lemak babi (B), 2 % (C), 3 % (D), dan dengan 4 % lemak babi (E) (Sumber: Marikkar dkk. [33]).

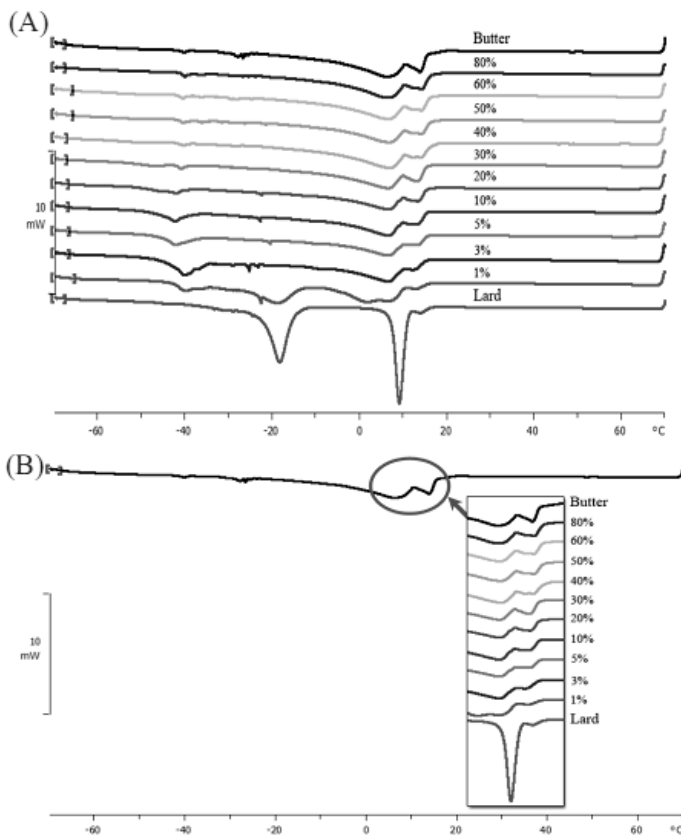
Sebagai salah satu media pengeringan (penggorengan), adanya LB dalam 4 produk yang mengandung lemak yakni kacang tanah, tempe, ayam, dan sapi telah dianalisis dengan DSC [34]. Berdasarkan pada termogram pemanasan DSC, adanya kontaminasi LB dalam tempe dan ayam menampakkan puncak endotermik di kisaran 22 – 23 °C. Adanya puncak dapat dengan mudah dilihat dengan teknik pengurangan termogram. Studi ini juga menyarankan untuk menggunakan termogram pendinginan dalam penentuan LB dalam daging sapi, karena puncak LB cenderung untuk menyatu di suhu yang rendah, sebagaimana ditunjukkan oleh Gambar 3.10.

Baru-baru ini, DSC telah digunakan untuk analisis pemalsuan lemak babi dalam butter, didasarkan bahwa lemak babi mempunyai karakteristik yang hampir sama dengan butter [27]. DSC mempunyai profil termal yang unik untuk lemak babi dan butter. Dalam profil heating, terdapat satu puncak utama endotermik (puncak A) dengan bahu yang lebih kecil yang menempel dalam puncak utama yang selanjutnya menurun secara perlahan-lahan seiring dengan meningkatnya konsentrasi lemak babi.



Gambar 3.10. Kurva pelelehan (melting) lemak babi (lard), butter dan butter yang dipalsukan dengan lemak babi dengan konsentrasi 1-80% (A), serta profil pelelehan yang diperbesar di sekitar 0°C (Sumber: Nurrulhidayah dkk. [27]). Diambil dengan izin dari UPM Press.

Komposisi dan profil termal lipid-lipid endogen dari 10 komersial nugget ayam dibandingkan profil-profil DSC-nya dengan lipid yang diekstraksi dari nugget ayam yang digoreng dengan lemak babi dan palm olein untuk menentukan jenis minyak atau lemak yang digunakan untuk menggoreng produk. Hasil studi, berdasarkan analisis termal, menunjukkan bahwa produk-produk komersial ada yang serupa dengan palm olein, dan tidak ada satu pun produk yang menyerupai dengan profil lipid yang diekstraksi dari nugget ayam yang digoreng dengan lemak babi (Marikkar dkk., 2011)



Gambar 3.11. Kurva pendinginan (*cooling*) lemak babi (*lard*), butter dan butter yang dipalsukan dengan lemak babi dengan konsentrasi 1-80% (A), serta profil pelelehan yang diperbesar di sekitar 0°C (B), yang dikenal dengan puncak B (Sumber: [27]). Diambil dengan izin dari UPM Press.

Sementara itu, dalam profil pendinginan (cooling), terdapat satu puncak minor (puncak B) dan 2 puncak-puncak eksotermis, puncak C yang meningkat seiring dengan meningkatnya persentase lemak babi, serta puncak D yang menurun dengan meningkatnya konsentrasi lemak babi (Gambar 3.11). Untuk melakukan kuantifikasi dilakukan dengan model kalibrasi SMLR (*stepwise multiple linear regression*). Dua variabel independen yakni endset puncak A dan kisaran transisi termal puncak D ditemukan mampu memprediksi persentase lemak babi dalam butter dengan nilai koefisien determinasi sebesar 0,9582.

Referensi

- [1] T. Nur Azira and I. Amin, *Advances in differential scanning calorimetry for food authenticity testing*, no. 1983. Elsevier Ltd, 2016.
- [2] C. G. Biliaderis, "Differential scanning calorimetry in food research-A review," *Food Chem.*, vol. 10, no. 4, pp. 239–265, 1983, doi: 10.1016/0308-8146(83)90081-X.
- [3] M. Islam, L. Belkowska, P. Konieczny, E. Fornal, and J. Tomaszewska-Gras, "Differential scanning calorimetry for authentication of edible fats and oils: What can we learn from the past to face the current challenges?," *J. Food Drug Anal.*, vol. 30, no. 2, pp. 185–201, 2022, doi: 10.38212/2224-6614.3402.
- [4] C.-P. TAN and Y. B. CHE MAN, *Analysis of edible oils by differential scanning calorimetry*, no. 1983. Woodhead Publishing Limited, 2012.
- [5] M. Mortas, N. Awad, and H. Ayvaz, "Adulteration detection technologies used for halal/kosher food products: an overview," *Discov. Food*, vol. 2, no. 1, 2022, doi: 10.1007/s44187-022-00015-7.
- [6] T. S. T. Mansor, Y. B. C. Man, and M. Shuhaimi, "Employment of differential scanning calorimetry in detecting lard adulteration in virgin coconut oil," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 89, no. 3, pp. 485–496, 2012, doi: 10.1007/s11746-011-1936-3.
- [7] G. Secci, G. Ferraro, E. Fratini, F. Bovera, and G. Parisi, "Differential scanning calorimetry as a fast method to

- discriminate cage or free-range rabbit meat,” *Food Control*, vol. 104, no. May, pp. 313–317, 2019, doi: 10.1016/j.foodcont.2019.05.010.
- [8] H. C. Bertram, Z. Wu, F. van den Berg, and H. J. Andersen, “NMR relaxometry and differential scanning calorimetry during meat cooking,” *Meat Sci.*, vol. 74, no. 4, pp. 684–689, 2006, doi: 10.1016/j.meatsci.2006.05.020.
- [9] J. S. Farah, M. C. Silva, A. G. Cruz, and V. Calado, “Differential calorimetry scanning: current background and application in authenticity of dairy products,” *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 22, pp. 88–94, 2018, doi: 10.1016/j.cofs.2018.02.006.
- [10] W. J. Boettinger, U. R. Kattner, K.-W. Moon, and J. H. Perepezko, *Dta and Heat-Flux Dsc Measurements of Alloy Melting and Freezing*. 2007.
- [11] S. Tanaka, “Theory of power-compensated DSC,” *Thermochim. Acta*, vol. 210, no. C, pp. 67–76, 1992, doi: 10.1016/0040-6031(92)80277-4.
- [12] D. S. Calorimeters, I. Vocabulary, and G. Terms, “2 Types of Differential Scanning Calorimeters,” 2003.
- [13] N. Mehta, *Characterization techniques for the study of thermally activated phase transitions and determination of thermophysical/kinetic properties*. Elsevier Inc., 2020.
- [14] D. P. Pishchur and V. A. Drebuschak, “Recommendations on DSC calibration: How to escape the transformation of a random error into the systematic error,” *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 124, no. 2, pp. 951–958, 2016, doi: 10.1007/s10973-015-5186-8.
- [15] S. D. Clas, C. R. Dalton, and B. C. Hancock, “Differential scanning calorimetry: Applications in drug development,” *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 2, no. 8, pp. 311–320, 1999, doi: 10.1016/S1461-5347(99)00181-9.
- [16] Y. Birol, “The effect of sample preparation on the DSC analysis of 6061 alloy,” *J. Mater. Sci.*, vol. 40, no. 24, pp. 6357–6361, 2005, doi: 10.1007/s10853-005-2063-z.
- [17] L. Zhang *et al.*, “Characterization of lard from different adipose tissues: Physicochemical properties, thermodynamics characteristics and crystallization behaviors,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 115, no. July 2022, p. 105021, 2023, doi: 10.1016/j.jfca.2022.105021.
- [18] A. Rohman and Y. B. Che Man, “Analysis of Pig Derivatives

- for Halal Authentication Studies,” *Food Rev. Int.*, vol. 28, no. 1, 2012, doi: 10.1080/87559129.2011.595862.
- [19] N. Marikkar, M. Alinovi, and E. Chiavaro, “Analytical approaches for discriminating native lard from other animal fats,” *Ital. J. Food Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 106–115, 2021, doi: 10.15586/ijfs.v33i1.1962.
- [20] M. Azir, S. Abbasiliasi, T. Tengku Ibrahim, Y. Manaf, A. Sazili, and S. Mustafa, “Detection of Lard in Cocoa Butter—Its Fatty Acid Composition, Triacylglycerol Profiles, and Thermal Characteristics,” *Foods*, vol. 6, no. 11, p. 98, 2017, doi: 10.3390/foods6110098.
- [21] J. M. N. Marikkar, H. M. Ghazali, Y. B. C. Man, T. S. G. Peiris, and O. M. Lai, “Use of gas liquid chromatography in combination with pancreatic lipolysis and multivariate data analysis techniques for identification of lard contamination in some vegetable oils,” *Food Chem.*, vol. 90, no. 1–2, pp. 23–30, 2005, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.03.021.
- [22] A. N. Nina Naquiah, J. M. N. Marikkar, M. E. S. Mirghani, A. F. Nurrulhidayah, and N. A. M. Yanty, “Differentiation of fractionated components of lard from other animal fats using different analytical techniques,” *Sains Malaysiana*, vol. 46, no. 2, pp. 209–216, 2017, doi: 10.17576/jsm-2017-4602-04.
- [23] J.M.N. Marikkar and N. A. M. Yanty, “Principal Component Analysis of Fatty Acid Data to Detect Virgin Coconut Oil Adulteration by Palm Olein,” *Cord*, vol. 34, no. 1, p. 9, 2018, doi: 10.37833/cord.v34i1.24.
- [24] N. A. M. Yanty, J. M. N. Marikkar, and M. S. Miskandar, “Comparing the thermo-physical characteristics of lard and selected plant fats,” *Grasas y Aceites*, vol. 63, no. 3, pp. 328–334, 2012, doi: 10.3989/gya.023712.
- [25] T. S. T. Mansor, Y. B. C. Man, and M. Shuhaimi, “Employment of differential scanning calorimetry in detecting lard adulteration in virgin coconut oil,” *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 89, no. 3, pp. 485–496, 2012, doi: 10.1007/s11746-011-1936-3.
- [26] R. Miklos, H. Zhang, R. Lametsch, and X. Xu, “Physicochemical properties of lard-based diacylglycerols in blends with lard,” *Food Chem.*, vol. 138, no. 1, pp. 608–614, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.070.
- [27] A. F. Nurrulhidayah, S. R. Arieff, A. Rohman, I. Amin, M. Shuhaimi, and A. Khatib, “Detection of butter adulteration with lard using differential scanning calorimetry,” *Int. Food*

- Res. J.*, vol. 22, no. 2, pp. 832–839, 2015, doi: 10.1007/s10973-011-1913-y.
- [28] T. S. T. Mansor, Y. B. C. Man, and M. Shuhaimi, “Employment of differential scanning calorimetry in detecting lard adulteration in virgin coconut oil,” *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 89, no. 3, pp. 485–496, 2012, doi: 10.1007/s11746-011-1936-3.
- [29] J. M. N. Marikkar, M. H. Dzulkifly, M. Z. N. Nadiha, and Y. B. C. Man, “Detection of animal fat contaminations in sunflower oil by differential scanning calorimetry,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 15, no. 3, pp. 683–690, 2012, doi: 10.1080/10942912.2010.498544.
- [30] K. A. Al-Rashood, R. R. A. Abou-Shaabn, E. M. Abdel-Moety, and A. Rauf, “Compositional and thermal characterization of genuine and randomized lard: A comparative study,” *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 73, no. 3, pp. 303–309, 1996, doi: 10.1007/BF02523423.
- [31] P. Lambelet and N. C. Ganguli, “Detection of pig and buffalo body fat in cow and buffalo ghees by differential scanning calorimetry,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 60, no. 5, pp. 1005–1008, 1983, doi: 10.1007/BF02660216.
- [32] J. M. N. Marikkar, O. M. Lai, H. M. Ghazali, and Y. B. Che Man, “Detection of lard and randomized lard as adulterants in refined-bleached-deodorized palm oil by differential scanning calorimetry,” *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 78, no. 11, pp. 1113–1119, 2001, doi: 10.1007/s11746-001-0398-5.
- [33] J. M. N. Marikkar, O. M. Lai, H. M. Ghazali, and Y. B. Che Man, “Compositional and thermal analysis of RBD palm oil adulterated with lipase-catalyzed interesterified lard,” *Food Chem.*, vol. 76, no. 2, pp. 249–258, 2002, doi: 10.1016/S0308-8146(01)00257-6.
- [34] J. M. N. Marikkar, H. M. Ghazali, K. Long, and O. M. Lai, “Lard uptake and its detection in selected food products deep-fried in lard,” *Food Res. Int.*, vol. 36, no. 9–10, pp. 1047–1060, 2003, doi: 10.1016/j.foodres.2003.08.003.

BAB VII

ANALISIS KEHALALAN PRODUK DENGAN SPEKTROSKOPI INFRAMERAH

Abdul Rohman^{1*} dan Lily Arsanti Lestari¹

¹*Centre of Excellence Institute for Halal Industry & Systems (IHIS),
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281, Indonesia.*

A. Pendahuluan

Spektroskopi inframerah (IR) merupakan salah satu jenis spektroskopi molekuler yang mana interaksi antara analit dengan radiasi elektromagnetik terjadi pada level molekuler. Metode spektroskopi merupakan metode analisis yang banyak dilaporkan di berbagai publikasi ilmiah. Semua jenis spektroskopi melibatkan interaksi antara sampel dengan radiasi elektromagnetik (REM) di daerah inframerah (IR) [1]. Daerah IR dibagi menjadi 3 daerah yakni IR dekat (biasa disebut dengan NIR atau *near infrared*) yang bersesuaian dengan bilangan gelombang $12.500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, tengah (*mid infrared* atau MIR) yang bersesuaian dengan bilangan gelombang $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, dan IR jauh (*far infrared*) yang bersesuaian dengan bilangan gelombang $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$. Pembagian ke dekat, tengah dan jauh ini relatif terhadap daerah ultraviolet-tampak [2]. Daerah yang paling penting untuk analisis kualitatif sistem organik adalah inframerah dekat, yang mana kebanyakan vibrasi-vibrasi normal ditemukan pada daerah ini.

Keuntungan spektroskopi IR untuk analisis derivat babi adalah merupakan teknik analisis yang tidak merusak (*non destructive*), yang bermakna bahwa sampel yang dianalisis dengan spektroskopi IR dapat dianalisis dengan metode yang lain, sekiranya jumlah sam-

pel sedikit, sensitif, serta tidak melibatkan penyiapan sampel yang rumit. Teknik ini telah digunakan dalam berbagai macam analisis seperti produk-produk makanan dan farmasetik selama beberapa tahun, baik pada daerah inframerah dekat maupun daerah inframerah tengah [3]. Dibandingkan dengan teknik analisis yang lain seperti kromatografi yang mengidentifikasi komponen yang terdapat dalam turunan babi (misalkan analisis asam lemak dengan kromatografi gas dan analisis komposisi triasilgliserol dengan kromatografi cair kinerja tinggi), spektroskopi IR telah diidentifikasi sebagai teknik yang ideal karena menganalisis turunan babi sebagai satu kesatuan materi [4].

Proses penyerapan/absorpsi radiasi inframerah seperti absorpsi energi lainnya, yakni molekul tereksitasi pada tingkat energi yang lebih tinggi ketika menyerap radiasi inframerah dan mengalami vibrasi. Absorpsi radiasi inframerah, seperti proses absorpsi lainnya, merupakan proses terkuantisasi (*quantized*). Suatu molekul menyerap hanya pada frekuensi atau energi tertentu dari radiasi inframerah. Absorpsi radiasi inframerah berkaitan dengan perubahan energi sekitar 8-40 kJ/mol. Pada proses absorpsi, frekuensi radiasi inframerah yang sesuai dengan frekuensi vibrasi alami molekul akan diserap, dan energi yang diserap akan meningkatkan amplitudo gaya vibrasi ikatan dalam molekul. Meskipun demikian, tidak semua ikatan molekul mampu menyerap energi inframerah meskipun frekuensi radiasinya sangat sesuai dengan gaya ikatan. Hanya ikatan-ikatan yang memiliki momen dipol yang mampu menyerap radiasi inframerah. Ikatan simetris seperti H_2 atau Cl_2 tidak menyerap radiasi inframerah [5].

Analisis derivat babi dengan menggunakan spektroskopi inframerah di daerah tengah ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) memberikan informasi yang bernilai tentang adanya ikatan-ikatan molekul dalam turunan babi, dengan demikian, spektroskopi FTIR memberikan informasi

tentang jenis-jenis gugus fungsional secara rinci yang terdapat dalam turunan babi (Rohman dkk., 2010^a).

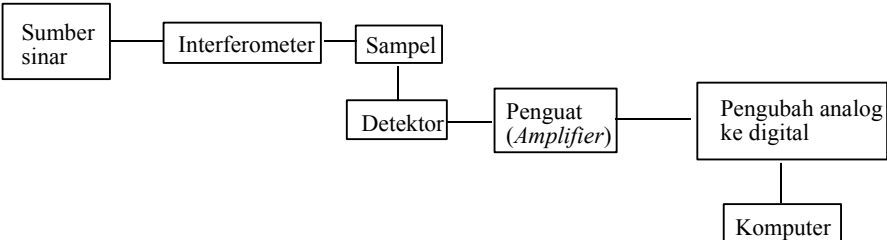
B. Sistem Instrumentasi Spektrofotometer Inframerah

Ada 2 jenis instrumen spektrofotometer IR, yakni spektrofotometer dispersif menggunakan monokromator berupa prisma dan spektrofotometer Fourier *transform* yang menggunakan interferogram. Sejak dikembangkannya instrumentasi Fourier, spektrofotometer inframerah tertransformasi Fourier (FTIR) telah berkembang sebagai alat analisis yang digunakan untuk berbagai kajian terkait turunan babi [6]. Saat ini, kebanyakan spektrofotometer yang digunakan adalah spektrofotometer FTIR. Keuntungan utama spektrofotometer FTIR adalah bahwa alat ini menawarkan sensitifitas yang tinggi, waktu analisis yang cepat, akurasi dan reproduibilitas frekuensi yang sangat baik, dapat dimanipulasi untuk menghasilkan data yang dapat diterima, serta dilengkapi dengan perangkat lunak kemometrika yang memungkinkannya sebagai alat yang canggih untuk analisis kualitatif dan kuantitatif.

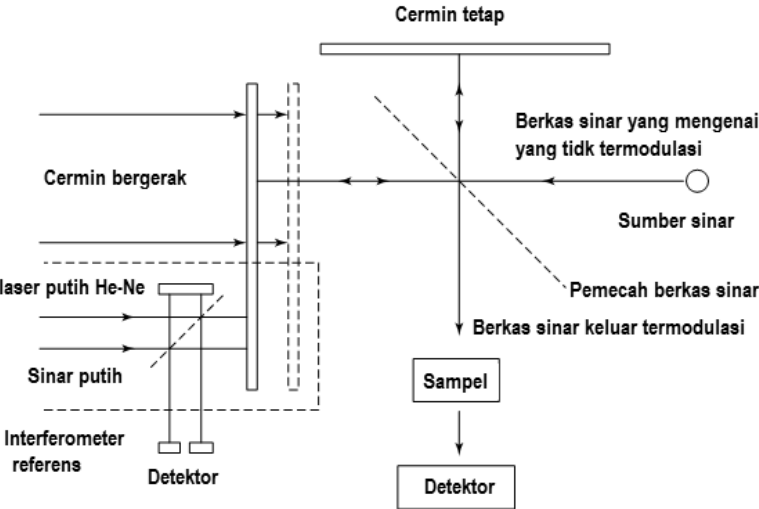
Spektrofotometer FTIR terdiri atas sistem optik yang menggunakan interferometer dan komputer untuk menyimpan data. Interferometer yang paling sering digunakan adalah interferometer *Michelson*. Bagan spektrofotometer FTIR dapat dilihat pada Gambar 7.1.a. Pada spektrofotometer FTIR terdapat dua cermin yaitu cermin statis dan cermin dinamis. Di antara kedua cermin terdapat *beam splitter* yang diatur 45° dari cermin dinamis. Sinar dari sumber inframerah dilewatkan ke cermin melalui *beam splitter* (sebagian dari total radiasi kembali ke sumber). *Beam splitter* membagi sinar menjadi dua dan mentransmisikan ke cermin statis dan sebagian lagi ke cermin dinamis (Gambar 7.1.b). Kemudian, pantulan dari kedua cermin digabung lagi pada *beam splitter*. Sinar yang muncul dari interferometer pada 90° disebut sinar transmisi dan sinar ini dideteksi

dengan suatu detektor. Salah satu detektor yang digunakan adalah DTGS (*deuterated triglycine sulphate*). Panjang jalur dari salah satu sinar kembali diubah untuk membentuk pola interferensi. Radiasi rekombinasi lalu diarahkan ke sampel dan difokuskan ke detektor. Intensitas yang didapat detektor disebut interferogram, yaitu suatu ukuran intensitas sinyal sebagai fungsi dari perbedaan jalur antara kedua sinar pada interferometer [7].

(A)



(B)



Gambar 2.1. Skema spektrofotometer FTIR (a) dan interferometer Michelson (Sumber: Stuart, 2004) [8].

Teknik pengumpulan informasi spektra IR dilakukan menggunakan interferometer. Tidak seperti instrumen dispersif yang panjang gelombang sinar masing masing terpisah, interferometer membuat semua panjang gelombang dapat melewati instrumen dan sampel, untuk menghasilkan pola interferensi yang dapat dianalisis oleh komputer dengan mengubah data menjadi suatu spektra inframerah [8].

Teknik penanganan sampel spektroskopi inframerah ada beberapa macam, diantaranya transmittan dan pantulan (*reflectance*). Transmittan merupakan teknik penanganan sampel yang paling mudah mekanismenya, yaitu melewatkan radiasi inframerah pada sampel lalu mendeteksinya. Transmittan memberikan spektra dengan perbandingan *signal to noise* (SNR) tinggi dan harganya relatif murah. Teknik transmittan dibatasi oleh ketebalan sampel. Sampel dengan rentang 1-20 μg sesuai untuk analisis transmittan. Preparasi sampel untuk teknik ini termasuk lama.

Berbeda dengan transmittan, pada pantulan (*reflectance*), sinar inframerah dipantulkan kembali dari sampel yang diukur. Preparasi sampel cepat dan mudah, teknik ini non-destruktif dan tidak dipengaruhi ketebalan sampel. SNR pantulan lebih rendah dibanding transmittan. Kekurangan teknik pantulan yaitu terkadang dibutuhkan tambahan peralatan khusus dan mahal, yang membatasi aplikasinya. Dalamnya penetrasi ke sampel tidak diketahui pasti dan permukaan sampel mempengaruhi spektra dibanding bagian dalamnya [8].

Berdasarkan tipe pantulan dari sampel, teknik pantulan terbagi menjadi *specular reflectance*, *diffused reflectance*, dan *attenuated total reflectance* (ATR). ATR merupakan teknik yang paling sering digunakan. Ketika suatu sinar inframerah melaju dari medium dengan indeks bias tinggi (misalnya kristal zink selenida) ke medium dengan indeks bias rendah, sejumlah sinar dipantulkan kembali ke

medium yang berindeks bias rendah. Fenomena ini disebut *attenuated total reflectance*. Pada kondisi ini, sejumlah energi cahaya lolos dari kristal dan melebar di luar permukaan dalam bentuk gelombang. Intensitas sinar pantulan berkurang pada titik ini. Fenomena ini disebut *attenuated total reflectance*. Ketika sampel diaplikasikan pada kristal, sejumlah radiasi inframerah berpenetrasi keluar kristal dan diserap oleh sampel. Saat ini telah tersedia instrumen FTIR yang bersifat *on site* sehingga sesuai untuk digunakan pada *screening* langsung di lapangan [9].

C. Analisis Derivat Babi dengan Spektroskopi Inframerah

Spektroskopi inframerah (IR) termasuk ke dalam spektroskopi vibrasional yang mana gugus-gugus fungsi yang menyerap sinar IR akan mengalami vibrasi dan dieksitasikan ke level vibrasional untuk menghasilkan spectra IR. Teknik ini bersifat non-destruktif sehingga sampel yang telah dianalisis dengan spektroskopi IR dapat dianalisis dengan tekni atau metode analisis yang lain [10]. Spektroskopi IR bersifat sidik jari (*fingerprint*), yang bermakna bahwa tidak ada 2 materi yang berbeda yang mempunyai spektra IR yang sama. Sifat sidik jari ini dapat digunakan untuk pembedaan komponen halal dengan komponen nonhalal seperti derivat babi. Seiring dengan perkembangan teknologi komputer dan statistika, analisis dengan spektroskopi inframerah kebanyakan digabungkan dengan kemometrika. Kemometrika adalah penggunaan matematika dan statistika untuk mengolah data kimia, dalam hal ini spektra inframerah. Jenis kemometrika yang paling sering digunakan dalam kaitannya dengan data spektra inframerah adalah (1) teknik pengelompokan seperti *principal component analysis* dan *discriminant analysis*; serta (2) teknik analisis kuantitatif dengan kalibrasi multivariat seperti *partial least square* (PLS) dan *principal component regression* (PCR) [11] [12].

Beberapa perangkat lunak yang ramah kepada pengguna (*user-friendly software*) saat ini telah tersedia secara komersial yang ditawarkan oleh berbagai perusahaan seperti Minitab® (State College, Pennsylvania, USA), Unscrambler® (Camo Analytics, Molndal, Sweden), SIMCA® (Sartorius, Gottingen, Germany), and MATLAB®PLS_Toolbox (Mathworks, MA, USA) sehingga memudahkan para pengguna kemometrika untuk mengolah data, terutama data dalam jumlah besar (*big data*) [13].

Meskipun spektroskopi FTIR menawarkan kesederhanaan dan kecepatannya, serta didukung fakta bahwa spektra FTIR bersifat sidik jari, namun metode analisis ini mempunyai kelemahan ketika digunakan untuk analisis kualitatif dan analisis kuantitatif derivat babi dalam berbagai produk. Jika matriks sampel yang diduga mengandung lemak babi atau derivat babi lainnya berbeda, maka suatu model harus dibangun kembali untuk menghasilkan suatu model kalibrasi dan validasi yang akurat dan *precise*, sebagaimana terlihat dalam Tabel 7.1 yang mana adanya derivat babi yang sama dalam matriks sampel yang berbeda dianalisis secara terpisah [14]. Di samping itu, penggunaan spektra FTIR untuk tujuan analisis kualitatif ataupun kuantitatif harus digabungkan dengan teknik kemometrika yang sesuai, sehingga diperlukan pemilihan jenis kemometrika tertentu.

Tabel 7.1. Penggunaan spektroskopi inframerah untuk analisis komponen tidak halal dalam produk makanan dan sediaan farmasi.

Turunan babi	Sampel makanan /sediaan farmasi	Issue	Hasil	Ref.
Lemak babi	Minyak makan	Karakterisasi lemak babi dalam campuran biner dengan lemak hewani lainnya	Lemak babi telah sukses dikarakterisasi dengan spektroskopi IR terutama di daerah sidik jari. Batas deteksi tidak dilaporkan.	[15]

Lemak babi	Lipstik	Deteksi lemak babi dalam sediaan lipstik. Ekstraksi lipid dilakukan dengan 3 metode yaitu Soxhlet, Bligh-Dyer dan Folch.	Kemometrika PCA dapat mengelompokkan lipstik dengan kandungan lemak babi dan lemak lainnya, dengan 3 metode ekstraksi. Daerah IR yang digunakan untuk analisis adalah 1200-800 cm^{-1} . Analisis kuantitatif dilakukan dengan bantuan <i>partial least square</i> .	[16]
Daging babi	Daging	Identifikasi daging babi dalam sosis	Fraksi lemak (lemak babi) diekstraksi dengan metode Soxhlet. PCA menggunakan bilangan gelombang 1200-1000 cm^{-1} digunakan untuk pengelompokkan. Analisis kuantitatif dilakukan dengan PLS menggunakan absorbansi di bilangan gelombang 1200-800 cm^{-1} dan menghasilkan persamaan $y = 0,921x + 4,623$ dengan $R^2 = 0,985$, RMSEC = 2,094%; RMSEP = 4,77%	[17]
Daging babi	Daging yang lain	Pengelompokkan berbagai jenis daging (babi, sapi, anjing dan kambing). Berbagai Teknik kemometrika pengenalan pola dioptimasi, yakni PLS-DA dan SVM.	SVM menunjukkan pengelompokkan yang baik dalam artian kinerja akurasi total, yakni sebesar 98% dengan spectra ATR-FTIR dan sebesar 100% untuk spektra DR-FTIR. Sementara PLS-DA masing-masing memberikan total akurasi masing-masing sebesar 90% dan 98%.	[18]
Lemak babi	Campuran lemak makan	Lemak babi yang dicampur dengan minyak yang lain	Adanya lemak babi dalam campuran dengan lemak lain telah sukses dikuantifikasi dengan PLS.	[19]
Lemak babi	Kerupuk rambak	Lemak babi dalam kerupuk rambak	PLS menggunakan variable absorbansi di bilangan gelombang 1200-1000 cm^{-1} sukses digunakan untuk prediksi kandungan lemak babi dalam Rambak dengan nilai $R^2 = 0,946$ dengan RMSEC dan RMSEP yang rendah.	[20] [21]
Lemak babi	Lemak hewani	Lemak babi dicampur dengan lemak hewani lainnya	Kemometrik Analisis Diskriminan dapat mengelompokkan lemak babi dengan lemak hewani lainnya (lemak sapi, lemak domba dan lemak	[22] [23]

			<p>ayam) menggunakan bilangan gelombang 3300 – 650 cm^{-1}. Analisis kuantitatif lemak babi difasilitasi dengan PLS dengan menggunakan variable nilai absorbansi 1500 – 900 cm^{-1}. Persamaan untuk korelasi antara kandungan lemak babi sebenarnya (x) dan lemak babi terprediksi adalah: $y = 0.995x + 0.098$ ($R^2 = 0,995$ dan $RMSEC = 0,98$. Batas deteksi = 1% (v/v)</p>	
Lemak babi	Coklat dan produk-produknya	Penambahan lemak babi	<p>Absorbansi pada bilangan gelombang 4000–650 cm^{-1} digunakan untuk prediksi lemak babi dalam coklat dan menghasilkan persamaan $y = 0,9225x + 0,5539$. Nilai $R^2 = 0,9872$ dengan standard error (SE) sebesar 1,305. Batas deteksi = 3% (b/b)</p>	[24]
Lemak babi	Biskuit	Pemalsuan dengan lemak babi	<p>Analisis Diskriminan sukses untuk perbedaan lemak babi dalam lemak lainnya dalam biskuit dengan menggunakan absorbansi di gabungan bilangan gelombang 3050-2800, 1800-1600, dan 1500-650 cm^{-1}.</p>	[25]
Lemak babi	Minyak hati ikan cod	Pemalsuan minyak hati ikan kod (CLO) dengan lemak babi	<p>Adanya lemak babi dalam CLO sukses dikuantifikasi dengan PLS. Analisis diskriminan sukses untuk mengelompokkan CLO dan CLO yang dipalsukan dengan lemak babi.</p>	[26]
Lemak babi	Minyak VCO	Pemalsuan VCO dengan lemak babi	<p>Kandungan lemak babi dalam VCO dilakukan dengan menggunakan nilai absorbansi pada gabungan bilangan gelombang 3020-3000 cm^{-1} dan 1120-1000 cm^{-1}.</p>	[27]
Gelatin	Bahan awal	Identifikasi gelatin babi	<p>Kemometrik PCA dengan mengaplikasikan nilai-nilai absorbansi pada gabungan bilangan gelombang 3290-3280 cm^{-1} dan 1660-1200 cm^{-1} sukses digunakan untuk mengelompokkan gelatin babi dan gelatin sapi.</p>	[28]

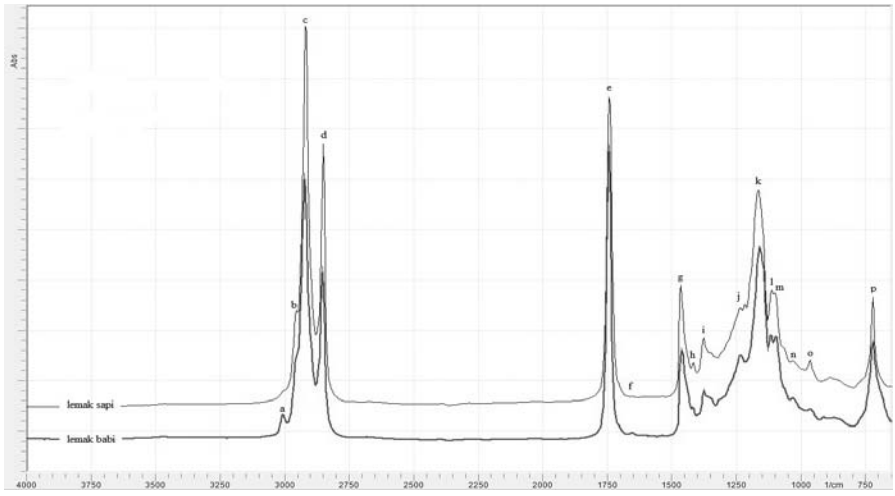
Lemak babi	Berbagai minyak nabati	Pemalsuan lemak babi	Lemak babi sebagai pemalsu dalam minyak canola, minyak jagung, minyak zaitun, minyak kedelai dan minyak bunga matahari sukses dilakukan diskriminasi dengan analisis diskriminasi menggunakan daerah 1500–1000 cm^{-1} . Untuk kuantifikasi digunakan PLS. Batas deteksi = 1%	[29]
Lemak babi	Sediaan krim kosmetika	Penggunaan lemak babi sebagai basis krim	Lemak babi dalam campuran VCO dalam sediaan krim telah sukses diprediksi dengan bantuan PLS. batas deteksi = 1%	[30]
Daging babi	Bakso	Pemalsuan bakso sapi dengan bakso babi	Analisis kuantitatif lemak babi yang diekstraksi dari bakso daging babi dilakukan pada bilangan gelombang 1200–1000 cm^{-1} dengan hasil akurasi dan presisi yang dapat diterima. Nilai R^2 , RMSEC adalah 0,999 dan 0,442 dan RMSEP = 0,742. Batas deteksi = 4%	[31], [32]
Lemak babi	<i>Lotion</i>	Penggunaan lemak babi sebagai basis lotion	Lemak babi dalam campuran minyak sawit dalam sediaan lotion sukses dianalisis dengan spektroskopi FTIR-PLS dengan menggunakan bilangan gelombang 1200-1000 cm^{-1} , dengan nilai $R^2 = > 0,99$. Batas deteksi = 1%. PCA mampu mengelompokkan lotion dengan kandungan lemak babi dan minyak sawit.	[33]
Lemak babi	Kuah bakso	Pemalsuan bakso sapi dengan bakso babi	PCA digunakan untuk analisis pengelompokkan lemak babi dan lemak sapi dalam kuah bakso 1200-1000 cm^{-1} . Kuantifikasi dengan PLS dilakukan pada bilangan gelombang 1018–1284 cm^{-1} menghasilkan R^2 dan RMSEC sebesar 0,9975 dan 1,34% (v/v).	[34]
Lemak babi	Krim	Lemak babi yang tercampur dengan minyak	Lemak babi dalam campuran minyak zaitun dalam krim sukses	[35]

		zaitun sebagai basis sediaan krim	dianalisis dengan PLS menggunakan kombinasi bilangan gelombang 1785-702 cm^{-1} dan 3020-2808 cm^{-1} . PCA untuk pengelompokkan krim dengan lemak babi dan minyak zaitun dilakukan pada bilangan gelombang 1200 – 1000 cm^{-1} .	
Lemak babi	Kentang yang digoreng dengan minyak sawit	Lemak babi yang terdapat dalam kentang yang digoreng dengan campuran minyak sawit dan lemak babi	Adanya lemak babi untuk menggoreng kentang dikuantifikasi dengan PLS menggunakan nilai absorbansi pada bilangan gelombang 3100–1050 cm^{-1} , dengan nilai $R^2 = 0,9791$. Batas deteksi = 0,5%.	[36]
Daging tikus	Bakso sapi yang dicampur dengan daging tikus	Adanya daging sapi yang dicampur dengan daging tikus dalam bakso	Nilai absorbansi pada bilangan gelombang 750–1000 cm^{-1} digunakan untuk analisis kuantitatif dengan PLS dan pengelompokkan dengan PCA. Persamaan untuk korelasi antara daging tikus actual (x) dan terprediksi (y) adalah $y = 0,9417x + 2,8410$, dengan nilai $R^2 = 0,993$ dan RMSEC sebesar 1,79%.	[37]
Daging tikus	Deteksi daging tikus dalam sampel sosis	Deteksi daging tikus melalui lemak tikus dalam sosis. Ekstraksi lipid dilakukan dengan 3 metode yaitu Soxhlet, Bligh-Dyer dan Folch.	Kemometrika PCA dapat mengelompokkan sosis dengan komponen daging tikus dan daging sapi, dengan 3 metode ekstraksi. Daerah IR yang digunakan untuk analisis adalah 1800-750 cm^{-1} digunakan untuk pengelompokkan dengan PCA. Analisis kuantitatif dilakukan dengan bantuan <i>partial least square</i> . Nilai R^2 , RMSEC dan RMSEP dapat diterima.	[38]

tdl = tidak dilaporkan; *ATR-FTIR* = *attenuated total reflectance-FTIR*; *DR-FTIR* = *diffuse reflectance-FTIR*; PCA = principal component analysis; PLS-DA = partial least squares-discriminant analysis; SVM = support vector machine;

Gambar 7.2. merupakan contoh spektra inframerah lemak babi dan minyak sapi. Spektra inframerah lemak babi pada dasarnya mirip dengan spektra FTIR minyak dan lemak yang lain, karena pada

dasarnya minyak dan lemak tersusun dari trigliserida (ester asam lemak dengan gliserol) yang berbeda dalam hal jenis asam lemak penyusun, urutan asam lemak, serta tingkat kejenuhan asam lemak. Karena alasan inilah, deteksi lemak babi dalam lemak hewani atau dalam minyak nabati lainnya sering menyulitkan. Meskipun demikian, karena kemampuannya sebagai teknik sidik jari (*fingerprint*) yang berarti bahwa tidak ada 2 minyak atau lemak yang mempunyai jumlah puncak atau intensitas yang sama, maka spektroskopi FTIR merupakan teknik yang menjanjikan untuk analisis lemak babi, sehingga dapat dimanfaatkan oleh seorang analis untuk membuat penandaan awal lemak babi [39]. Interpretasi masing-masing puncak pada spektra inframerah lemak babi dan lemak makan lainnya dapat dilihat dalam Tabel 7.2.



Gambar 7.2. Spektra inframerah lemak babi dan lemak sapi pada bilangan gelombang 4000-650 cm^{-1} [40].

Tabel 7.2. Gugus fungsi dan model vibrasi lemak babi dan lemak sapi [41], [42].

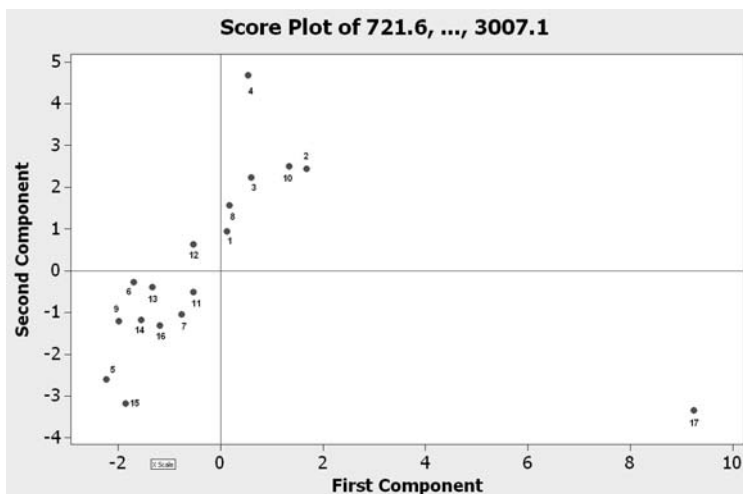
Penandaan	Frekuensi (cm ⁻¹)	Vibrasi gugus fungsional
a	3006	<i>cis</i> C=CH uluran
b	2954	Vibrasi ulur asimetris gugus metil (-CH ₃)
c dan d	2924 dan 2852	Vibrasi ulur asimetris dan simetris gugus metilen (-CH ₂)
e	1743	Gugus fungsi karbonil (C=O) dari ikatan ester triasilgliserol
f	1654	<i>cis</i> C=C
g	1465	Vibrasi tekuk dari gugus CH ₂ dan CH ₃ alifatik
h	1417	Vibrasi goyangan ikatan CH dari alkena <i>cis</i> -disubstitusi
i	1377	Vibrasi tekuk simetris gugus CH ₃
j dan k	1228 dan 1155	Vibrasi ulur gugus C-O dalam ester
l dan m	1111 dan 1097	Vibrasi tekuk -CH dan perubahan bentuk -CH dari asam lemak
n	1033	Vibrasi ulur C-O
o	962	Vibrasi tekuk gugus fungsi CH dari trans-olefin terisolasi
p	721	Tumpang tindih vibrasi goyangan metilen (-CH ₂) dan vibrasi keluar bidang olefin <i>cis</i> -disubstitusi

1. Analisis Lemak Babi dengan spektroskopi inframerah

Guillen dan Cabo [15] telah mengembangkan spektroskopi FTIR untuk mendeteksi dan melakukan karakterisasi minyak makan (*edible oil*) dan lemak babi. Spektra IR direkam dan pita-pita yang berasal dari lemak babi yang disebabkan oleh vibrasi gugus-gugus fungsional. Adanya frekuensi vibrasi di daerah sidik jari memungkinkan seseorang untuk membuat pengelompokkan minyak makan dan lemak babi.

Che Man dkk. [43] telah melakukan kajian untuk membedakan lemak babi dari 16 lemak dan minyak makan dengan spektroskopi FTIR digabungkan dengan kemometrika analisis komponen

utama atau *principal component analysis* (PCA) menggunakan nilai-nilai absorbansi di 16 bilangan gelombang yakni 721,6; 868,3; 965,7; 1031,9; 1097,3; 1116,8; 1157,6; 1236,3; 1377,2; 1417,6; 1464,7; 1654,7; 1743,5; 2852,8; 2922; dan 3007,1 cm^{-1} . Gambar 2.3 menunjukkan score plot PCA 17 lemak dan minyak makan yang menggambarkan proyeksi sampel lemak babi dan minyak/lemak makan lainnya yang didefinisikan dengan komponen utama pertama (PC1) dan komponen utama kedua (PC2). PC1 menggambarkan absorbansi spektra FTIR yang variannya paling besar pertama, sementara PC 2 mempunyai varian absorbansi terbesar kedua.



Gambar 7.3. Score plot 2 komponen utama pertama untuk 17 minyak dan lemak. 1 = lemak babi; 2 = lemak sapi; 3 = lemak ayam; 4 = lemak domba; 5 = minyak hati ikan cod; 6 = minyak canola; 7 = minyak jagung; 8 = minyak zaitun murni; 9 minyak biji anggur; 10 = minyak sawit; 11 = minyak biji pumpkin; 12 = minyak dedak beras; 13 = minyak wijen; 14 = minyak kedelai; 15 = minyak walnut; 16 = minyak bunga matahari; 17 = minyak kelapa murni (VCO) [43]. Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Springer.

Suatu nilai akar ciri (*eigen value*) 90 % dicapai dengan 4 komponen utama pertama. PC1 menggambarkan 44,1 % variasi, sementara PC 2 menggambarkan 30,2 % variasi; dengan demikian, seba-

nyak 74,4 % varian dapat dijelaskan dengan 2 komponen utama pertama. Frekuensi/bilangan gelombang yang berkontribusi terhadap pemisahan lemak babi dari minyak/lemak lainnya berdasarkan pada komponen utama pertama adalah $2852,8 \text{ cm}^{-1}$ diikuti oleh 2922 dan $1464,7 \text{ cm}^{-1}$. Sementara itu, frekuensi $1116,8$ dan $1236,3 \text{ cm}^{-1}$ berpengaruh pada pemisahan lemak babi dan lainnya berdasarkan pada PC 2.

Che Man dan Mirghani [19] telah menggunakan spektroskopi FTIR untuk menganalisis adanya lemak babi (LB) yang tercampur dengan lemak sapi (LS), lemak domba (LD) dan lemak ayam (LA) dengan bantuan kalibrasi multivariat kuadrat terkecil sebagian (*partial least square*, PLS). Sampel lemak-lemak hewani ini diperoleh dengan cara mengekstraksi jaringan adiposa babi, sapi, domba, dan ayam, sebagaimana diuraikan pada Bab I (penyiapan lemak babi). Persentase LB dalam campuran dengan LD dianalisis pada frekuensi $3009 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, menggunakan persamaan yang menyatakan hubungan antara nilai LB sebenarnya (sumbu -x) dengan nilai LB terhitung menggunakan spektroskopi FTIR (sumbu -y) sebagai berikut: $y = 0,1616x + 3002,1$. Nilai koefisien determinasi (R^2) dan kesalahan baku prediksi (*standard error of prediction* atau SEP), masing-masing sebesar 0,9457 dan 1,23 %. Pita spektra FTIR di $3005,6 \text{ cm}^{-1}$ diusulkan untuk penentuan LB dalam LA menggunakan persamaan $y = 0,0071x + 0,1301$ ($R^2 = 0,983$, SEP = 0,012 %). Sementara itu, adanya LB dalam LS ditentukan pada frekuensi $966,22 \text{ cm}^{-1}$ dengan persamaan, R^2 , dan SEP masing-masing adalah $y = -0,005x + 0,3188$; 0,9831, dan 0,0086 %.

Pengamatan lemak babi (LB) dalam campuran dengan daging sapi dan daging domba telah dilakukan oleh Jaswir dkk. [22] menggunakan spektroskopi FTIR. Suatu regresi PLS telah digunakan untuk analisis kuantitatif kandungan LB yang tercampur dengan daging domba menggunakan data spektra pada frekuensi 3010 – 2000;

1220 – 1095; 968 – 965 cm^{-1} . Persamaan yang diperoleh untuk menyatakan hubungan antara nilai LB sebenarnya (sumbu -x) dengan nilai LB terhitung menggunakan FTIR (sumbu -y) adalah $y = 1,151x - 0,1882$; $R^2 = 0,9868$; SEP = 2,01 % (v/v). Sementara untuk LB yang tercampur dengan daging sapi, dilakukan analisis pada frekuensi 968 – 965 cm^{-1} . Persamaan yang digunakan adalah $y = 0,7239x + 1,1369$; $R^2 = 0,9749$; SEP = 1,86 % (v/v).

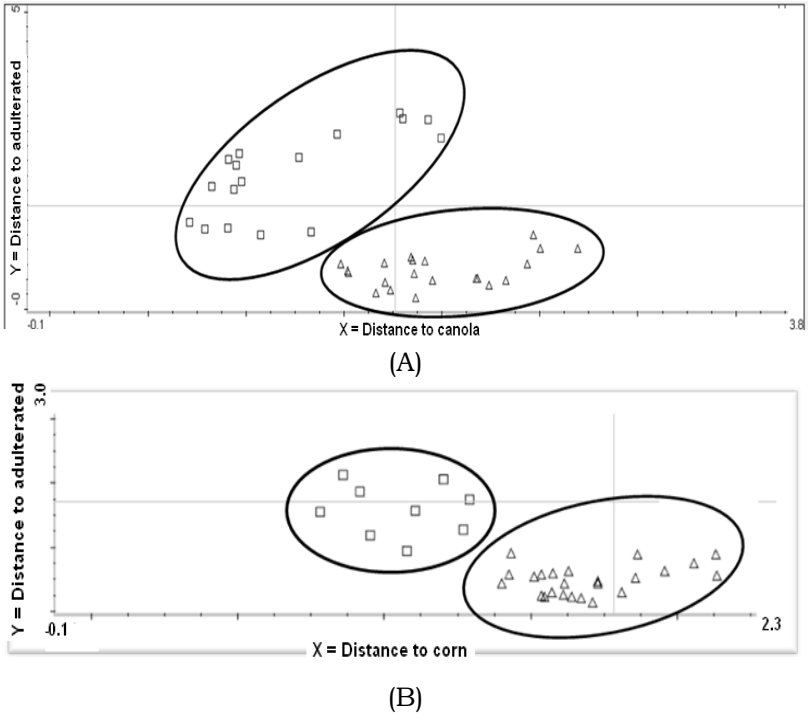
Kedua kelompok peneliti ini menggunakan frekuensi yang berbeda-beda untuk analisis lemak babi (LB) yang tercampur dengan lemak hewani lainnya. Di samping itu, kedua kelompok ini juga tidak melakukan analisis diskriminan untuk mengelompokkan LB dan LB dalam campuran dengan lemak hewani lainnya. Karena alasan ini, maka Rohman dan Che Man [23] telah mengembangkan spektroskopi FTIR digabungkan dengan kemometrika analisis multivariat PLS dan diskriminan analisis (DA) untuk analisis kuantitatif dan pengelompokkan LB dan LB yang tercampur dengan lemak hewani lainnya pada satu kisaran frekuensi. Dua daerah frekuensi yakni di keseluruhan daerah inframerah tengah (3300-700 cm^{-1}) dan di daerah sidik jari terpilih (1.500 – 900 cm^{-1}) dioptimasi untuk tujuan analisis ini. Pemilihan daerah frekuensi didasarkan pada kemampuannya untuk memberikan nilai R^2 terbesar dan nilai akar kuadrat kesalahan baku pada kalibrasi (*root mean square error of calibration*, RMSEC) terkecil. Berdasarkan pada kriteria ini, frekuensi 1500 - 900 cm^{-1} dipilih untuk analisis LB yang tercampur dengan LD, LS, dan LA dengan nilai $R^2 > 0,99$ dan RMSEC yang dilaporkan adalah 0,98 % (LD); 0,73 % (LS); dan 0,61 % (LA). Studi ini juga menunjukkan bahwa spektroskopi FTIR di daerah 3300 – 800 cm^{-1} digabungkan dengan AD mampu mengelompokkan LB dan LB yang tercampur dengan lemak hewani lainnya.

LB mungkin digunakan sebagai lemak pemalsu dalam minyak yang harganya jauh lebih tinggi. Spektroskopi FTIR yang di-

kombinasikan dengan PLS dan AD telah digunakan untuk deteksi dan kuantifikasi LB dalam minyak hati ikan cod (*cod liver oil*, CLO) dan minyak kelapa dara (*virgin coconut oil*, VCO). Daerah frekuensi 1,035 – 1030 cm^{-1} telah digunakan untuk analisis kuantitatif LB dalam CLO dengan persamaan yang diperoleh adalah: kandungan LB terhitung = 0,872 x (nilai LB sebenarnya) – 0,392 dengan nilai R^2 dan RMSEC adalah 0,967 dan 1,605 %. AD menggunakan 7 komponen utama mampu mengelompokkan LD yang tercampur dengan CLO. Adanya LB dalam VCO dapat dengan mudah dianalisis dengan spektroskopi FTIR dengan bantuan PLS dan AD di frekuensi 1120 – 950 cm^{-1} . PLS mampu memprediksi kandungan LB dalam VCO dengan persamaan kandungan LB terhitung = 0,999 x (nilai LB sebenarnya) – 0,392; dengan nilai $R^2 = 0,999$. AD mampu mengelompokkan VCO dan CLO yang tercampur dengan LB tanpa ada satupun yang tidak terkelompokkan sesuai dengan kelompoknya [44].

Dengan tujuan untuk mengurangi biaya produksi selama pemrosesan makanan, LB mungkin ditambahkan ke dalam beberapa minyak nabati. Rohman dkk. [29] telah menggunakan spektroskopi FTIR untuk kuantifikasi dan klasifikasi LB dalam minyak nabati tertentu, yakni: minyak canola (MC), minyak jagung (MJ), minyak zaitun (MZ), minyak kedelai (MK), dan minyak bunga matahari (MBM). Disebabkan karena kemampuannya untuk memberikan nilai R^2 tertinggi dan nilai RMSEC tertendah, frekuensi di 1,500 – 1,000 cm^{-1} dipilih untuk kuantifikasi LB dalam minyak nabati ini. Dapat disimpulkan bahwa spektra FTIR normal dan turunan pertama mampu memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan spektra FTIR turunan kedua untuk analisis LB dalam MC. Kecenderungan ini juga berlaku pada kuantifikasi LB dalam MJ, MK, dan MBM. Sementara itu, adanya LB dalam MZ paling baik dianalisis menggunakan spektra FTIR turunan pertama. Lebih lanjut, AD mampu mengelompokkan minyak nabati dan minyak nabati yang tercampur

dengan LB pada kisaran konsentrasi 1 – 50 % (v/v) secara akurat 100 %, kecuali pada MK yang mana ada satu sampel yang tidak terkelompokkan dengan benar. Gambar 7.4. merupakan contoh *Plot Coomans* minyak nabati (minyak canola dan minyak jagung) dan minyak nabati yang tercampur dengan LB.

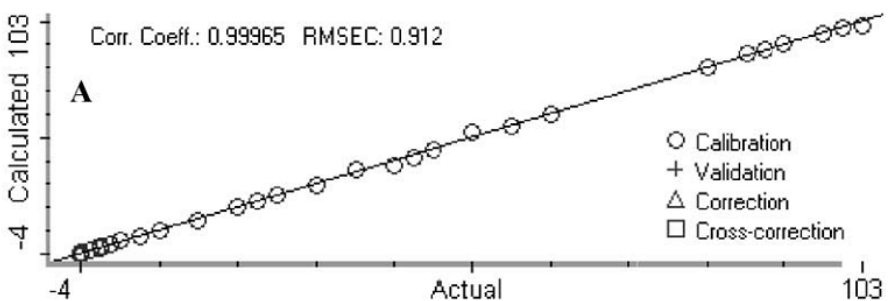


Gambar 7.4. *Plot Coomans* minyak nabati dan minyak nabati yang tercampur dengan lemak babi (LB): (□) minyak nabati; (Δ) minyak nabati yang ditambah dengan LB. A = minyak canola; B = minyak jagung [29]. Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Taylor and Francis dengan nomer lisensi 2953420001426.

Rohman dkk. [45] melakukan analisis lemak babi dalam minyak kelapa sawit (*palm oil*). Lemak babi dikuantifikasi dengan model kalibrasi PLS pada bilangan gelombang 1480 – 1085 cm^{-1} . Model dan bilangan gelombang yang digunakan mampu memberikan koefisien determinasi hubungan antara nilai sebenarnya lemak babi dengan

nilai terprediksi lemak babi dalam minyak kelapa sawit sebesar 0,998 dengan nilai *root mean square error of calibration* atau RMSEC sebesar 2,87%.

Selain dalam 2 sistem lemak, Rohman dan Che Man [46] juga melakukan analisis lemak babi dalam sistem 4 campuran dengan lemak sapi, lemak domba, dan lemak ayam. Analisis multivariat PLS pada bilangan gelombang 1500 – 1000 cm^{-1} dan spektra turunan pertama adalah sesuai untuk analisis lemak babi dalam sistem empat campuran ini. Berbagai optimasi (pemilihan bilangan gelombang dan jenis spektra) dilakukan untuk menghasilkan kombinasi terbaik, sehingga akhirnya digunakan spektra derivatif pertama untuk lemak babi, sementara spektra normal digunakan untuk analisis kuantitatif ketiga lemak yang lain pada bilangan gelombang yang sama. Pemilihan bilangan gelombang dan jenis spektra ini didasarkan pada kemampuannya untuk menghasilkan nilai R^2 yang tertinggi dan nilai RMSEC dan RMSEP terkecil. Gambar 7.5 menunjukkan hubungan antara lemak babi sesungguhnya (*actual value*) dengan lemak babi terprediksi atau terhitung (*calculated value*) dalam sistem empat campuran.



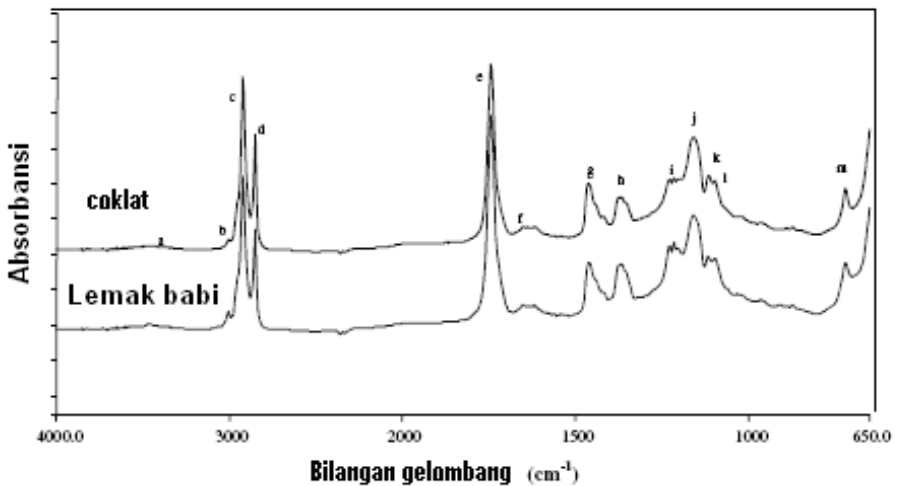
Gambar 7.5. Model kalibrasi PLS yang menyatakan hubungan antara lemak babi sesungguhnya (*actual value*) dengan lemak babi terhitung (*calculated value*) dalam sistem empat campuran menggunakan spektra derivatif pertama pada bilangan gelombang 1500 – 1000 cm^{-1} [46]. Gambar diambil atas kebaikan dari Hindawi Publishing.

Sejauh ini pembahasan analisis lemak babi (LB) adalah dalam campuran dengan minyak/lemak lain, sehingga tidak melibatkan proses ekstraksi. Dalam sistem makanan, LB harus diekstraksi terlebih dahulu sebelum diukur dengan spektroskopi FTIR. Syahariza dan kelompoknya telah menggunakan spektroskopi FTIR digabungkan dengan teknik *sampling* reflektansi total yang diperkuat (*attenuated total reflectance* atau ATR) dan PLS untuk identifikasi adanya LB dalam berbagai model sistem makanan yakni kue, coklat, dan biskuit. Spektra-spektra yang dihubungkan dengan LB, kue, coklat, biskuit, dan campuran-campurannya direkam. Suatu pendekatan semi-kuantitatif diusulkan untuk mengukur persentase lemak babi dalam suatu campuran berdasarkan data spektra pada daerah frekuensi $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ (coklat), $1117 - 1097 \text{ cm}^{-1}$ (kue), dan pada frekuensi $3500 - 2900 \text{ cm}^{-1}$ (biskuit). Persamaan yang digunakan untuk melihat hubungan antara banyaknya LB terprediksi (y) dan nilai sebenarnya (x), yang dihitung dengan PLS adalah: $y = 0,9225x + 0,5539$ dengan R^2 sebesar 0,9872 dan kesalahan baku pengukuran atau *standard error of measurement* (SEM) sebesar 1,305 % (coklat); $y = 0,9937x + 0,1980$ dengan R^2 0,9937 dan SEM 2,257 % (kue); dan $y = 0,9962x + 0,1396$ dengan R^2 sebesar 0,9974 dan SEM sebesar 2,819 % (biskuit).

Che Man dkk. [24] melakukan analisis lemak babi dalam sampel coklat dengan spektroskopi FTIR dan kalibrasi multivariat. Ekstraksi LB dalam produk makanan dilakukan menurut metode Bligh dan Dyer dengan menggunakan kloroform/metanol/air (2:1:1 v/v/v) sebagai pelarutnya dengan sedikit modifikasi. Sejumlah tertentu sampel makanan dihomogenkan dengan *blender* selama 2 menit dengan campuran 10 mL kloroform dan 10 mL metanol. Sebanyak 10 mL kloroform ditambahkan setelah dilakukan pencampuran, lalu setelah 30 detik ditambah dengan 10 mL air. Homogenat diaduk dengan batang pengaduk dan dilakukan penyaringan meng-

gunakan kertas Whatman 1 melalui corong Buchner. Filtrat selanjutnya dialirkan/dipindahkan ke labu alas bulat dan dipekatkan dengan rotavapor pada suhu 40 °C. Ekstrak lemak yang pekat ini selanjutnya dipindahkan secara kuantitatif pada vial dan volumenya ditepatkan sampai 10 mL dengan kloroform.

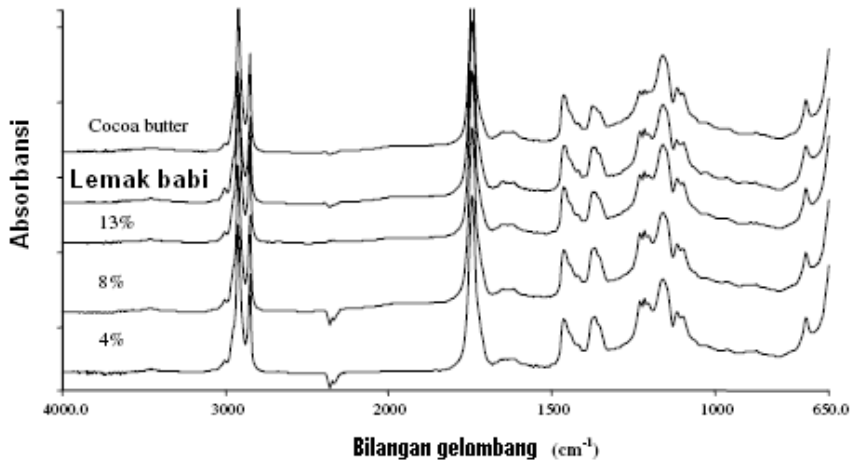
Hasil ekstraksi yang mengandung lemak babi (LB) diletakkan secara langsung pada elemen ATR (Kristal ZnSe) pada suhu ruangan. Spektra FTIR dikumpulkan pada daerah 4000 – 650 cm^{-1} dengan penambahan 32 *scanning* dan resolusi 4 cm^{-1} . Semua spektra dirasioikan/dikurangkan terhadap *background* udara dan dibaca sebagai nilai absorbansi. Gambar 7.6. menunjukkan spektra FTIR LB dan *cocoa butter* pada kisaran frekuensi 4000 – 650 cm^{-1} .



Gambar 7.6. Spektra FTIR lemak babi dan coklat bermentega (*cocoa butter*) [24]. Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Elsevier dengan nomer lisensi 2953430723170.

Perbedaan yang paling besar antara 2 spektra (spektra lemak babi dan spektra *cocoa butter*), yang disebabkan oleh perbedaan intensitas ikatan, dapat diamati dengan mata telanjang pada absorbansi di frekuensi 3006 cm^{-1} (pita b), 1238 cm^{-1} (pita i), 1163 cm^{-1}

(pita j), 1118 cm^{-1} (pita k), 1097 cm^{-1} (pita l), dan 723 cm^{-1} (pita m). Gambar 7.7. merupakan spektra FTIR lemak babi, *cocoa butter*, dan campuran-campurannya.

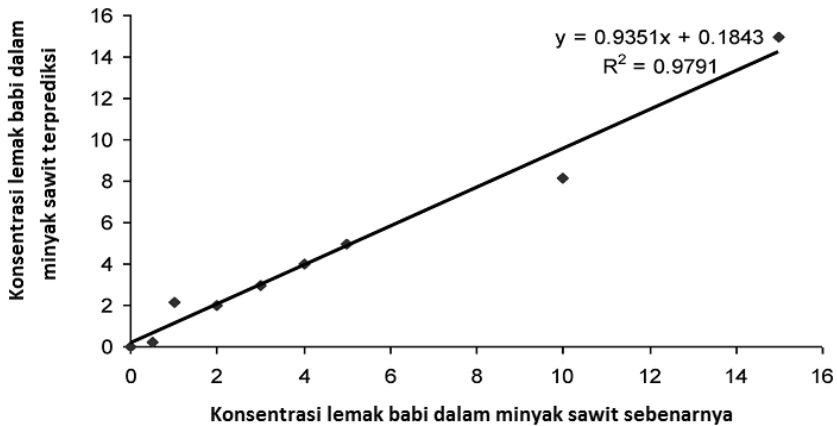


Gambar 7.7. Spektra FTIR lemak babi dan coklat bermentega (*cocoa butter*) serta campuran-campurannya. Angka 4 % berarti menunjukkan bahwa kandungan lemak babi dalam coklat sebesar 4 % b/b [24]. Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Elsevier dengan nomer lisensi 2953430723170.

Che Man dkk. [47] juga menggunakan spektroskopi FTIR yang dihubungkan dengan kemometrika analisis diskriminan untuk mengelompokkan lemak babi, lemak hewani dan lemak nabati serta produk makanan biskuit dengan menggunakan gabungan bilangan gelombang $3,050\text{--}2,800$, $1,800\text{--}1,600$, dan $1,500\text{--}650\text{ cm}^{-1}$. Peneliti ini menyatakan bahwa analisis diskriminan merupakan salah satu cara yang efektif untuk *screening* produk halal dengan tujuan untuk autentikasi.

Spektroskopi inframerah dengan menggunakan penanganan sampel ATR digunakan untuk mendeteksi adanya lemak babi dalam kentang yang digoreng dengan minyak sawit yang dicampur dengan lemak babi. Untuk analisis kuantitatif lemak babi dilakukan pada

bilangan gelombang 3100 – 1050 cm^{-1} . Model kalibrasi untuk menghubungkan antara konsentrasi lemak babi dengan lemak babi terprediksi dengan spektroskopi FTIR adalah *partial least square* (PLS). Nilai R^2 yang diperoleh dalam hubungan ini adalah 0,9791, yang menunjukkan perbedaan antara konsentrasi sebenarnya dengan konsentrasi terhitung (konsentrasi terprediksi) yang dihasilkan dari model adalah sangat kecil. Gambar 7.8. menunjukkan plot kalibrasi untuk menyatakan hubungan antara konsentrasi sebenarnya *vs* konsentrasi lemak babi terprediksi. Batas deteksi model adalah sekecil 0,5% lemak babi.

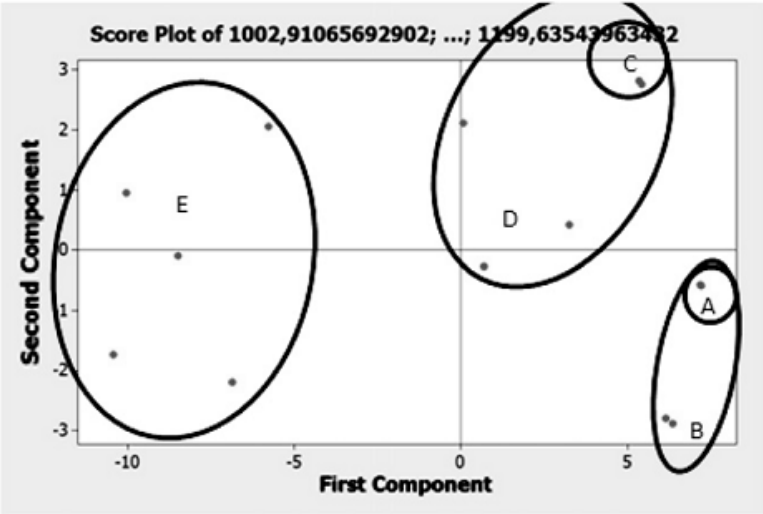


Gambar 7.8. Plot kalibrasi untuk menyatakan hubungan antara konsentrasi sebenarnya lemak babi *vs* konsentrasi lemak babi terprediksi dengan spektroskopi FTIR [36]. Diambil atas izin penerbit.

Baru-baru ini, sekelompok peneliti juga telah melakukan analisis lemak babi dalam kuah bakso yang diekstraksi dengan heksana [40]. Sebanyak 100 mL kuah bakso diambil, ditambah dengan 100 mL heksana lalu dilakukan ekstraksi cair-cair dalam corong pisah. Campuran digojog dan fase heksana yang mengandung lemak diambil. Fase air selanjutnya diekstraksi lebih lanjut dengan 50 mL heksana. Fase heksana dikumpulkan dan diuapkan dengan *vaccum rotary evaporator* suhu 60°C , dan adanya residu dalam fase heksana

ini dihilangkan dengan penambahan natrium sulfat anhidrat. Fase heksana bebas air dipindai dengan spektrofotometer FTIR.

Kuah bakso dengan lemak babi atau lemak sapi dikelompokkan dengan menggunakan kemometrika principle component analysis (PCA). Bilangan gelombang untuk PCA juga dioptimasi dan akhirnya bilangan gelombang 1200 – 1000 cm^{-1} dipilih karena kemampuannya untuk memberikan pemisahan yang baik antar sampel yang dievaluasi (Gambar 7.9). Gambar ini menunjukkan score plot PCA lemak babi dan lemak sapi dalam kuah bakso yang menggambarkan proyeksi sampel yang diejawantahkan dengan nilai komponen utama pertama (PC1 = *first principle component*) dan nilai komponen utama kedua (PC2 = *second principle component*). Dengan proyeksi ini, lemak babi, lemak sapi dan bakso komersial terpisah dengan baik yang berarti bahwa PCA mampu melakukan pengelompokan diantara ketiganya. Berdasarkan pada profil ini, dapat dinyatakan bahwa sampel-sampel komersial (daerah B = region B) tidak mengandung lemak babi dalam produk (bakso).



Gambar 7.9. Score plot komponen utama pertama (PC1) dan komponen utama kedua (PC2) lemak babi (A), lemak sapi (C) dan sampel-sampel bakso komersial [40]. Diambil dengan izin dari penerbit.

Selain dalam sistem makanan, lemak babi dapat digunakan sebagai salah satu komponen yang digunakan dalam sediaan farmasetik, seperti dalam kosmetika krim atau *lotion*. Spektroskopi infra-merah digabungkan dengan kemometrika merupakan teknik analisis yang *powerful* untuk kontrol kualitas sediaan farmasetik. Lukitarningsih dkk. [33] telah menggunakan spektroskopi FTIR untuk analisis lemak babi dalam campuran dengan minyak sawit dalam sediaan *lotion*. Formula *lotion* yang dibuat mengandung fase minyak berupa minyak (10% b/b), asam stearat (3% b/b), setil alkohol (0,5% b/b), cera flava (0,5% b/b), parafin cair (0,1% b/b), propil paraben (0,2% b/b), BHT (0,2% b/b), lanolin (0,2% b/b), dan dimetikon (0,2% b/b); dan fase air berupa akuades (78,8 % b/b), Na₂EDTA (1 % b/b), gliserin (2,5% b/b), parfum (1% b/b), dan TEA (trietanolamin) (1,8% b/b). Minyak yang digunakan merupakan campuran lemak babi dan minyak kelapa sawit. Setiap bahan ditimbang secara tepat. Seluruh bahan yang tergolong dalam fase minyak dicampur lalu dipanaskan di atas *hot plate* hingga suhu 75°C, sedangkan seluruh bahan dalam fase air dipanaskan hingga suhu 60°C kecuali TEA dan parfum. Fase air dituangkan pada fase minyak dan dicampur tanpa pemanasan, hingga homogen menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya, TEA ditambahkan dan diaduk kembali. Setelah mencapai suhu ruang, ditambah parfum lalu diaduk kembali hingga homogen. *Lotion* yang telah dibuat dimasukkan dalam pot salep lalu disimpan di tempat yang kering.

Untuk penyiapan sampel kalibrasi dan validasi: Lemak babi dicampur dengan minyak kelapa sawit dengan variasi konsentrasi sebanyak sembilan jenis. Perbandingan konsentrasi lemak babi-minyak kelapa sawit masing-masing (0 : 100); (12 : 88); (24 : 76); (36 : 54); (48 : 52); (60 : 40); (72 : 28); (88 : 12); dan (100 : 0) (b/b). Untuk penyiapan kurva kalibrasi, lemak babi dan minyak kelapa sawit dicampur sesuai konsentrasi di atas dengan berat total 5 gram. Sedia-

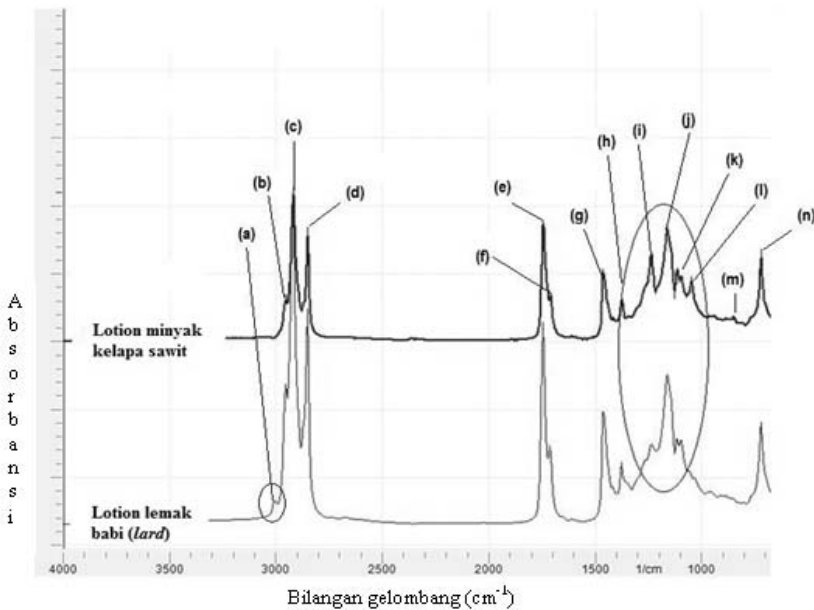
an kosmetika *lotion* yang dibuat, yang mengandung campuran lemak babi dan minyak kelapa sawit dengan konsentrasi yang sama, digunakan untuk sampel prediksi/validasi.

Ekstraksi minyak/lemak dalam sediaan kosmetika Lotion: Sebanyak kurang lebih 5 gram *lotion* ditimbang secara seksama menggunakan neraca analitik dengan kepekaan 0,1 mg lalu dimasukkan dalam Erlenmeyer. Selanjutnya, dilakukan proses hidrolisis asam dengan bantuan panas. Proses hidrolisis dilakukan dengan cara menambahkan 5 mL HCl pekat dan 10 mL akuades ke dalam erlenmeyer, lalu dipanaskan di atas penangas air pada suhu 50°C. Filtrat dimasukkan dalam corong pisah dan diekstraksi dua kali menggunakan heksan, masing-masing dengan volume 25 dan 20 mL. Lapisan lemak diambil lalu dituang ke dalam labu alas bulat 250 mL dan dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 55°C. Ekstrak pekat lemak dimasukkan dalam *microtube* dan disimpan dalam kulkas. Ekstrak pekat lemak dilelehkan dengan pemanasan sebelum dianalisis dengan spektrofotometer *FTIR*.

Spektra IR dibaca dengan spektrofotometer *FTIR* ABB MB 3000 yang dilengkapi dengan lempeng kristal ZnSe, detektor *deuterated triglycine sulfate (DTGS)*, serta pemecah berkas sinar germanium pada substrat KBr. Teknik penanganan sampel dilakukan dengan *attenuated total reflectance (ATR)*. Spektra inframerah baik untuk sampel kalibrasi dan prediksi dibaca dengan perangkat lunak Horizon MB. Minyak ditetaskan pada kristal ZnSe pada suhu terkontrol (20°C). Pengukuran dilakukan pada 32 interferogram dengan interval pembacaan sampel (resolusi) 8 cm⁻¹. Spektrum dasar (*background*) diukur setiap kali sebelum pengukuran sampel, untuk menghindari variasi spektra antarwaktu. Instrumen dijaga pada kelembaban dan aliran arus listrik konstan untuk meminimalkan gangguan uap udara dan perubahan arus listrik. Seluruh spektra direkam dalam bentuk absorbansi pada daerah inframerah tengah

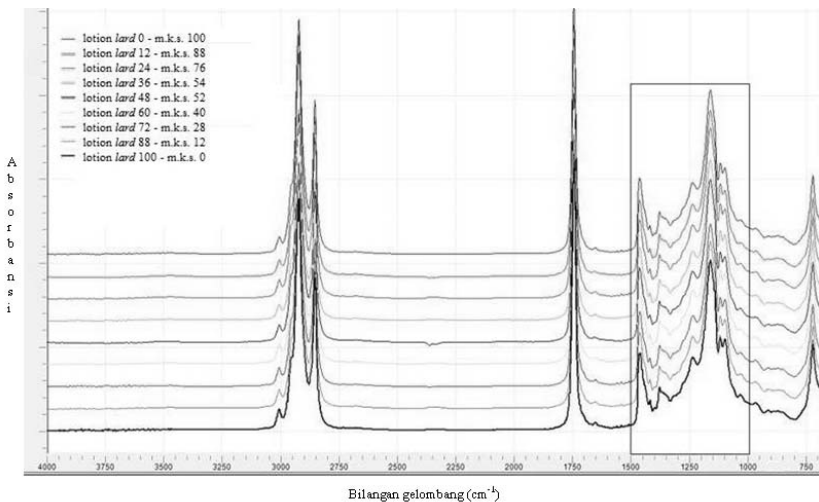
(bilangan gelombang 4000-650 cm^{-1}). Setelah dilakukan *scanning*, lempeng kristal ZnSe dibersihkan dengan heksan dua kali dan aseton sekali dan dikeringkan dengan tisu halus.

Gambar 7.10. menunjukkan spektra FTIR sediaan kosmetika *lotion* yang mengandung lemak babi (*lard*) dan minyak kelapa sawit di daerah inframerah tengah (4000-650 cm^{-1}). Keseluruhan spektra tampak mirip karena semua minyak dan lemak memiliki kandungan triasilgliserol (trigliserida), mono-, dan diasilgliserol, serta beberapa komponen lain. Meskipun demikian, terdapat sedikit perbedaan intensitas pita dan frekuensi pada kedua spektra, jika diamati dengan teliti. Hal ini dikarenakan perbedaan asal dan komposisi minyak yang dianalisis.



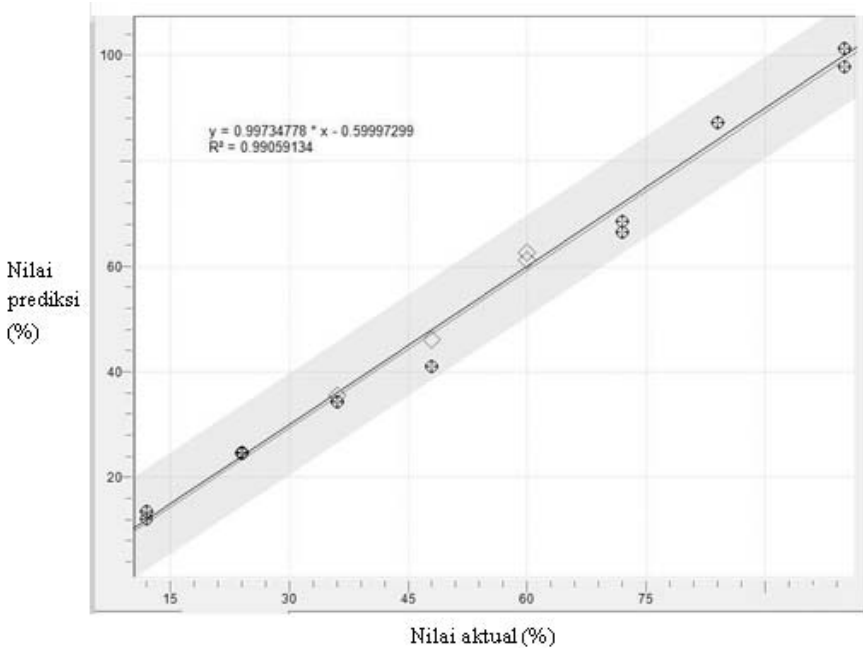
Gambar 7.10. Spektra FTIR sediaan kosmetika *lotion* yang mengandung lemak babi (*lard*) dan minyak kelapa sawit pada daerah inframerah tengah (4000-650 cm^{-1}). Gambar diambil dari skripsi Miftahusa'adah, Farmasi UGM dengan dibimbing oleh Abdul Rohman dan E. Lukitaningsih.

Untuk keperluan kalibrasi, dibuat 9 formula dengan komposisi lemak babi dan minyak kelapa sawit yang berbeda. Gambar 7.11. menunjukkan spektra *FTIR* dari sembilan sediaan kosmetika *lotion* yang diformulasi untuk analisis lemak babi. Sembilan sediaan tersebut mengandung campuran lemak babi dan minyak kelapa sawit dengan variasi konsentrasi dari 0 sampai 100 %. Spektra *FTIR* ini selanjutnya digunakan dalam analisis kuantitatif lemak babi menggunakan kalibrasi multivariat *partial least square (PLS)*.



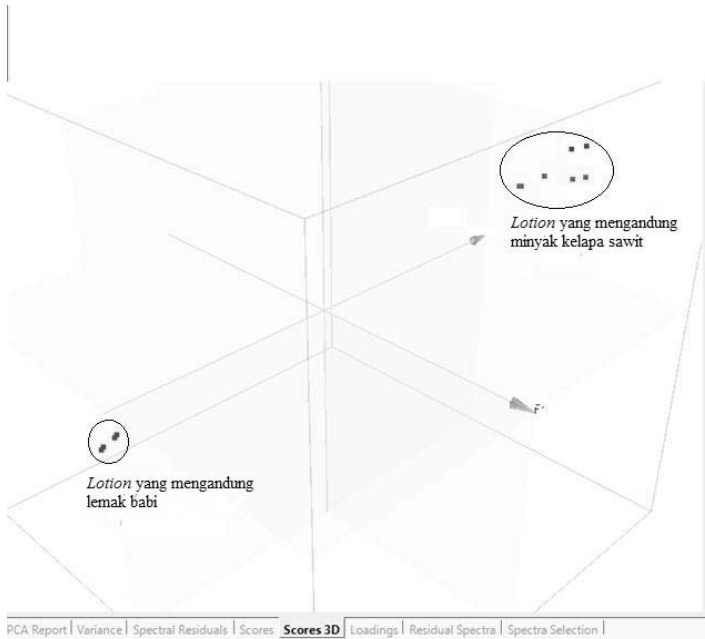
Gambar 7.11. Spektra *FTIR* sembilan sediaan kosmetika *lotion* yang mengandung lemak babi (*lard*) dengan kisaran konsentrasi 0-100% pada daerah inframerah tengah (4000-650 cm^{-1}) (Sumber: Lukitarningsih dkk., 2012) [48]. Diambil dengan izin dari penerbit.

Analisis kuantitatif lemak babi yang dicampur dengan minyak kelapa sawit dalam sediaan kosmetika *lotion* dilakukan dengan kalibrasi multivariat *partial least square (PLS)*. Daerah bilangan gelombang 1200-1000 cm^{-1} dipilih untuk kuantifikasi lemak babi dalam *lotion*. Gambar 7.12. merupakan grafik hubungan antara nilai aktual (sumbu x) dan nilai prediksi *FTIR* (sumbu y) lemak babi dalam campuran dengan minyak kelapa sawit dalam sediaan kosmetika *lotion*, dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,99059.



Gambar 7.12. Hubungan antara nilai aktual (sumbu x) dan nilai prediksi *FTIR* (sumbu y) lemak babi dalam campuran dengan minyak kelapa sawit dalam sediaan kosmetika *lotion* menggunakan model *PLS*, bulat = Kalibrasi, kotak segiempat = Validasi [33].

Bilangan gelombang yang sama ($1200-1000 \text{ cm}^{-1}$) juga dipilih untuk pengelompokkan *lotion* yang mengandung lemak babi dan minyak kelapa sawit dengan bantuan kemometrika *principal component analysis* (*PCA*). Gambar 7.13. menunjukkan skor plot *PCA* seluruh sampel *lotion* yang diwakili oleh 3 *komponen utama* atau *principal components*. Dari gambar tersebut, terlihat bahwa kedua kelompok *lotion* terpisah dengan baik pada dua kuadran yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa *PCA* dapat digunakan untuk membedakan *lotion* yang mengandung lemak babi (*lard*) dengan *lotion* yang mengandung minyak kelapa sawit.



Gambar 7.13. Skor Plot PCA untuk klasifikasi sediaan kosmetika lotion yang mengandung lemak babi dan minyak kelapa sawit [33].

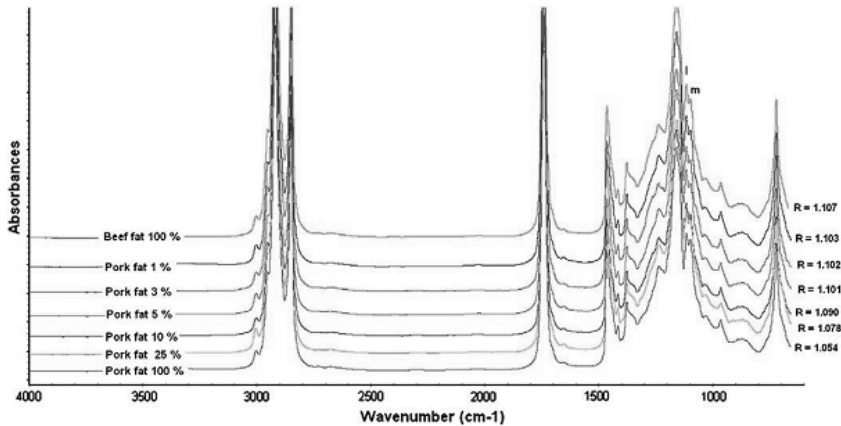
Sebelumnya, Rohman dan Che Man [49] melakukan analisis lemak babi yang tercampur dengan *virgin coconut oil* dalam sediaan krim. Regresi PLS pada bilangan gelombang yang sama ($1200-1000\text{ cm}^{-1}$) digunakan untuk kuantifikasi lemak babi dalam krim, sementara kemometrika analisis diskriminan digunakan untuk pembe-daan krim kosmetika yang mengandung lemak babi dan minyak sawit dalam formulasinya.

Analisis lemak babi pada produk lemak susu juga telah berhasil dilakukan dengan menggunakan spektroskopi FTIR. Lemak susu merupakan lemak yang memiliki kualitas tinggi dan harga yang mahal dibandingkan dengan jenis lemak-lemak yang lain. Oleh karena itu, lemak susu banyak dipalsukan dengan lemak-lemak lain yang lebih murah salah satunya adalah lemak babi untuk memper-

oleh keuntungan yang lebih tinggi. Diskriminan analisis pada bilangan gelombang 3098-669 cm^{-1} mampu mengklasifikasikan sampel lemak susu murni dan lemak susu yang dicampur dengan lemak babi. Semua sampel lemak susu yang dicampur dengan lemak babi terpisah secara sempurna dengan sampel lemak susu murni. Analisis dengan kemometrika PLS yang dilakukan pada bilangan gelombang kombinasi 3033-2770 cm^{-1} dan 1510-692 cm^{-1} dengan spektra FTIR normal dapat digunakan untuk memprediksi konsentrasi lemak babi yang dicampur dalam lemak susu. Model PLS memiliki nilai R^2 0,9998 pada model kalibrasi dan 0,9993 pada model validasi dengan nilai RMSEC 0,631 dan nilai RMSEP 1,94. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi spektroskopi FTIR dan kemometrika mampu digunakan untuk analisis lemak babi baik untuk deteksi maupun kuantifikasi di dalam lemak susu sehingga dapat diaplikasikan sebagai metode autentikasi yang cepat pada produk lemak susu [50].

2. Analisis daging babi dengan spektroskopi inframerah

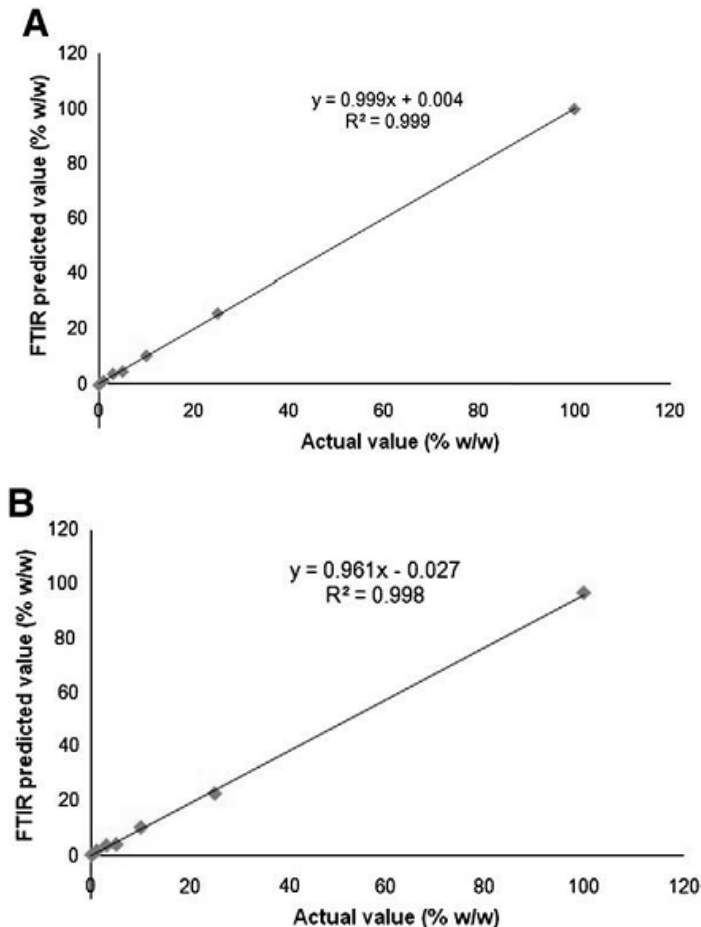
Analisis daging non-halal dengan spektroskopi inframerah dilakukan dengan mengaplikasikan kemometrika, yang umum adalah kemometrika pengelompokkan dan kalibrasi multivariat. Bakso merupakan salah satu makanan favorit di Indonesia. Adanya pemalsuan daging babi pada bakso sapi sering dilaporkan di berbagai media. Karena alasan inilah, Rohman dkk. (2011^b) menggunakan spektroskopi FTIR untuk analisis bakso daging babi. Untuk analisis kuantitatif, regresi PLS pada frekuensi 1200 - 1000 cm^{-1} digunakan untuk membuat hubungan antara kandungan lemak babi terhitung (y) dengan nilai lemak babi sebenarnya (x) dalam bakso sapi. Bilangan gelombang ini dipilih karena ada perbedaan nyata antar keduanya (lemak dari bakso sapi dan bakso babi), terutama di daerah bilangan gelombang 1117 cm^{-1} (l) dan 1098 cm^{-1} (m). Rasio intensitas keduanya ditunjukkan oleh Gambar 7.14.



Gambar 7.14. Spektra FTIR lemak sapi (*beef fat*) dan lemak babi (*pork fat*) serta campuran keduanya yang diperoleh dari hasil ekstraksi bakso, yang menunjukkan perubahan nilai-nilai rasio intensitas di bilangan gelombang 1117 cm^{-1} (l) dan 1098 cm^{-1} (m) [31]. Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Elsevier.

Sampel bakso dibuat di laboratorium dengan mengganti daging sapi dengan daging babi pada kisaran konsentrasi 1 – 25 % b/b. Untuk memperoleh lemaknya (lemak sapi dan lemak babi) dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan Soxhlet dengan pelarut peng-ekstraksinya adalah heksan. Ekstrak heksan selanjutnya diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 60 oC dan lemak/minyak yang diperoleh selanjutnya dibaca spektra FTIR-nya menggunakan teknik pembacaan sampel secara *attenuated total reflectance* (ATR).

Persamaan yang diperoleh adalah $y = 0,999x + 0,004$ dengan nilai R^2 0,999. Model kalibrasi PLS selanjutnya divalidasi silang dengan teknik “*leave-one-out*”. Kurva model kalibrasi dan validasi yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sebenarnya lemak babi (*actual value*) dalam sumbu $-x$ dengan nilai terprediksi (*predicted value*) dalam sumbu $-y$ ditunjukkan oleh Gambar 7.15.



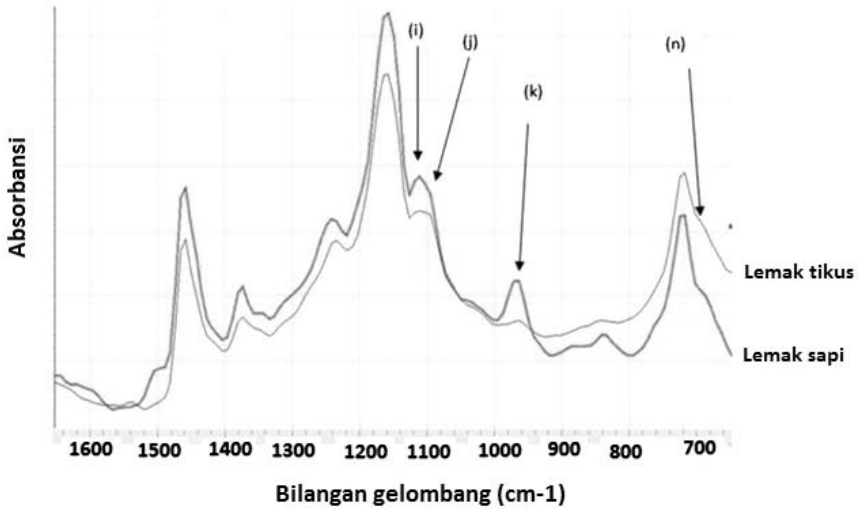
Gambar 7.15. Hubungan antara konsentrasi sebenarnya lemak babi (*actual value*) dengan nilai terprediksi (*predicted value*) dengan model kalibrasi PLS pada bilangan gelombang 1200 – 1000 cm^{-1} . (A) = kalibrasi; (B) = validasi [31]. Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Elsevier dengan nomer lisensi 2953431349499.

Analisis lemak babi dalam kuah bakso juga telah sukses di analisis dengan spektroskopi inframerah menggunakan kemometrika PLS untuk analisis kuantitatif dan *principal component analysis* (PCA) untuk pengelompokkan. Spektra inframerah di daerah bilangan gelombang 1018-1284 cm^{-1} sukses digunakan untuk kuantifikasi lemak babi dalam kuah bakso. Sementara itu, pengelompokkan

kuah bakso babi dan bakso sapi dilakukan secara sukses di bilangan gelombang 1200 – 1000 cm^{-1} [40].

Xu dkk. [51] telah melakukan pembedaan (diskriminasi) antara sosis cina yang halal dan yang non-halal dengan spektroskopi FTIR dikombinasikan dengan kemometrika. Berbagai teknik penanganan spektra seperti *smoothing*, *standard normal variate* (SNV) dioptimasi untuk menghasilkan model analisis yang baik. Spektra transmitans 73 sampel sosis halal dan 78 sampel sosis non-halal diukur pada bilangan gelombang 400 – 4000 cm^{-1} . Penyiapan sampel dilakukan dengan cara menggerus sosis secara halus diikuti dengan penyiapan pelet KBr. Pengambilan sampel dilakukan pada bagian yang berbeda dengan mempertimbangkan heterogenitas bahan (sampel). Selanjutnya, sampel granul secara manual digerus sampai dihasilkan partikel-partikel halus dengan KBr dalam mortar. Sebanyak 25 mg (1: 40 b/b) tiap sampel dicampur dengan 975 mg KBr (39: 40 b/b) sampai dihasilkan pelet KBr.

Bakso sapi tidak hanya dicampur dengan daging babi untuk mengurangi biaya produksi. Para pedagang nakal bahkan tega mencampur daging sapi dengan daging tikus dalam bakso sapi untuk memperoleh keuntungan ekonomi, sebagaimana pernah diberitakan oleh media massa. Hal ini mendorong sekelompok peneliti [37] untuk mengembangkan metode analisis dengan spektroskopi FTIR yang dikombinasikan dengan kemometrika untuk mendeteksi dan menentukan kandungan daging tikus dalam bakso sapi. Kuantifikasi daging tikus dilakukan dengan bantuan kalibrasi PLS, sementara pengelompokkan daging sapi dan daging tikus dengan PCA telah sukses dilakukan pada kisaran bilangan gelombang 1000 – 750 cm^{-1} . Perbedaan spektra lemak sapi dan lemak tikus yang diekstraksi dari bakso yang berasal dari daging tikus sebagaimana dalam Gambar 7.16.



Gambar 7.16. Perbedaan spektra lemak sapi dan lemak tikus yang diekstraksi dari bakso yang berasal dari daging tikus, terutama di daerah bilangan gelombang 1000 – 750 cm^{-1} [37]. Diambil dengan izin penerbit.

Selain bakso sapi, sosis sapi juga rentan dicampur dengan daging non-halal seperti babi untuk mendapatkan keuntungan lebih tinggi. Secara visual dengan mata, tentunya akan sulit untuk dideteksi ketika sudah dicampur dan diproses menjadi sosis. Metode spektroskopi FTIR yang dikombinasikan dengan kemometrika PCA dan PLS telah berhasil dikembangkan untuk mendeteksi daging babi di dalam sosis sapi melalui pengukuran lemaknya. Lemak pada sosis diekstraksi dengan menggunakan metode Soxhlet pada suhu 70°C selama 6 jam menggunakan pelarut n-heksana. Lemak hasil ekstraksi kemudian diukur dengan spektrofotometer FTIR. Analisis multivariat kemometrika dilakukan untuk PCA dan PLS pada rentang bilangan gelombang 1200-1000 cm^{-1} . PCA mampu digunakan untuk mengelompokkan sampel sosis yang dibuat dari 100% daging sapi dan sosis dari 100% daging babi. Sedangkan PLS mampu menghasilkan model kalibrasi yang bagus untuk memprediksi konsentrasi lemak babi di dalam sosis sapi. Hasil PLS diperoleh nilai R^2

0,985 dan RMSEC 2,094% dengan persamaan regresi linear $y = 0,921x + 4,623$. Hasil validasi model kalibrasi diperoleh nilai RMSEP sebesar 4,77% dan nilai RMSECV sebesar 5,12% [17].

Daging babi hutan atau biasa dikenal dengan daging celeng juga sering dicampurkan dalam produk makanan berbahan dasar daging termasuk sosis oleh produsen nakal yang ingin memperoleh keuntungan tinggi. Analisis daging celeng di dalam sosis telah berhasil dilakukan dengan menggunakan metode spektroskopi FTIR yang dikombinasikan dengan kemometrika PCA dan PLS. Analisis dilakukan dengan mengekstraksi lemak pada sosis murni daging sapi dan sosis yang dicampur dengan daging celeng [52]. Konsentrasi daging celeng yang digunakan dalam pembuatan sosis bervariasi yaitu 10%, 25%, 35%, 50%, 65%, 75%, dan 100%. Kemometrika PCA mampu mengklasifikasikan sampel sosis daging sapi murni dan sampel sosis daging sapi yang dicampur dengan daging celeng. Sementara itu, kemometrika PLS pada bilangan gelombang 1250-900 cm^{-1} mampu menghasilkan model kalibrasi untuk memprediksi konsentrasi daging celeng dalam sosis sapi dengan persamaan $y = 0,994x + 0,334$. Model kalibrasi PLS memiliki nilai R^2 yang tinggi yaitu 0,998 dan memiliki nilai kesalahan yang rendah yang ditunjukkan dengan nilai RMSEC (1,22%) dan nilai RMSEP (0,11%). Hasil ini menunjukkan bahwa spektroskopi FTIR yang dikombinasikan dengan kemometrika dapat digunakan untuk deteksi dan kuantifikasi daging celeng di dalam sosis sapi.

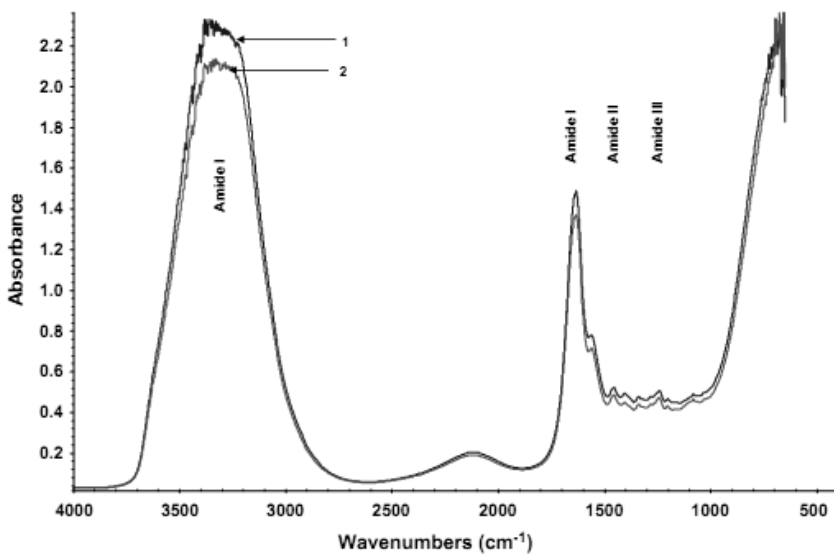
Selain daging babi, daging tikus juga umum digunakan sebagai pemalsu pada produk makanan seperti sosis. Deteksi pemalsuan dilakukan dengan menganalisis komponen lemaknya. Ekstraksi lemak pada sampel sosis dilakukan dengan tiga metode, yaitu Bligh and Dyer, Folch, dan Soxhlet. Hasil ekstraksi lemak kemudian diukur dengan spektroskopi FTIR pada bilangan gelombang 4000-650 cm^{-1} . Analisis PCA pada bilangan gelombang 1800-750 cm^{-1}

mampu mengklasifikasikan lemak sapi dan lemak tikus yang diekstraksi dengan tiga macam metode. Analisis dengan kemometrika PLS mampu digunakan untuk memprediksi konsentrasi daging tikus di dalam sosis sapi yang dinyatakan melalui pengukuran lemaknya. Nilai R^2 dan RMSEC yang dihasilkan pada model kalibrasi PLS adalah 0,945 dan 2,73% pada metode Bligh and Dyer; 0,991 dan 1,73% pada metode Folch; dan 0,992 dan 1,69% pada metode Soxhlet. Hasil ini menunjukkan bahwa metode spektroskopi FTIR dan kemometrika mampu digunakan untuk menganalisis daging tikus di dalam sosis sapi [38].

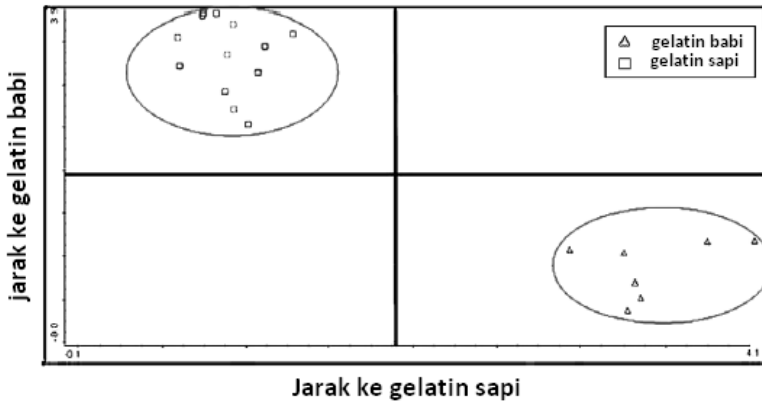
Spektroskopi FTIR dan kemometrika mampu digunakan untuk identifikasi pemalsuan pada daging sapi dan daging domba dengan daging babi. Sampel daging dipreparasi dalam bentuk serbuk kemudian dilakukan pengukuran dengan spektroskopi FTIR metode KBr dengan rasio sampel: KBr 1:100 (b/b). Spektra diukur pada bilangan gelombang 4000-450 cm^{-1} dengan resolusi 0,4 cm^{-1} . Spektrum outlier dihilangkan dengan metode Mahalanobis distance. Sebelum dilakukan analisis, data diproses dengan *multiplicative scatter correction* (MSC) dan *standard normal variate* (SNV). Hasil analisis pada spektra FTIR menunjukkan terdapat perbedaan puncak pada bilangan gelombang 2925 cm^{-1} , 1464 cm^{-1} dan 1173 cm^{-1} . Klasifikasi sampel dilakukan menggunakan kemometrika PLS-DA dan SVM. Hasil PLS-DA diperoleh nilai RMSEC 0,06 dan RMSECV 0,08 dengan nilai R^2 0,99. Model PLS-DA mampu digunakan untuk memprediksi sampel daging sapi, daging domba, dan daging babi dengan akurasi 100%. Sementara hasil analisis dengan SVM diperoleh nilai R^2 0,97 dengan nilai RMSEC 0,148. Model SVM juga mampu digunakan untuk memprediksi sampel dengan akurasi 100%. Hal ini menunjukkan bahwa kemometrika PLS-DA dan SVM dapat digunakan untuk identifikasi pemalsuan pada daging sapi dan daging domba dengan daging babi, dengan tingkat akurasi tinggi.

3. Analisis gelatin babi

Gelatin merupakan salah satu komponen yang banyak digunakan dalam sediaan makanan dan farmasi karena sifat-sifatnya seperti sifat gel-nya [53]. Gelatin kebanyakan diperoleh dari kulit atau tulang sapi atau babi, karenanya identifikasi adanya gelatin babi mutlak diperlukan untuk menjadi kehalalan suatu produk [54]. Hashim dkk. [28] juga memanfaatkan spektroskopi FTIR digabungkan dengan PCA untuk mengelompokkan dan untuk membedakan gelatin yang berasal dari babi dan sapi. Kisaran daerah frekuensi 1660–1200 dan 3290–3280 cm^{-1} yang bersesuaian dengan vibrasi ikatan amida digunakan sebagai model kalibrasi (Gambar 7.17). Plot Cooman's menunjukkan adanya pemisahan yang nyata antara gelatin yang berasal dari babi dan sapi (Gambar 7.18).



Gambar 7.17. Spektra FTIR gelatin sapi (1) dan gelatin babi (2) [28]. Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Elsevier dengan nomer lisensi 2953440387357.



Gambar 7.18. *Plot Coomans* untuk 2 kelompok gelatin: babi dan sapi [28]. Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Elsevier dengan nomer lisensi 2953440387357.

FTIR menawarkan suatu teknik analisis turunan babi yang cepat dan bersifat non destruktif. Meskipun demikian, FTIR memiliki suatu kelemahan yakni analisis dengan spektroskopi FTIR pada suatu formulasi hanya cocok pada formulasi tersebut. Jika metode yang dikembangkan digunakan untuk formulasi yang lain, maka kurang sesuai karena FTIR merupakan suatu teknik analisis sidik jari yang mana tidak ada 2 senyawa atau 2 formulasi yang berbeda mempunyai spektra FTIR yang sama.

Spektroskopi FTIR juga telah berhasil digunakan untuk klasifikasi dan diskriminasi gelatin dari berbagai sumber yaitu gelatin sapi, gelatin babi, dan gelatin ikan [55]. Sampel gelatin dengan berbagai konsentrasi (4% b/v sampai dengan 20% b/v) diekstraksi dengan *deionized water* menggunakan *ultrasonic waterbath* pada suhu 45°C selama 15 menit. Sampel diukur dengan teknik *attenuated total reflectance* (ATR) pada bilangan gelombang 4000-600 cm^{-1} dengan resolusi 4 cm^{-1} dan jumlah scan 16. Kemometrika PCA dan HCA digunakan untuk klasifikasi dan diskriminasi sampel gelatin babi, gelatin sapi, dan gelatin ikan. Spektra Amida I (1700-1600 cm^{-1}) dan Amida II (1565-1520 cm^{-1}) dapat diamati pada spektra FTIR

gelatin. Gugus amida ini penting dalam pembedaan gelatin sapi, gelatin babi, dan gelatin ikan sehingga digunakan sebagai variabel dalam analisis kemometrika. Kemometrika HCA dilakukan dengan menggunakan bilangan gelombang 1722-1487 cm^{-1} dengan menggunakan spektra derivatisasi pertama. Spektra dilakukan *pre-processing* data dengan *smoothing* dan normalisasi vektor. Hasil analisis menunjukkan bahwa gelatin sapi, gelatin babi, dan gelatin ikan muncul pada kluster yang terpisah dan tidak terdapat misklasifikasi dalam pengklusteran. Analisis kemudian dilanjutkan dengan PCA dengan menggunakan kondisi spektra FTIR yang sama. Hasil analisis dengan PCA juga menunjukkan bahwa sampel gelatin sapi, gelatin babi, dan gelatin ikan muncul pada area yang terpisah satu sama lain di dalam *PCA score plot*.

Analisis gelatin sapi, gelatin babi, dan gelatin ikan telah berhasil dikembangkan dengan menggunakan spektroskopi FTIR yang dikombinasikan dengan kemometrika *pattern recognition* (Aloglu dan Harrington, 2018). Sampel gelatin berupa serbuk kristalin langsung diukur dengan spektroskopi FTIR-ATR pada bilangan gelombang 4000-650 cm^{-1} dengan resolusi 4 cm^{-1} dan jumlah scan 16. Kemometrika *pattern recognition* yang digunakan terdiri atas beberapa jenis, yaitu *fuzzy rule-building expert system* (FuRES), *support vector machine classification trees* (SVMTreeG and SVMTreeH), dan *super partial least-squares discriminant analysis* (sPLS-DA). Sebelum dilakukan analisis *pattern recognition*, dilakukan *data pre-processing* dengan menggunakan *standard normal variate* (SNV) dan *principal components-orthogonal signal correction* (PC-OSC). Analisis kemometrika dilakukan pada empat macam range bilangan gelombang, yaitu full spektra (4000–650 cm^{-1}), area fingerprint (1731–650 cm^{-1}), *specified spectra* (4000–800 cm^{-1}), dan *narrow fingerprint region* (1731–800 cm^{-1}). Kemometrika *pattern recognition* FuRES, SVMTreeG, dan SVMTreeH berhasil digunakan untuk mengklasifikasikan gelatin

sapi, gelatin babi, dan gelatin ikan. Hasil klasifikasi paling bagus diperoleh dari penggunaan *narrow fingerprint region* dengan treatment SNV and PC-OSC pada $97.4 \pm 1.6\%$ untuk kemometrika FuRES, $100 \pm 0\%$ untuk kemometrika sPLS-DA, dan $99.3 \pm 0.5\%$ untuk kemometrika SVMTreeG dan SVMTreeH. Hasil ini menunjukkan bahwa spektroskopi FTIR-ATR yang dikombinasikan dengan kemometrika *pattern recognition* merupakan metode analisis yang potensial untuk mengklasifikasikan gelatin sapi, gelatin babi, dan gelatin ikan.

Deteksi gelatin babi di dalam permen lunak jelly telah berhasil dikembangkan dengan metode spektroskopi FTIR yang dikombinasikan dengan kemometrika. Umumnya, jenis gelatin yang digunakan pada produk permen *gummy* adalah gelatin sapi dan gelatin babi. Oleh karena karakteristik fisika kimia dari gelatin babi yang bagus, kompatibel dan dapat diaplikasikan dalam berbagai produk, maka sangat berpotensi untuk digunakan dalam produk permen jelly. Sebagai model kalibrasi, dibuat sampel permen jelly dengan komposisi gelatin 10%, sirup glukosa 20%, gula 40%, asam sitrat 0,5%, perasa 0,1%, dan pewarna 0,01% dengan bobot total 3 gram. Sampel permen jelly kemudian dianalisis dengan spektrofotometer FTIR. Analisis dilakukan dengan kemometrika LDA, PLS, SVM, dan SIMCA. Kemometrika LDA, SVM, dan SIMCA berhasil digunakan untuk mengklasifikasi sampel permen jelly murni (hanya mengandung gelatin sapi) dan sampel permen jelly campuran (mengandung gelatin sapi dan gelatin babi). Hasil analisis klasifikasi divalidasi dengan Xematest pork. Diperoleh kesamaan hasil antara prediksi dengan LDA, SVM, dan SIMCA sehingga mengindikasikan bahwa metode tersebut dapat memprediksi dengan memberikan hasil yang valid dan terpercaya. Sementara itu, analisis kuantitatif dengan PLS mampu memprediksi konsentrasi gelatin babi di dalam sampel permen jelly pada berbagai konsentrasi. Model PLS yang diperoleh memberikan nilai R^2 yang tinggi dan nilai RMSEC dan RMSEP yang ren-

dah sehingga dapat digunakan untuk memprediksi konsentrasi dengan akurasi yang tinggi dan kesalahan yang rendah.

Spektroskopi FTIR-ATR juga telah berhasil digunakan untuk analisis jenis gelatin yang digunakan pada permen *gummy*. Sampel permen dianalisis secara langsung tanpa melalui tahapan preparasi dengan menggunakan spektrofotometer FTIR dengan teknik pengukuran sampel ATR pada bilangan gelombang 4000-650 cm^{-1} dengan resolusi 8 cm^{-1} . Analisis kemometrika yang digunakan adalah kemometrika HCA, PCA, dan PLS-DA yang dilakukan pada bilangan gelombang 1724-1528 cm^{-1} . Untuk analisis HCA digunakan spektra FTIR derivatisasi pertama dengan 25 *smoothing points* sementara untuk PCA juga menggunakan spektra FTIR derivatisasi pertama dengan normalisasi vektor. Hasil analisis HCA diperoleh dua klaster yaitu klaster gelatin babi dan klaster gelatin sapi. Terlebih, hasil analisis dengan kemometrika PCA juga diperoleh dua kelompok sampel yang terpisah secara sempurna yaitu gelatin sapi dan gelatin babi. Hasil analisis dengan kemometrika *supervised pattern recognition* yaitu PLS-DA menunjukkan bahwa sampel terklasifikasi dengan sempurna antara permen gummy yang mengandung gelatin sapi dan permen gummy yang mengandung gelatin babi. Semua sampel dapat diklasifikasikan 100% pada sampel kalibrasi dan sampel validasi dengan tidak adanya error. Semua sampel yang mengandung gelatin babi teridentifikasi sebagai gelatin babi dan semua sampel yang mengandung gelatin sapi teridentifikasi sebagai gelatin sapi. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa spektroskopi FTIR yang dikombinasikan dengan kemometrika HCA, PCA, dan PLS-DA mampu digunakan untuk mendeteksi gelatin pada sampel permen gummy [56].

Analisis dengan spektroskopi FTIR juga telah dikembangkan pada sampel-sampel dental. Terdapat beberapa sampel dental yang menggunakan gelatin sebagai salah satu komponen bahan dasar

penyusunnya. Adanya gelatin di dalam sampel dental menyebabkan perlu diwaspadai jenis dan sumber gelatin tersebut, misalnya sapi, babi, atau ikan. Irfanita dkk. (2017) melakukan analisis gelatin terhadap 42 sampel dental material. Sampel tersebut diukur dan dibandingkan dengan standar gelatin sapi dan gelatin babi. Dari 42 sampel, diperoleh hasil bahwa 9 sampel dental material mengandung bahan gelatin. Akan tetapi, belum dikonfirmasi apakah gelatin tersebut berasal dari gelatin sapi atau gelatin babi.

Studi lain pada sampel dental material dengan menggunakan spektroskopi FTIR yang dikombinasikan dengan kemometrika PCA dan SIMCA (*soft independent modelling of class analogy*) mampu digunakan untuk membedakan dan mengklasifikasi gelatin yang terkandung di dalam sampel-sampel dental. Sebanyak 49 sampel dental digunakan untuk analisis dan dari sejumlah 49 sampel dental yang diidentifikasi dan dianalisis tersebut, terdapat 4 sampel yang terdeteksi mengandung gelatin. Dari 4 sampel tersebut, satu di antaranya diketahui merupakan gelatin babi. Hasil ini menunjukkan bahwa spektroskopi FTIR dan kemometrika analisis multivariat memiliki aplikasi yang sangat luas di dalam analisis farmasi dan makanan, termasuk untuk diaplikasikan sebagai metode autentikasi cepat untuk pemalsuan berbagai macam produk [57].

Referensi

1. Rohman, A.; Windarsih, A. The application of molecular spectroscopy in combination with chemometrics for halal authentication analysis: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, *21*, 1–18, doi:10.3390/ijms21145155.
2. Jamwal, R.; Amit; Kumari, S.; Sharma, S.; Kelly, S.; Cannavan, A.; Singh, D.K. Recent trends in the use of FTIR spectroscopy integrated with chemometrics for the detection of edible oil adulteration. *Vib. Spectrosc.* 2021, *113*, 103222.
3. Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. Pharm.*

- Biomed. Anal.* 2007, 44, 683–700, doi:10.1016/j.jpba.2007.03.023.
4. Rohman, A.; Che Man, Y.B. Analysis of Pig Derivatives for Halal Authentication Studies. *Food Rev. Int.* 2012, 28, doi:10.1080/87559129.2011.595862.
 5. Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S. Introduction to Spectroscopy third edition. *Thomson Learn. Inc.* 2001, 579.
 6. Rohman, A.; Man, Y.B.C. Application of fourier transform infrared spectroscopy for authentication of functional food oils. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2012, 47, doi:10.1080/05704928.2011.619020.
 7. Meenu, M.; Xu, B. Application of vibrational spectroscopy for classification, authentication and quality analysis of mushroom: A concise review. *Food Chem.* 2019, 289, 545–557, doi:10.1016/j.foodchem.2019.03.091.
 8. Stuart, B.H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; 2004; Vol. 8; ISBN 9780470011140.
 9. McVey, C.; Elliott, C.T.; Cannavan, A.; Kelly, S.D.; Petchkongkaew, A.; Haughey, S.A. Portable spectroscopy for high throughput food authenticity screening: Advancements in technology and integration into digital traceability systems. *Trends Food Sci. Technol.* 2021, 118, 777–790, doi:10.1016/j.tifs.2021.11.003.
 10. Sanchez, P.D.C.; Arogancia, H.B.T.; Boyles, K.M.; Pontillo, A.J.B.; Ali, M.M. Emerging nondestructive techniques for the quality and safety evaluation of pork and beef: Recent advances, challenges, and future perspectives. *Appl. Food Res.* 2022, 2, 100147, doi:10.1016/j.afres.2022.100147.
 11. Daniel, C. The role of visible and infrared spectroscopy combined with chemometrics to measure phenolic compounds in grape and wine samples. *Molecules* 2015, 20, 726–737, doi:10.3390/molecules20010726.
 12. Nunes, C.A. Vibrational spectroscopy and chemometrics to assess authenticity, adulteration and intrinsic quality parameters of edible oils and fats. *Food Res. Int.* 2014, 60, 255–261, doi:10.1016/j.foodres.2013.08.041.
 13. Rohman, A.; Ghazali, M.A.B.; Windarsih, A.; Irnawati; Riyanto, S.; Yusof, F.M.; Mustafa, S. Comprehensive Review on Application of FTIR Spectroscopy Coupled with Chemometrics for. *Molecules* 2020, 25, 1–28.
 14. Rohman, A.; Putri, A.R. The chemometrics techniques in

- combination with instrumental analytical methods applied in Halal authentication analysis. *Indones. J. Chem.* 2019, 19, 262–272, doi:10.22146/ijc.28721.
15. Guillén, M.D.; Cabo, N. Characterization of edible oils and lard by fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74, 1281–1286, doi:10.1007/s11746-997-0058-4.
 16. Waskitho, D.; Lukitaningsih, E.; Sudjadi; Rohman, A. Analysis of lard in lipstick formulation using FTIR spectroscopy and multivariate calibration: A comparison of three extraction methods. *J. Oleo Sci.* 2016, 65, 815–824, doi:10.5650/jos.ess15294.
 17. Guntarti, A.; Ahda, M.; Kusbandari, A.; Prihandoko, S. Analysis of lard in sausage using Fourier transform infrared spectrophotometer combined with chemometrics. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2019, 11, S594–S600, doi:10.4103/jpbs.JPBS_209_19.
 18. Dashti, A.; Weesepeol, Y.; Müller-maatsch, J.; Parastar, H. Assessment of meat authenticity using portable Fourier transform infrared spectroscopy combined with multivariate classification techniques. *Microchem. J.* 2022, 181, 107735, doi:10.1016/j.microc.2022.107735.
 19. Che Man, Y.B.; Mirghani, M.E.S. Detection of lard mixed with body fats of chicken, lamb, and cow by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 2001, 78, 753–761, doi:10.1007/s11746-001-0338-4.
 20. Erwanto, Y.; Muttaqien, A.T.; Sugiyono; Sismindari; Rohman, A. Use of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy and Chemometrics for Analysis of Lard Adulteration in “Rambak” Crackers. *Int. J. Food Prop.* 2016, 19, 2718–2725, doi:10.1080/10942912.2016.1143839.
 21. Muttaqien, A.T.; Erwanto, Y.; Rohman, A. Determination of buffalo and pig “Rambak” crackers using ftir spectroscopy and chemometrics. *Asian J. Anim. Sci.* 2016, 10, 49–58, doi:10.3923/ajas.2016.49.58.
 22. Jaswir, I.; Mirghani, M.E.S.; Hassan, T.H.; Said, M.Z.M. Determination of Lard in Mixture of Body Fats of Mutton and Cow by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Oleo Sci.* 2003, 52, 633–638, doi:10.5650/jos.52.633.
 23. Rohman, A.; Che Man, Y.B. FTIR spectroscopy combined with chemometrics for analysis of lard in the mixtures with body

- fats of lamb, cow, and chicken. *Int. Food Res. J.* 2010, 17, 519–526.
24. Che Man, Y.; Syahariza, Z.A.; Mirghani, M.E.S.; Jinap, S.; Bakar, J. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* 2005, 90, 815–819, doi:10.1016/j.foodchem.2004.05.029.
 25. Man, Y.B.C.; Abidin, S.Z.; Rohman, A. Discriminant Analysis of Selected Edible Fats and Oils and Those in Biscuit Formulation Using FTIR Spectroscopy. *Food Anal. Methods* 2011, 4, doi:10.1007/s12161-010-9184-y.
 26. Rohman, A.; Che Man, Y.B. Analysis of cod-liver oil adulteration using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 2009, 86, doi:10.1007/s11746-009-1453-9.
 27. Mansor, T.S.T.; Man, Y.B.C.; Rohman, A. Application of Fast Gas Chromatography and Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Analysis of Lard Adulteration in Virgin Coconut Oil. *Food Anal. Methods* 2011, 4, doi:10.1007/s12161-010-9176-y.
 28. Hashim, D.M.; Man, Y.B.C.; Norakasha, R.; Shuhaimi, M.; Salmah, Y.; Syahariza, Z.A. Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatins. *Food Chem.* 2010, 118, 856–860, doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.049.
 29. Rohman, A.; Che Man, Y.B.; Hashim, P.; Ismail, A. FTIR spectroscopy combined with chemometrics for analysis of lard adulteration in some vegetable oils. *CYTA - J. Food* 2011, 9, doi:10.1080/19476331003774639.
 30. Rohman, A.; Che Man, Y.B.; Sismindari Quantitative analysis of virgin coconut oil in cream cosmetics preparations using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2009, 22.
 31. Rohman, A.; Sismindari; Erwanto, Y.; Che Man, Y.B. Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Meat Sci.* 2011, 88, 91–95, doi:10.1016/j.meatsci.2010.12.007.
 32. Rohman, A.; Himawati, A.; Triyana, K.; Sismindari; Fatimah, S. Identification of pork in beef meatballs using Fourier transform infrared spectrophotometry and real-time polymerase chain reaction. *Int. J. Food Prop.* 2017, 20, 654–661, doi:10.1080/10942912.2016.1174940.

33. Lukitaningsih, E.; Sa'adah, M.; Purwanto; Rohman, A. Quantitative analysis of lard in cosmetic lotion formulation using FTIR spectroscopy and partial least square calibration. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 2012, *89*, 1537–1543, doi:10.1007/s11746-012-2052-8.
34. Kurniawati, E.; Rohman, A.; Triyana, K. Analysis of lard in meatball broth using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Meat Sci.* 2014, *96*, doi:10.1016/j.meatsci.2013.07.003.
35. Rohman, A.; Gupitasari, I.; Purwanto; Triyana, K.; Rosman, A.S.; Ahmad, S.A.S.; Yusof, F.M. Quantification of lard in the mixture with olive oil in cream cosmetics based on FTIR spectra and chemometrics for Halal authentication. *J. Teknol. (Sciences Eng.* 2014, *69*, 113–119, doi:10.11113/jt.v69.2062.
36. Che Man, Y.B.; Marina, A.M.; Rohman, A.; Al-Kahtani, H.A.; Norazura, O. A fourier transform infrared spectroscopy method for analysis of palm oil adulterated with lard in pre-fried french fries. *Int. J. Food Prop.* 2014, *17*, doi:10.1080/10942912.2011.631254.
37. Rahmania, H.; Sudjadi; Rohman, A. The employment of FTIR spectroscopy in combination with chemometrics for analysis of rat meat in meatball formulation. *Meat Sci.* 2015, *100*, 301–305, doi:10.1016/j.meatsci.2014.10.028.
38. Pebriana, R.B.; Rohman, A.; Lukitaningsih, E.; Sudjadi Development of FTIR spectroscopy in combination with chemometrics for analysis of rat meat in beef sausage employing three lipid extraction systems. *Int. J. Food Prop.* 2017, *20*, 1995–2005, doi:10.1080/10942912.2017.1361969.
39. Devi, A.; Jangir, J.; K.A., A.A. Chemical characterization complemented with chemometrics for the botanical origin identification of unifloral and multifloral honeys from India. *Food Res. Int.* 2018, *107*, 216–226, doi:10.1016/j.foodres.2018.02.017.
40. Kurniawati, E.; Rohman, A.; Triyana, K. Analysis of lard in meatball broth using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Meat Sci* 2014, *96*, 94–98, doi:10.1016/j.meatsci.2013.07.003.
41. Rohman, A. Infrared spectroscopy for quantitative analysis and oil parameters of olive oil and virgin coconut oil: A review. *Int. J. Food Prop.* 2017, *20*, 1447–1456, doi:10.1080/10942912.2016.1213742.

42. Lerma-García, M.J.; Ramis-Ramos, G.; Herrero-Martínez, J.M.; Simó-Alfonso, E.F. Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* 2010, *118*, 78–83, doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.092.
43. Che Man, Y.B.; Rohman, A.; Mansor, T.S.T. Differentiation of lard from other edible fats and oils by means of Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 2011, *88*, doi:10.1007/s11746-010-1659-x.
44. Mansor, T.S.T.; Man, Y.B.C.; Shuhaimi, M. Employment of differential scanning calorimetry in detecting lard adulteration in virgin coconut oil. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 2012, *89*, 485–496, doi:10.1007/s11746-011-1936-3.
45. Rohman; Kuwat, T.; Retno, S.; Sismindari; Yuny; Tridjoko Fourier Transform Infrared Spectroscopy applied for rapid analysis of lard in palm oil. *Int. Food Res. J.* 2012, *19*, 1161–1165.
46. Rohman, A.; Che Man, Y.B. The optimization of FTIR spectroscopy combined with partial least square for analysis of animal fats in quaternary mixtures. *Spectroscopy* 2011, *25*, 169–176, doi:10.3233/SPE-2011-0500.
47. Che Man, Y.B.; Z. Abidin, S.; Rohman, A. Discriminant Analysis of Selected Edible Fats and Oils and Those in Biscuit Formulation Using FTIR Spectroscopy. *Food Anal. Methods* 2011, *4*, 404–409, doi:10.1007/s12161-010-9184-y.
48. Lukitaningsih, E.; Sa'adah, M.; Purwanto; Rohman, A. Quantitative analysis of lard in cosmetic lotion formulation using FTIR spectroscopy and partial least square calibration. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 2012, *89*, doi:10.1007/s11746-012-2052-8.
49. Rohman, A.; Che Man, Y. Analysis of lard in cream cosmetics formulations using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Middle-East J. Sci. Res.* 2011, *7*, 726–732.
50. Windarsih, A.; Irnawati; Rohman, A. Application of FTIR - ATR spectroscopy and chemometrics for the detection and quantification of lard oil in bovine milk fat. *Food Res.* 2020, *4*, 1732–1738.
51. Xu, L.; Cai, C.B.; Cui, H.F.; Ye, Z.H.; Yu, X.P. Rapid discrimination of pork in Halal and non-Halal Chinese ham sausages by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics. *Meat Sci.* 2012, *92*, 506–510, doi:10.1016/j.meatsci.2012.05.019.

52. Sari, T.N.I.; Guntarti, A. Wild boar fat analysis in beef sausage using Fourier Transform Infrared method (FTIR) combined with chemometrics. *J. Kedokt. dan Kesehatan Indones.* 2018, 9, 16–23.
53. Rohman, A.; Windarsih, A.; Erwanto, Y.; Zakaria, Z. Review on analytical methods for analysis of porcine gelatine in food and pharmaceutical products for halal authentication. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 101, 122–132, doi:10.1016/j.tifs.2020.05.008.
54. Uddin, S.M.K.; Hossain, M.A.M.; Sagadevan, S.; Al Amin, M.; Johan, M.R. Halal and Kosher gelatin: Applications as well as detection approaches with challenges and prospects. *Food Biosci.* 2021, 44, 101422, doi:10.1016/j.fbio.2021.101422.
55. Cebi, N.; Durak, M.Z.; Toker, O.S.; Sagdic, O.; Arici, M. An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *Food Chem.* 2016, 190, 1109–1115, doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.065.
56. Cebi, N.; Dogan, C.E.; Mese, A.E.; Ozdemir, D.; Arıcı, M.; Sagdic, O. A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for classification of gelatin gummy candies in relation to the gelatin source. *Food Chem.* 2019, 277, 373–381, doi:10.1016/j.foodchem.2018.10.125.
57. Roswim, A.P.; Mustaqimah, D.N. Identification of Gelatin source in Toothpaste products using Combination of Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy and Chemometrics. *Int. J. Halal Res.* 2020, 2, 30–39.

BAB VIII

ANALISIS DERIVAT BABI SECARA KROMATOGRAFI GAS

Abdul Rohman dan Anggita Rosiana Putri²

¹Pusat Unggulan Ipteks Institute of Halal Industry and Systems,
Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

²Departemen Farmasi, Fakultas Kedokteran,
Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur, 65145

A. Pendahuluan

Karena kemampuannya untuk melakukan pemisahan, kromatografi merupakan salah satu metode yang banyak dilaporkan oleh para peneliti analisis kehalalan produk, terutama untuk analisis derivat babi. Kromatografi merupakan suatu metode analisis yang selalu melibatkan fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*) [1]. Kromatografi dapat digunakan untuk melakukan analisis kualitatif (ada tidaknya komponen derivat babi), analisis kuantitatif (berapa kandungan derivat babi dalam sampel yang diselidiki), serta dalam beberapa kasus digunakan untuk tujuan preparatif (penyiapan sampel yang mengandung derivat babi untuk dianalisis lebih lanjut) [2].

Berbagai teknik kromatografi memberikan kemungkinan untuk pemisahan yang cepat dan reliabel (dapat dipercaya) untuk penentuan komponen non-halal seperti turunan babi dalam matriks makanan atau produknya yang sangat kompleks. Karena karakteristik kemampuannya untuk melakukan pemisahan, teknik kromatografi yang dihubungkan dengan kemometrika telah digunakan untuk analisis komponen halal seperti turunan babi dalam bahan makanan dan produk farmasetik. Kromatografi yang sering digunakan untuk analisis komponen non halal adalah kromatografi gas (fase

geraknya berupa gas) dan kromatografi cair (fase gerakanya berupa zat cair) dengan berbagai variannya [3]. Dalam bab ini akan dibahas penggunaan kromatografi gas dan kromatografi cair untuk analisis komponen non-halal.

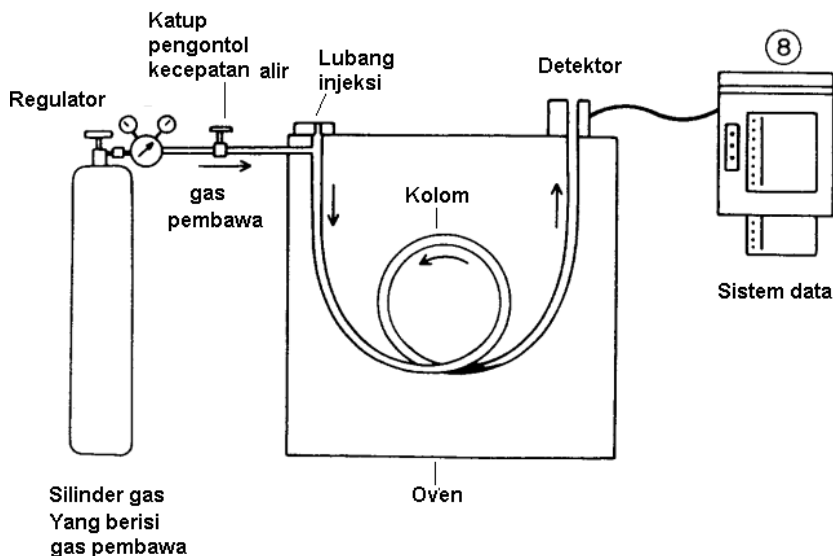
B. Analisis Derivat babi dengan Kromatografi Gas

Kromatografi gas (KG) merupakan teknik pemisahan yang mana solut-solut yang mudah menguap (dan stabil terhadap panas) bermigrasi melalui kolom yang mengandung fase diam dengan suatu kecepatan yang tergantung pada rasio distribusinya. Pada umumnya, solut akan terelusi berdasarkan pada peningkatan titik didihnya, kecuali jika ada interaksi khusus antara solut dengan fase diam. Pemisahan pada kromatografi gas didasarkan pada titik didih suatu senyawa dikurangi dengan semua interaksi yang mungkin terjadi antara solut dengan fase diam. Fase gerak yang berupa gas akan membawa solut dari ujung kolom lalu menghantarkannya ke detektor. Penggunaan suhu yang meningkat (biasanya pada kisaran 50-350°C) bertujuan untuk menjamin bahwa solut akan menguap dan karenanya akan cepat terelusi.

Ada 3 jenis kromatografi gas, yaitu: (1) Kromatografi gas-cair (KGC). Pada KGC ini, fase diam yang digunakan adalah cairan yang diikatkan pada suatu pendukung sehingga solut akan terlarut dalam fase diam. Dengan demikian mekanisme *sorpsi*-nya adalah partisi; (2) Kromatografi gas-padat (KGP). Pada KGP ini, digunakan fase diam padatan (kadang-kadang polimerik). Mekanisme *sorpsi*-nya adalah adsorpsi permukaan; (3) KG kolom kapiler yang mana kolom-kolom dengan tabung terbuka digunakan dengan fase diam padatan atau cairan yang dilapiskan pada dinding tabung kolom sebelah dalam, yang biasanya dirujuk sebagai terlapiskan pada dinding (*wall coated*), berupa lapisan porus (*porous layer*) dan kolom tabung terbuka yang permukaannya dilapisi (*surface coated*).

1. Sistem instrumentasi kromatografi gas

Suatu kromatograf gas tersusun dari berbagai komponen dalam suatu bingkai khusus. Komponen-komponen ini mencakup injektor, kolom, dan detektor, yang dihubungkan dengan suatu oven yang dikontrol secara termostatik yang membuat kolom mampu mencapai suhu tinggi (Gambar 8.1). Fase gerak yang membawa analit menuju kolom merupakan suatu gas dan dirujuk sebagai *gas pembawa*. Aliran gas pembawa, yang dikontrol secara teliti, akan mampu memberikan waktu retensi yang reproduisibel. Selain itu, kromatograf juga dilengkapi dengan komputer yang dilengkapi dengan perangkat pengolah data.



Gambar 8.1. Diagram skematik kromatograf gas [4]

Analisis dengan KG bermula ketika sejumlah kecil sampel dimasukkan, baik sebagai cairan atau gas ke dalam injektor, yang mempunyai fungsi ganda untuk menguapkan sampel dan mencampurkannya dengan aliran gas untuk menuju ke ujung depan kolom. Kolom biasanya merupakan suatu lubang (*bore*) yang sempit yang

panjangnya dapat bervariasi dari 1 – 100 m, tergantung pada jenis dan kandungan fase diam. Kolom berada dalam suatu *oven* yang dikontrol secara termostatik. Pada ujung akhir kolom, fase gerak (gas pembawa) akan melalui suatu detektor dan dideteksi sebagai puncak-puncak kromatogram sebelum sampel keluar menuju atmosfer. Saat ini, beberapa model kromatograf gas dengan ukuran yang kecil memungkinkan digunakannya dalam lapangan [5].

Berbagai detektor telah digunakan untuk analisis komponen lemak babi terutama analisis komposisi asam lemaknya. Detektor yang umum digunakan adalah detektor ionisasi nyala (*flame ionization detector*) atau detektor spektrometer massa yang gabungannya dengan kromatograf gas biasa disebut dengan *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS) [6].

Saat ini, kromatografi gas (KG) telah dihubungkan dengan spektrometer massa (sebagai detektor) yang mana gabungan ini biasa disebut dengan GC-MS yang merupakan singkatan dari *gas chromatography-mass spectrometry*, dan banyak digunakan untuk analisis senyawa volatil dalam lemak babi, termasuk komposisi asam lemak penyusun lemak babi. Pada teknik ini, eluen yang keluar dari kolom GC selanjutnya akan masuk ke MS untuk menghasilkan profil spektrum massa untuk tiap komponen [7]. Teknik ini memberikan keuntungan diperolehnya berat molekul komponen yang keluar. Teknik ini digunakan sangat luas karena mampu menawarkan batas deteksi yang lebih kecil (lebih sensitif). Spektrometer massa jika digunakan sebagai detektor, maka akan mampu memberikan informasi data struktur kimia senyawa yang tidak diketahui. Dengan menggunakan spektrometer massa untuk memonitor ion tunggal atau beberapa ion yang karakteristik dalam analit, maka batas deteksi ion-ion ini akan ditingkatkan [8].

2. Analisis derivat babi dengan kromatografi gas

Kromatografi banyak digunakan untuk analisis derivat babi seperti dalam daging babi atau lemak babi untuk melihat karakteristik tertentu yang terdapat dalam lemak babi dan daging babi [9]. Tabel 8.1 meringkas kromatografi gas untuk analisis lemak babi, baik dalam campuran dengan minyak lain atau dalam sistem makanan. Tiga model kromatografi gas yang umum digunakan untuk analisis lemak babi adalah: (1) analisis dengan kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala (*flame ionization detector*, FID), (2) analisis dengan kromatografi gas-spektrometer massa (GC-MS), dan (3) kromatografi gas dua dimensi yang dikombinasikan dengan TOF-MS (*time of flight mass spectrometer*) [10].

Tabel 8.1. Teknik kromatografi gas untuk analisis turunan babi.

Turunan babi	Produk makanan	Isu	Batas deteksi	Referensi
Lemak babi	Ghee	Deteksi lemak babi dalam ghee lembu dan kerbau	10% lemak sapi, 5% lemak lembu	[11]
Lemak babi	Minyak makan	Pemalsuan berbagai minyak makan dengan lemak babi	2% (b/b) lemak babi	[12]
Daging babi	Daging masak	Identifikasi daging babi	tdl	[2]
Lemak babi	Lemak hewani	Identifikasi lemak babi	tdl	[13]
Lemak babi	Lemak hewani	Identifikasi lemak babi	tdl	[14]
Lemak babi	-	Identifikasi lemak babi	tdl	[15]
Lemak babi	Lemak hewani	Identifikasi lemak babi dari lemak hewani lainnya	tdl	[16]
Lemak babi	Lemak hewani	Identifikasi lemak babi dari lemak hewani lainnya	tdl	[11]

tdl = tidak dilaporkan

Analisis pemalsuan makanan dengan lemak babi tergantung pada identifikasi dan penentuan karakteristik tertentu konstituen-konstituen penyusunnya. Analisis lemak babi dengan KG dilakukan dengan mengamati asam lemaknya yang diderivatisasi sebagai metil esternya. Kromatografi gas-cair telah digunakan untuk deteksi lemak babi yang ditambahkan dalam *ghee* sapi dan *ghee* kerbau menggunakan kolom OV-17 1 % dan detektor ionisasi nyala. Rasio-rasio hidrokarbon total terhadap sterol total dalam bahan yang tidak tersabunkan untuk margarin dan lemak babi adalah yang paling berbeda untuk berbagai macam lemak yang dikaji. Pemalsuan *ghee* kerbau dan *ghee* sapi dengan berbagai macam level lemak babi atau margarin menyebabkan perubahan-perubahan yang bermakna dalam senyawa-senyawa yang tidak tersabunkan [17].

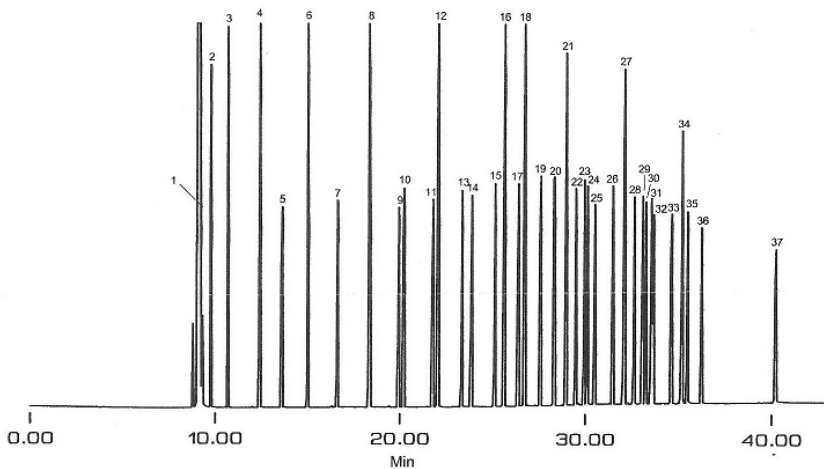
a. Analisis lemak babi dengan GC-FID

Rohman and Che Man (2011) telah melakukan analisis profil asam lemak pada lemak babi dan lemak hewani lainnya yakni lemak sapi, lemak ayam dan lemak domba menggunakan kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala (GC-FID). Salah satu syarat pemisahan campuran dengan kromatografi gas adalah bahwa analit harus mudah menguap. Asam lemak dalam lemak/minyak sukar menguap sehingga perlu diderivatisasi agar dapat dipisahkan secara kromatografi gas [18].

Derivatisasi asam lemak supaya dihasilkan metil ester asam lemak (*fatty acid methyl ester*) dilakukan sebagai berikut: Sebanyak 50 μL minyak/lemak (lemak babi) ditambah dengan 1,0 mL *n*-heksan dan 200 μL larutan NaOCH_3 0,2 N, dan dipanaskan selama 10 menit sambil digojog. Larutan NaOCH_3 0,2 N diperoleh dari pencampuran NaOH padat dalam metanol. Campuran ditambah dengan larutan BF_3 sebanyak 1,5 mL dan dipanaskan selama 10 menit. Campuran ditunggu hingga dingin dan ditambah NaCl jenuh sebanyak 1,5 mL

untuk mengendapkan natrium gliserolat, lalu divorteks selama 10 menit. Supernatan yang mengandung derivat asam lemak metil ester (FAME) diambil dan diinjeksikan ke sistem kromatograf gas. Prosedur kromatografi gas dilakukan dengan cara: Sebanyak 1 μ L supernatan diinjeksikan ke kromatograf gas, dengan kondisi sebagai berikut:

Kolom	kolom kapiler RTX-5 (30 m x 0,25 mm, ketebalan lapisan 0,2 μ m); Restex Corp., Bellefonte PA.
Oven	50 $^{\circ}$ C (ditahan selama 1 menit), lalu ditingkatkan sampai 240 $^{\circ}$ C (8 $^{\circ}$ C/menit), dan akhirnya ditahan pada 240 $^{\circ}$ C selama 5 menit.
Detektor	detektor ionisasi nyala (FID, 200 $^{\circ}$ C)
Gas pembawa	N ₂ , dengan kecepatan alir 6,8 mL/menit.
Injektor	200 $^{\circ}$ C; rasio pemecahan (1:20)



Gambar 8.2. Kromatogram pemisahan standar 37 metil ester asam lemak dengan kondisi: kolom, SPTM-2560 (100 m x 0,25 mm i.d; ketebalan lapisan 0,20 μ m). Suhu oven: 140 $^{\circ}$ C (5 menit), dinaikkan sampai 240 $^{\circ}$ C dengan kecepatan 4 $^{\circ}$ C/menit. Gas pembawa, helium 20 cm/detik; detektor, FID 260 $^{\circ}$ C; injektor 260 $^{\circ}$ C dengan colume injeksi 1 μ L dan nisbah pemecahan injeksi 100: 1 (Sigma, Aldrich, USA).

Identifikasi asam lemak dilakukan dengan membandingkan waktu retensinya dengan asam lemak standar, akan tetapi KG dikombinasikan dengan teknik derivatisasi dan degradasi kimiawi atau digabungkan dengan spectrometer massa dapat berguna sebagai cara karakterisasi yang baik. Beberapa *supplier* (pemasok) seperti Supelco menjual campuran 37 asam lemak dalam bentuk metil ester disertai dengan *certificate of analysis*-nya. Kromatogram ke-37 asam lemak ini bersama-sama dengan urutan asam lemaknya dapat dilihat dalam Gambar 8.2.

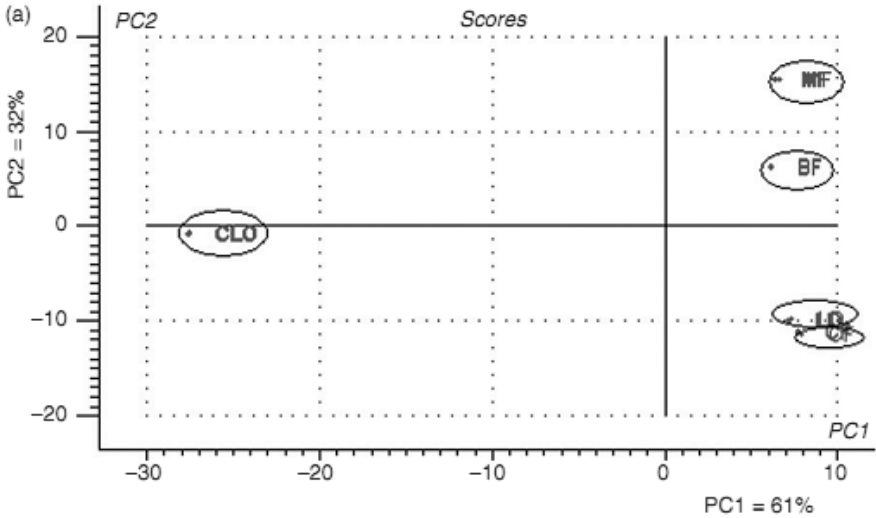
Standar 37 *fatty acid methyl esters* (FAME) digunakan untuk menghitung kandungan FAME berdasarkan pada luas puncak dengan teknik normalisasi internal. Yang perlu diperhatikan ketika kita melakukan analisis asam lemak dengan KG ini adalah bahwa kondisi KG yang digunakan harus mampu memisahkan secara sempurna ke-37 satandar FAME yang kita gunakan, karena identifikasi asam lemak yang terdapat dalam sampel untuk selanjutnya dilakukan perhitungan kuantitatif didasarkan pada perbandingan waktu retensi asam lemak dalam sampel dengan waktu retensi asam lemak standar. Kalau ada satu saja yang tidak terpisah, misalkan dari 37 asam lemak hanya muncul 36 asam lemak, maka akan sangat sulit bagi kita untuk mengidentifikasi asam lemak mana yang tidak terpisah, kecuali jika kita menggunakan detektor spektrometer massa. Tabel 8.2. meringkas profil asam lemak dalam lemak babi, lemak sapi, lemak ayam dan lemak domba.

Tabel 8.2. Komposisi asam lemak dalam lemak babi, lemak domba, lemak sapi dan lemak ayam sebagaimana dilaporkan dalam [18].

Asam lemak	Lemak babi	Lemak domba	Lemak sapi	Lemak ayam
(C10:0)	nd	0,14 ± 0,00	0,06 ± 0,00	nd
(C11:0)	nd	0,14 ± 0,00	0,12 ± 0,00	nd
(C12:0)	nd	0,11 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,02 ± 0,00
(C14:0)	0,11 ± 0,03	2,64 ± 0,02	2,84 ± 0,05	0,86 ± 0,04
(C14:1)	nd	0,40 ± 0,01	0,65 ± 0,02	0,01 ± 0,00
(C15:0)	1,12 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,02 ± 0,00
(C15:1)	0,08 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,17 ± 0,02
(C16:0)	21,33 ± 0,89	21,49 ± 0,98	24,19 ± 0,01	28,27 ± 0,13
(C16:1)	1,65 ± 0,24	1,23 ± 0,15	3,27 ± 0,04	6,10 ± 0,09
(C17:0)	0,46 ± 0,08	2,03 ± 0,03	1,31 ± 0,02	0,02 ± 0,00
(C17:1)	nd	0,62 ± 0,00	0,95 ± 0,01	0,12 ± 0,01
(C18:0)	11,39 ± 0,68	27,84 ± 0,42	16,47 ± 0,36	9,49 ± 0,23
(C18:1n9)	41,01 ± 2,28	30,06 ± 0,36	40,46 ± 0,31	38,33 ± 0,12
(C18:2n6)	17,65 ± 3,33	4,90 ± 0,14	4,44 ± 0,40	14,19 ± 0,13
(C20:0)	0,91 ± 0,03	0,55 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,15 ± 0,02
(C18:3n6)	0,97 ± 0,06	0,37 ± 0,02	0,12 ± 0,11	0,63 ± 0,03
(C20:1)	0,82 ± 0,17	1,47 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,01
(C21:0)	nd	0,28 ± 0,01	nd	0,28 ± 0,02
(C20:2)	0,19 ± 0,05	0,21 ± 0,02	0,12 ± 0,11	0,07 ± 0,00
(C22:0)	0,69 ± 0,28	0,65 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,01
(C20:3n6)	0,63 ± 0,43	0,83 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,00
(C22:1n9)	0,10 ± 0,04	0,17 ± 0,00	0,04 ± 0,02	nd
(C20:4n6)	0,13 ± 0,04	0,04 ± 0,02	nd	nd
(C22:2)	0,10 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	nd
(C24:0)	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,13 ± 0,00	0,02 ± 0,00

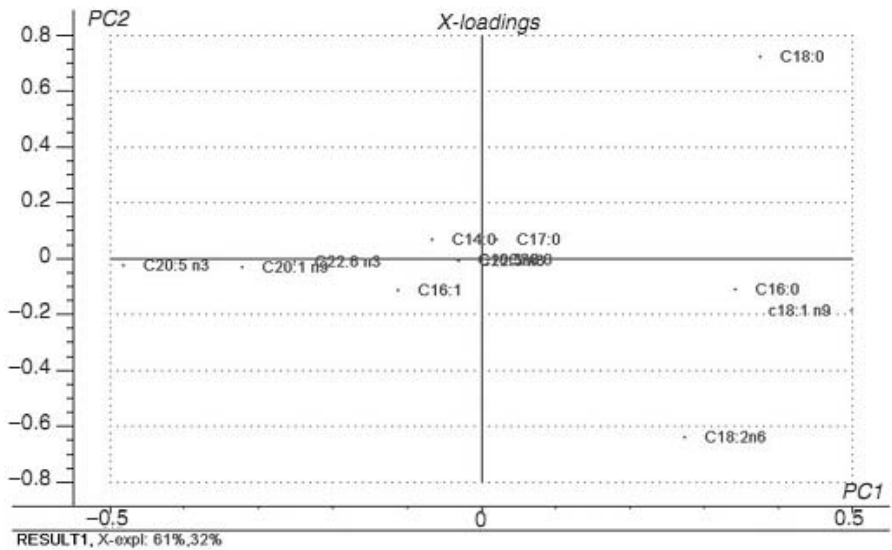
Untuk memudahkan pengelompokkan antara keempat lemak hewani tersebut, digunakan untuk pendekatan kemometrika analisis komponen utama (*principal component analysis*, PCA), menggunakan jenis dan komposisi asam lemak. Gambar 8.3. merupakan *score plot*

PCA untuk pengelompokkan lemak hewani. Nampak bahwa lemak ayam mempunyai profil asam lemak yang hampir sama dengan lemak babi karena profil *score plot* kedua lemak ini berdekatan.



Gambar 8.3. Pengelompokkan lemak hewani yakni lemak babi (LD), lemak ayam (CF), lemak domba (MF) dan lemak sapi (BF) serta minyak ikan cod (CLO). (Sumber: Rohman dan Che Man, 2011b). Gambar diambil atas kebaikan dan izin dari Taylor and Francis.

Untuk mengetahui variabel jenis asam lemak yang mampu membedakan lemak babi dengan lemak ayam dan lemak hewani lainnya dilakukan analisis *loading plot* dan hasilnya sebagaimana dalam Gambar 8.4. Dari Gambar ini, dapat dikatakan bahwa asam palmitat (C16: 0), asam oleat (C18: 1) dan asam linoleat (C18: 2) merupakan variabel yang memberikan kontribusi yang lebih besar terhadap pemisahan lemak babi dan lainnya. Hal ini disebabkan karena pada daerah *loading plot* ini bersesuaian dengan *score plot* lemak babi, dan juga, kedua variabel asam lemak ini mempunyai jarak yang jauh dari titik asal *loading plot* (titik nol).

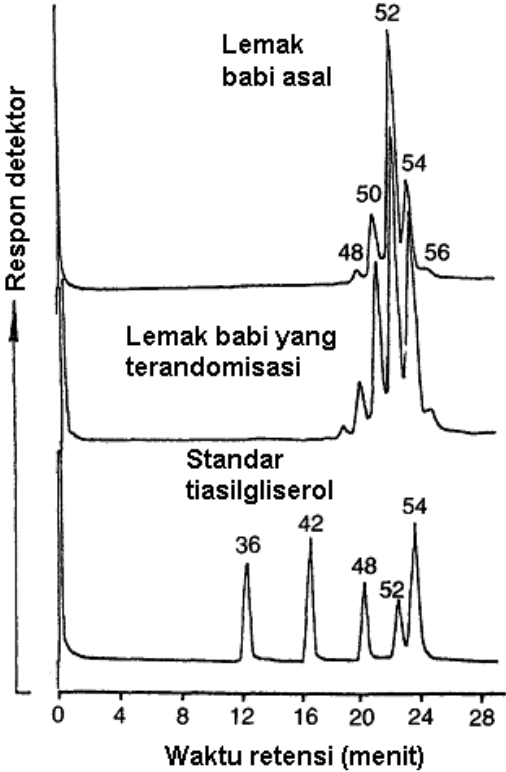


Gambar 8.4. Loading plot PCA untuk pengelompokkan lemak hewani (lemak babi, lemak ayam, lemak domba dan lemak sapi) serta minyak hati ikan cod (Sumber: Rohman dan Che Man, 2011b). Gambar diambil atas kebaikan dan izin dari Taylor and Francis.

Analisis pemalsuan lemak babi dalam beberapa produk makanan tergantung pada identifikasi dan penentuan komponen tertentu yang bersifat karakteristik. Kerananya, analisis asam lemak metil ester dengan kromatografi gas cair merupakan metode yang penting untuk tujuan autentikasi. Komposisi dan distribusi positional asam lemak menunjukkan bahwa komposisi asam lemak jenuh dan tidak jenuh, baik individual atau total dalam lemak babi asal (tidak dirandomisasi) dan lemak babi yang mengalami randomisasi adalah identik. Analisis komposisi triasilgliserol menunjukkan bahwa baik lemak babi asal dan lemak babi randomisasi mempunyai 5 triasilgliserol yang dominan yaitu C₄₈, C₅₀, C₅₂, C₅₄, and C₅₆ dengan konsentrasi yang cukup berbeda [17], sebagaimana ditunjukkan oleh Gambar 8.5.

Randomisasi lemak babi dilakukan dengan membiarkan lemak babi yang telah meleleh (dari hasil *rendering*) sampai suhunya

kurang lebih 80°C, lalu ditambah dengan 6,2 mL NaOCH₃ 1 % yang disiapkan baru dalam metanol. Dilakukan pengendalian pada suhu 80 °C selama 30 menit di bawah vakum sebelum ditambah dengan akuades dalam jumlah yang sama dan mengekstraksi bagian lemak dengan 4 x 15 mL dietil eter. Ekstrak eter yang dikumpulkan dicuci dengan air hangat (5 x 25 mL), lalu residu air dalam fase eter dihilangkan dengan penambahan natrium sulfat anhidrat. Penguapan pelarut organik dilakukan di bawah vakum pada suhu kamar.



Gambar 8.5. Pemisahan kromatografi gas campuran standar triasilgliserol (TG) lemak babi asal (*genuine*) dan lemak babi yang telah terandomisasi dengan kolom kaca. (Angka yang digunakan untuk menandai triasilgliserol adalah jumlah total atom karbon dalam rantai samping alifatik, tidak termasuk atom karbon gliserol; sebagai contoh, palmitosteariolein (PSO), palmitodiolein (POO), dan palmitoleiolinolein (POL) dirujuk sebagai TG dengan atom karbon 52 atau C52 (Sumber: Rashood dkk., 1996).

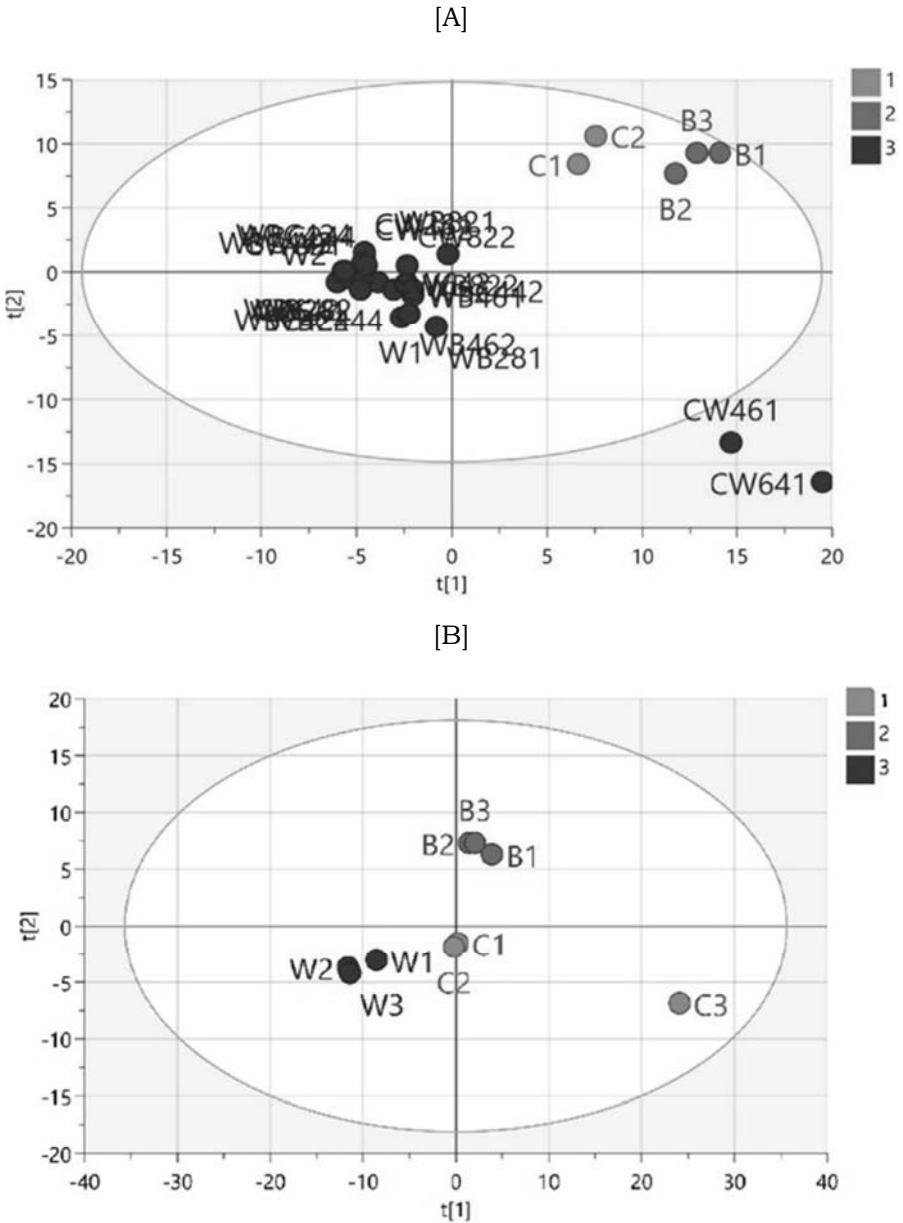
Jee (2002) juga telah mengamati adanya lemak babi dalam daging sapi dengan kromatografi gas, setelah lemak babi diperlakukan dengan lipase pankreatik untuk menghasilkan 2-monogliserida. Faktor pengkayaan (persentase asam lemak total dalam 2-monogliserida tiap persentase TG keseluruhan) untuk asam palmitat telah ditentukan. Nilai faktor pengkayaan adalah: $> 0,8$ untuk daging babi; $< 1,4$ jika terdapat lemak babi; dan $> 4,0$ untuk lemak babi murni. GC-FID juga telah digunakan untuk analisis pemalsuan daging sapi dan daging ayam dengan daging babi melalui analisis komposisi asam lemak. Daging ayam dan daging sapi ditambah dengan daging babi pada konsentrasi daging babi 0,5-10% lalu komposisi asam lemaknya dianalisis dengan GC. Komposisi asam lemak dijadikan sebagai variabel untuk analisis kemometrika *Principal Components Analysis* (PCA) dan *K-mean cluster analysis*. Hasilnya menunjukkan bahwa lemak babi mengandung asam linoleat (C18: 2 cis) yang tinggi dan asam lemak palmitat (C16: 0) yang lebih rendah pada lemak babi, dibandingkan dengan kandungan keduanya dalam lemak ayam dan lemak sapi. PCA mampu mengelompokkan lemak babi, lemak ayam dan lemak sapi atau lemak babi yang dicampur dengan lemak ayam dan lemak sapi sesuai dengan kelompoknya, sementara *K-mean cluster* hanya mampu mengelompokkan lemak babi, lemak ayam dan lemak sapi dalam keadaan murni [19].

b. Analisis lemak babi dengan GC-MS

KG digabungkan dengan spektrometer massa (GC-MS) telah menjelma menjadi kombinasi 2 teknik analisis untuk analisis beberapa komponen dalam turunan babi. GC-MS telah digunakan untuk analisis komponen mudah menguap dalam daging babi. Daging babi yang telah dimasak mengandung alkohol dengan konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan dengan daging yang lain (ayam masak dan sapi masak). Variasi kandungan alkohol dan aldehid mungkin

bertanggung jawab pada perbedaan aroma yang karakteristik untuk daging babi, ayam, dan sapi (Wittasinghe dkk., 2001). GC-MS juga telah digunakan untuk analisis komponen volatil bau yang keluar dari daging babi yang disinari. Hasilnya menunjukkan bahwa senyawa volatil utama yang keluar adalah dimetil sulfid, metil sulfida, dimetil trisulfida, S-metil tiosianat, dan metantiol. Lebih lanjut, GC-MS juga digunakan untuk analisis asam 11,14-eikosodienoat dalam coklat untuk melihat kemungkinan keberadaan lemak babi [20]. GC-MS dengan penyiapan sampel SPME juga digunakan untuk analisis senyawa volatil dalam babi panggang, dan beberapa senyawa volatil dari berbagai kelompok senyawa (aldehid, keton, ester dan lainnya) telah diidentifikasi sebagai penunjuk karakteristik daging babi yang dipanggang yakni estragol, trans-anetol, eugenol, furfural, 2-furan-metanol, 2-pentilfuran, 2-metilpirazin, 2,5-dimetilpirazin, 3-etil-2,5-dimetilpirazin, 2-asetiltiazol, benzotiazol dan lainnya [21].

GC-MS telah digunakan untuk evaluasi kualitas kesegaran (*freshness*) daging babi melalui analisis senyawa organik yang mudah menguap (*volatile compounds*). Senyawa mudah menguap dianalisis dengan menggunakan *headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry* (HS-SPME-GC-MS). Dalam studi ini, daging babi disimpan di refrigerator selama 5 hari pada suhu 4°C dan selama 466 hari pada suhu -18°C. Daging babi menjadi basi pada suhu 4°C ketika kandungan senyawa-senyawa volatil 2,3-butanedion, 3-metil butiraldehid, 3-metil-1-butanol, dan acetoin meningkat menjadi 26,44, 13,72, 71,56, dan 340,48 µg/L. Senyawa-senyawa ini bersifat karakteristik untuk daging babi yang basi. Sementara itu, senyawa volatil berikut: etil asetat, etil propionat, etil butirat, dan etil heksanoat berkorelasi negatif dengan kesegaran daging babi dengan nilai signifikansi $P < 0,05$, dan berpotensi dijadikan sebagai senyawa yang karakteristik untuk kesegaran daging babi [22].



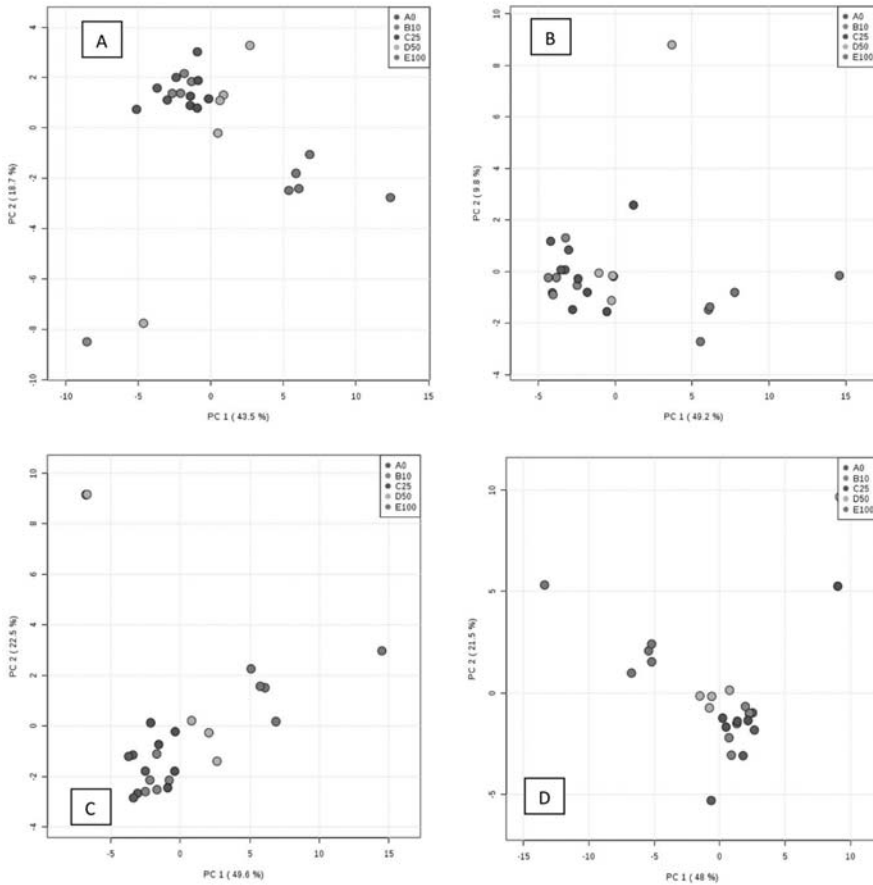
Gambar 8.6. PLS-DA plot score sampel-sampel daging segar [A] dan untuk sampel-sampel bakso [B]. (C: ayam, B: sapi, W: celeng, WB: celeng-sapi, CW: ayam-celeng, dan WBC: celeng-sapi-ayam). Angka merepresentasikan rasio masing-masing daging dan banyaknya replikasi. Sumber [23]. Gambar diambil dengan lisensi LC BY.

Profil komposisi senyawa volatil yang dianalisis dengan SPME/GC-MS telah digunakan untuk diskriminasi bakso ayam, bakso sapi dan bakso celeng (babi liar) serta bakso dengan campuran daging untuk autentikasi halal. SPME merupakan metode yang bersifat non-destruktif yang sering digunakan untuk ekstraksi senyawa-senyawa volatil dengan tidak mengubah komposisi kimia senyawa-senyawa volatil asal. Untuk tujuan diskriminasi ini, kemo-metrika PLS-DA digunakan untuk pembedaan bakso ini. Hasilnya menunjukkan bahwa senyawa *beta-cymene*, 3-metil-butanal, dan 2-pentanol adalah diantara senyawa volatil yang memberikan kontribusi positif dalam diskriminasi dengan nilai *variable importance in projection* (VIP) tertinggi. Senyawa volatil dengan nilai VIP tertinggi pada bakso sapi adalah *5-ethyl-m-xylene*, benzaldehid, dan 3-etil-2-metil-1,3-heksadiena. Untuk bakso celeng, sebanyak 6 senyawa yaitu pentanal, 2,6-dimetilsikloheksanon, 1-undekanol, siklobutanol, 2,4,5-trimetil-thiazole, dan 5-etil-3-(3-metil-5-fenil pirazol-1-il)-1,2,4-triazol-4-amin merupakan senyawa yang berkontribusi pada diskriminasi dengan nilai VIP tertinggi. Senyawa-senyawa ini ditemukan secara konsisten senyawa senyawa volatil yang memberikan diskriminasi secara signifikan, meskipun dengan nilai-nilai VIP yang berbeda [23]. Profil PLS-DA untuk pembedaan bakso-bakso ini sebagaimana dalam Gambar 8.6.

Senyawa volatile yang dianalisis dengan SPME-GC-MS Bersama-sama dengan tekstur dan warna telah digunakan untuk membedakan bakso sapi, tikus, celeng dan bakso-bakso dengan kombinasi daging-daging ini. Dua kemometrika pengenalan pola yakni PCA dan PLS-DA digunakan untuk pengelompokkan dan diskriminasi bakso dengan daging yang berbeda. Hasilnya menunjukkan bahwa tekstur dan warna hanya dapat digunakan untuk membedakan bakso berdasarkan pada jenis daging ketika konsentrasi daging pemalsu lebih besar dari 50%. PLS-DA dengan menggunakan variable

senyawa volatil mampu memisahkan bakso dengan jenis daging yang berbeda termasuk bakso sapi yang dipalsukan dengan daging tikus dan daging celeng, dengan konsentrasi daging pemalsu yang dapat dideteksi adalah 20%. Dengan menggunakan nilai VIP dan koefisien korelasi variabel senyawa volatile, penanda-penanda (*markers*) paling kuat dalam daging sapi, daging tikus, dan daging celeng adalah (Z)-2-amino-5-methyl-benzoic acid, 2-heptenal, dan siklo-butanol [24].

Pendekatan metabolomik dengan menganalisis semua senyawa dalam berbagai kelompok dengan GC-MS telah digunakan untuk analisis daging babi dalam daging sapi. Dua kemometrika pengenalan pola (PCA dan PLS-DA) digunakan untuk tujuan ini. Beberapa metabolit yang meningkat konsentrasinya dengan meningkatnya kandungan daging babi dalam daging sapi adalah Arabitol, asam sitrat, kreatinin, glukosa-6-fosfat, glisin, Heptadecane, Hexano-dibutyryn, asam malat, myo-inositol, Pentadecane, fosfat, asam piroglutamat. PCA dengan menggunakan variabel data GC-MS menunjukkan profil gradien yang jelas dengan meningkatnya kandungan pemalsuan daging babi dalam daging sapi dalam score plot komponen utama 1 (PC1). Daging babi murni dan daging sapi murni terkelompokkan dalam dua pencaran linier yang ekstrim, sementara daging sapi yang tercampur dengan daging babi pada konsentrasi 10%, 25% dan 50% terletak di antara dua kluster yang ekstrim ini. Kecenderungan ini teramati untuk semua jenis daging sapi, tanpa memerdulikan kandungan lemak awal yang terdapat di daging sapi [25]. Perlu dicatat bahwa arah pengelompokkan (kiri ke kanan atau kanan ke kiri) tidak menggambarkan apapun yang relevan secara statistic (Gambar 8.7). Penggunaan kemometrika pengenalan pola dan GC-MS bersifat efektif untuk analisis keberadaan daging non-halal, terutama ketika menggunakan pendekatan metabolomik dan lipidomik [26].



Gambar 8.7. PCA scores plots untuk 4 jenis daging sapi yang dipalsukan dengan berbagai level daging babi dengan menggunakan variabel data yang dianalisis dengan GC-MS. (A) daging babi yang mengandung 5% lemak dari daging babi, (B) daging babi yang mengandung 15% lemak dari daging babi, (C) daging babi yang mengandung 20% lemak dari daging babi dan (D) daging babi yang mengandung 23% lemak dari daging babi. Gambar diambil dari [25].

c. Analisis lemak babi dengan kromatografi dua dimensi

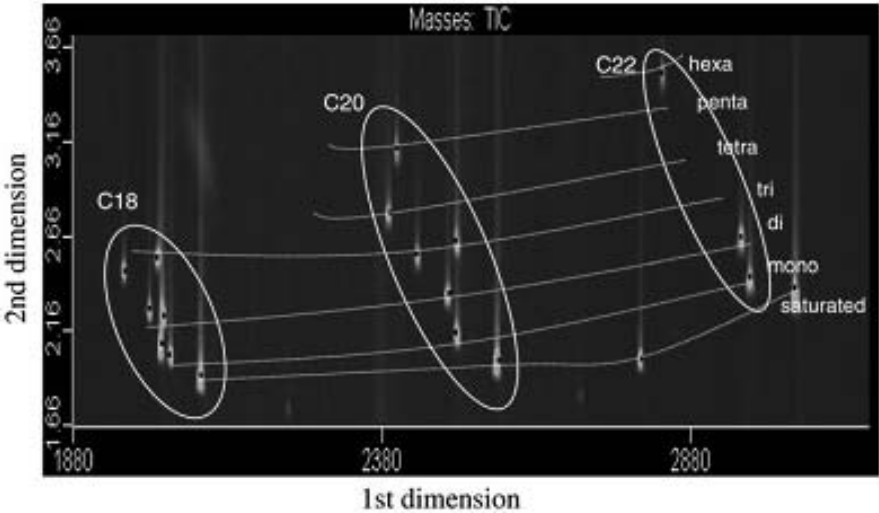
Disebabkan oleh kapasitas pemisahannya, kromatografi gas 2 dimensi telah dimanfaatkan untuk analisis komposisional sampel yang kompleks. Baru-baru ini, perhatian dicurahkan untuk meng-

gunakannya dengan digabungkan dengan spektrometer massa “*time-of-flight*” (TOF-MS) [27]. GC x GC-TOF-MS telah digunakan untuk membedakan lemak babi, lemak sapi, lemak domba, dan lemak ayam oleh Indrasti dkk. (2010). GC dua dimensi banyak digunakan untuk analisis derivat babi melalui studi lipidomic, yakni melakukan analisis semua kelas lipid yang terdapat dalam derivat babi dan dalam komponen non-halal lainnya [28].

Lemak babi diderivatisasi sebagaimana di atas. FAME yang dihasilkan diinjeksikan ke 2 kolom yang berbeda yakni kolom non-polar DB5ms dengan panjang 30 m, diameter internal 0,25 mm i.d. dan ketebalan lapisan 0,25 mikron. Kolom kedua adalah DB-wax (1 m x 0,10 mm i.d. ketebalan lapisan 0,10 mikron). Sampel diinjeksikan sebanyak 1,0 mikroliter dengan rasio pemecahan 100: 1 ke dalam injektor kromatograf gas dengan suhu injektor 250 °C. Sebagai fase gerak/gas pembawa digunakan helium dengan kemurnian yang sangat tinggi (99,9999%). Suhu mula-mula untuk kolom dimensi pertama adalah 40 °C selama 3 menit. Suhu selanjutnya diprogram dengan kenaikan pemanasan 15 °C/menit sampai suhu 160 °C, lalu ditingkatkan ke 250 °C dengan kenaikan suhu 2 °C/menit. Suhu akhir ini dijaga isothermal selama 5 menit. Suhu mula-mula untuk kolom kedua adalah 45 °C dan ditahan selama 3 menit, sebelum suhu itu ditingkatkan sampai 165 °C dengan kecepatan kenaikan suhu 15 °C/menit, lalu suhu ditingkatkan sampai 255 °C dengan kenaikan 2 °C/menit dan ditahan selama 5 menit. Identifikasi puncak dilakukan dengan *time of flight-mass spectrometer* (TOF-MS) dengan ionisasi *electron impact* pada energy ionisasi 70 eV dan suhu sumber ionisasi 225°C. Kecepatan akuisisi adalah 100 spektra/detik dan data spektra analit dikumpulkan dengan kisaran massa atom 35 – 450 amu.

Jenis kromatogram asam lemak standar (37 asam lemak) yang diperoleh sebagaimana dalam Gambar 8.6 yang terdiri atas

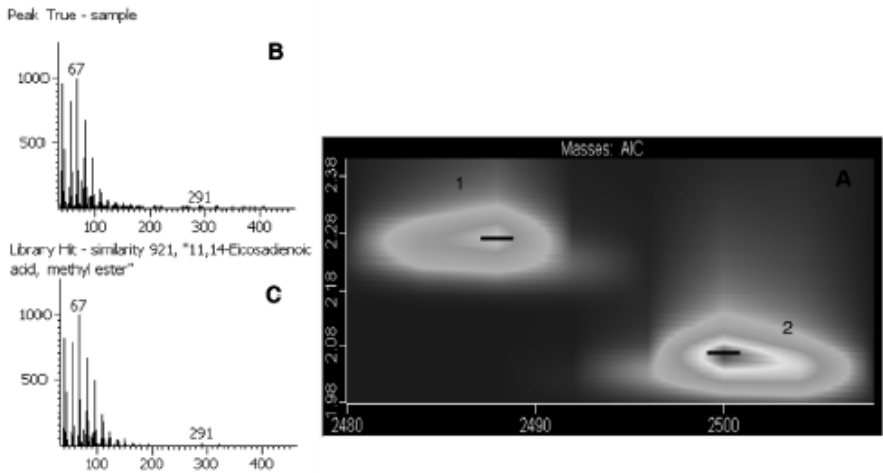
waktu retensi kolom dimensi pertama, waktu retensi kolom dimensi kedua dan luas puncak atau kromatogram ion total (*total ion chromatogram*, TIC). Asam-asam lemak dengan rantai sederhana dan pendek akan terelusi pertama kali, lalu asam-asam lemak dengan atom karbon yang lebih kompleks. FAME dengan atom-atom karbon yang sama akan terelusi sebagai suatu kelompok. Asam-asam lemak dengan atom karbon 8 akan meningkat secara perlahan-lahan dalam kolom dimensi pertama, sampai asam-asam lemak dengan atom karbon 22. Meningkatnya jumlah ikatan rangkap (sampai 6 ikatan rangkap) teramati dalam waktu retensi dimensi kolom kedua.



Gambar 8.6. Kromatogram GC x GC. FAME dengan atom karbon yang sama akan terelusi sebagai suatu kelompok pada kolom dimensi pertama dan tingkat ketidakjenuhan meningkat pada dimensi kedua [14]. Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Elsevier.

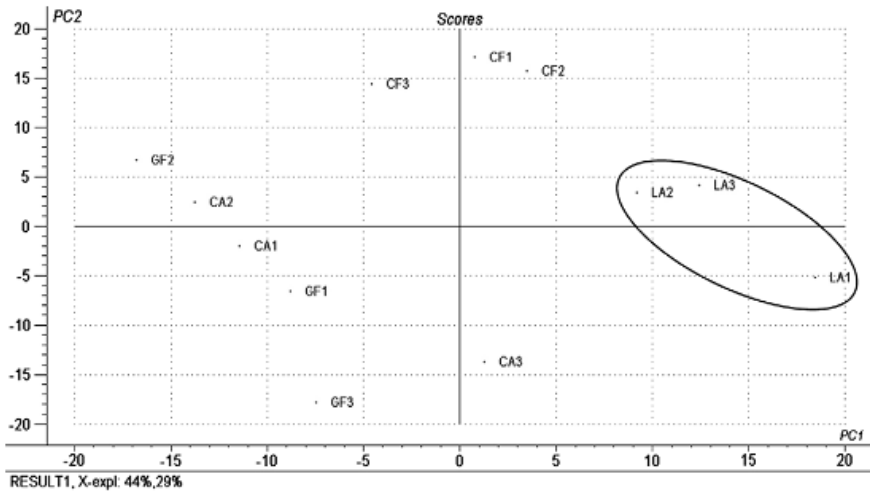
Dengan menggunakan 2 kolom *microbore* yang berbeda (SLB-5ms dan DB-wax) dimungkinkan untuk melakukan pembedaan lemak babi (LB) dari lemak hewani lainnya dengan mengamati adanya 3 asam lemak pada LB yang tidak dijumpai pada lemak hewani lainnya. Ketiga asam lemak tersebut adalah asam *trans*-

9,12,15-oktadekatrienoat (C18:3 n3t), asam 11,14,17-eikosatrienoat (C20:3 n3t) and asam 11,14-eikosadienoat (C20:2 n6). *Plot Contour* asam-asam lemak ini sebagaimana dalam Gambar 8.7. Peneliti ini menyimpulkan bahwa profil asam lemak ini dapat dimanfaatkan sebagai dasar untuk deteksi LB untuk tujuan autentikasi halal.



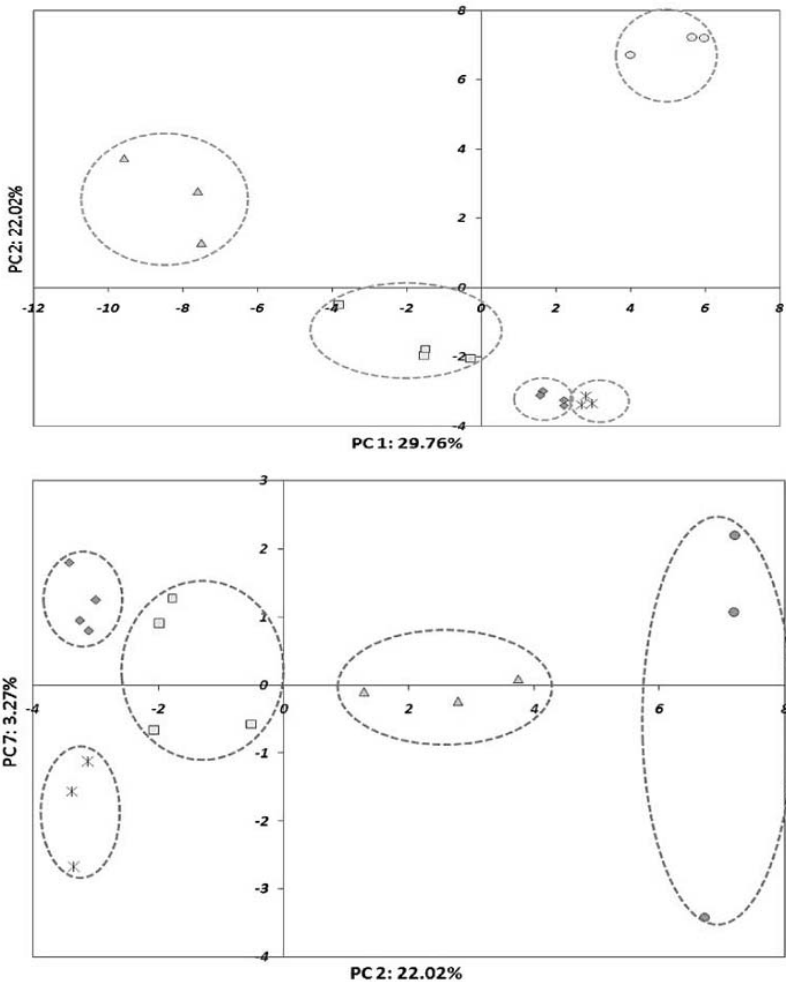
Gambar 8.7. (A). *Plot Contour* (1) asam 11,14-eikosadienoat (C20:2 n6) dan (2) asam 11-eikosenoat. (B) spektra massa puncak (*peak*) no 1 dan (C) spektra massa puncak 1 dari pustaka MS (Sumber: Indrasti dkk., 2010). Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Elsevier.

Pengelompokkan data asam lemak untuk spesies yang diuji (babi, ayam, sapi dan domba) dilakukan dengan *principal component analysis* (PCA). Lemak babi terpisah dengan baik di sepanjang sisi positif PC1 dan PC2 dan dapat dibedakan dari lemak ayam, lemak domba dan lemak sapi, sebagaimana ditunjukkan oleh Gambar 8.8.



Gambar 8.8. Profil PCA untuk pengelompokkan lemak babi (LA) dari lemak ayam (CF), lemak sapi (CA) dan lemak domba (GF) [14]. Gambar diambil atas izin dan kebaikan dari Elsevier.

Penelitian serupa dilakukan oleh Chin dkk. (2009) untuk membedakan LB, lemak hewani, dan minyak hati ikan cod. Hasilnya menunjukkan bahwa GC x GC-TOF-MS dikombinasikan dengan kemometrika PCA merupakan cara yang efektif untuk membedakan lemak babi. Suatu nilai eigen akumulatif 90%. Nilai score plot yang diproyeksikan dengan nilai PC1 (komponen utama pertama) dan PC2 (komponen utama kedua) menunjukkan variansi sebesar 51% (Gambar 4.9.a). Karena penggunaan PC1 dan PC2 tidak mampu memisahkan lemak babi dan lemak lainnya serta dari minyak hati ikan Cod, maka digunakan *score plot* PCA dengan PC2 dan PC7 (Gambar 8.9.b).



Gambar 8.9. (a) Nilai score plot PC1 dan PC2; (b) Nilai score plot PC2 dan PC7 untuk pengelompokan lemak babi, lemak hewani lainnya serta minyak hati ikan Cod. \blacklozenge = lemak babi; \blacktriangle = lemak domba; \blackast = lemak ayam; \blacksquare = lemak sapi; \bullet = minyak hati ikan Cod [13]. Diambil dengan izin penerbit.

Saat ini, analisis melalui pendekatan volatilomik dengan menggunakan kromatografi gas spectrometer massa telah banyak dieksplorasi untuk mendeteksi adanya komponen babi di dalam suatu produk makanan. Metode ini telah berhasil digunakan untuk mengklasifikasikan daging sapi cincang dan daging babi cincang

beserta campurannya [29]. Senyawa volatil diekstraksi dengan menggunakan metode *headspace*-SPME (*solid phase microextraction*). Fiber yang digunakan untuk absorpsi senyawa volatil adalah DVB/CAR/PDMS- 50/30 μm (panjang 1 cm, ukuran jarum 24 ga). Sebanyak 2,5 gram daging cincang dan 5 mL larutan NaCl 25% b/v dimasukkan ke dalam vial kaca 20 mL kemudian dihomogenisasi selama 2 menit. Vial ditutup rapat dengan menggunakan katup mininert kemudian distirer selama 15 menit pada suhu 40°C. Kemudian fiber di ekspose pada *headspace* selama 30 menit. Kemudian dilakukan analisis dengan kromatografi gas spektrometer massa. Kondisi injektor yang digunakan pada kromatografi gas adalah dengan menggunakan mode split, dengan rasio split 1:2 pada suhu 250°C. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan kolom HP-5MS (30 cm x 0,25 mm, 0,25 μm). Temperatur oven ditahan pada 40°C selama menit kemudian diprogram menuju 150°C dengan kenaikan sebesar 4°C/menit. Setelah itu temperatur dinaikkan menjadi 250°C dengan kecepatan 30°C/menit dan ditahan selama 15 menit. Temperatur interface diset pada suhu 280°C. Spektrometer massa diope- rasikan dengan mode ionisasi elektron dengan energi 70 eV dan rentang scan 29-350 m/z. Temperatur pada sumber MS diset 230°C sedangkan temperatur quadrupole pada 150°C. Hasil analisis diperoleh bahwa kemometrika PCA dan PLS-DA mampu mengklasifikasi- kan komponen volatil pada daging cincang sapi, babi, maupun cam- puran daging sapi dan babi cincang. Berdasarkan hasil identifikasi komponen volatil, diperoleh komponen volatil yang berkorelasi positif terhadap daging babi, yaitu pentanal, hexanal, decanal, nonanal, benzaldehyde, trans-2-hexenal, trans-2-heptenal, trans-2-octenal and 1-octen-3-one. Sedangkan komponen volatile berikut heptanal, octanal, butanol, pentanol, hexanol, octanol, 1-penten-3-ol, 2-octen- 1-ol, 3-hydroxy-2-butanone, 2-butanone and 2-heptanone berkore- lasi positif dengan daging sapi.

Referensi

- [1] E. A. Adlard, "Early International Symposia on Chromatography (50-Year Anniversary of the Chromatographic Society)," *LCGC North Am.*, vol. 24, no. 10, pp. 1102–1117, 2006.
- [2] A. Rohman and N. A. Fadzillah, *Lipid-based techniques used for halal and kosher food authentication*. Elsevier Ltd., 2018.
- [3] G. A. Eiceman, J. Gardea-Torresdey, E. O. Louisiana, K. Carney, and F. Dorman, "Gas Chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 11, pp. 2771–2780 Gas, 2002, [Online]. Available: http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-0599-6_5.
- [4] H. M. McNair and J. M. Miller, "Chapter 2. Instrument overview," *Basic Gas Chromatogr.*, pp. 14–28, 2008.
- [5] F. L. Dorman and P. Dawes, *Column Technology: Open Tubular Columns*. Elsevier Inc., 2012.
- [6] M. Esteki, J. Simal-Gandara, Z. Shahsavari, S. Zandbaaf, E. Dashtaki, and Y. Vander Heyden, "A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication," *Food Control*, vol. 93, no. June, pp. 165–182, 2018, doi: 10.1016/j.foodcont.2018.06.015.
- [7] C. L. Wilkins, *Hyphenated Spectroscopic Detectors for Gas Chromatography*. Elsevier Inc., 2012.
- [8] M. S. Klee, *Detectors*. Elsevier Inc., 2012.
- [9] M. D. E. H. Farag, "Detecting Adulteration in Halal Foods," *Halal Food Handb.*, pp. 283–319, 2020, doi: 10.1002/9781118823026.ch18.
- [10] P. C. Ng *et al.*, "Recent advances in halal food authentication: Challenges and strategies," *J. Food Sci.*, vol. 87, no. 1, pp. 8–35, 2022, doi: 10.1111/1750-3841.15998.
- [11] A. Rohman and Y. B. Che Man, "Analysis of Pig Derivatives for Halal Authentication Studies," *Food Rev. Int.*, vol. 28, no. 1, pp. 97–112, 2012, doi: 10.1080/87559129.2011.595862.
- [12] J. M. N. Marikkar, H. M. Ghazali, Y. B. C. Man, T. S. G. Peiris, and O. M. Lai, "Use of gas liquid chromatography in combination with pancreatic lipolysis and multivariate data analysis techniques for identification of lard contamination in some vegetable oils," *Food Chem.*, vol. 90, no. 1–2, pp. 23–30, 2005, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.03.021.

- [13] S. T. Chin, Y. Bin Che Man, C. P. Tan, and D. M. Hashim, "Rapid profiling of animal-derived fatty acids using fast GC × GC coupled to Time-of-flight mass spectrometry," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 86, no. 10, pp. 949–958, Oct. 2009, doi: 10.1007/s11746-009-1427-y.
- [14] D. Indrasti, Y. B. Che Man, S. Mustafa, and D. M. Hashim, "Lard detection based on fatty acids profile using comprehensive gas chromatography hyphenated with time-of-flight mass spectrometry," *Food Chem.*, vol. 122, no. 4, pp. 1273–1277, 2010, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.03.082.
- [15] Y. B. Che Man, A. Rohman, and T. S. T. Mansor, "Differentiation of lard from other edible fats and oils by means of Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 88, no. 2, pp. 187–192, 2011, doi: 10.1007/s11746-010-1659-x.
- [16] A. Rohman and Y. B. Che Man, "FTIR spectroscopy combined with chemometrics for analysis of lard in the mixtures with body fats of lamb, cow, and chicken," *Int. Food Res. J.*, vol. 17, no. 3, pp. 519–526, 2010.
- [17] A. Rohman and A. R. Putri, "The chemometrics techniques in combination with instrumental analytical methods applied in Halal authentication analysis," *Indones. J. Chem.*, vol. 19, no. 1, pp. 262–272, 2019, doi: 10.22146/ijc.28721.
- [18] A. Rohman and Y. B. Che Man, "The optimization of FTIR spectroscopy combined with partial least square for analysis of animal fats in quaternary mixtures," *Spectroscopy*, vol. 25, no. 3–4, pp. 169–176, 2011, doi: 10.3233/SPE-2011-0500.
- [19] O. Dahimi, M. S. Hassan, A. A. Rahim, S. M. Abdulkarim, and S. M. A., "Differentiation of lard from other edible fats by gas chromatography-flame ionisation detector (GC-FID) and chemometrics," *J. Food Pharm. Sci.*, vol. 2, pp. 27–31, May 2014, doi: 10.14499/jfps.
- [20] W. Suparman, R. Sri, E. Sundhani, and S. D. Saputri, "The use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GCMS) for Halal Authentication in Imported Chocolate with Various Variants," *J. Food Pharm. Sci.*, vol. 2, pp. 6–11, 2015.
- [21] J. Xie, B. Sun, F. Zheng, and S. Wang, "Volatile flavor constituents in roasted pork of Mini-pig," *Food Chem.*, vol. 109, no. 3, pp. 506–514, 2008, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.12.074.
- [22] Y. Sun, M. Fu, Z. Li, and X. Peng, "Evaluation of Freshness

in Determination of Volatile Organic Compounds Released from Pork by HS-SPME-GC-MS,” *Food Anal. Methods*, vol. 11, no. 5, pp. 1321–1329, 2018, doi: 10.1007/s12161-017-1109-6.

- [23] A. W. Pranata, N. D. Yuliana, L. Amalia, and N. Darmawan, “Volatilomics for halal and non-halal meatball authentication using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry,” *Arab. J. Chem.*, vol. 14, no. 5, p. 103146, 2021, doi: 10.1016/j.arabjc.2021.103146.
- [24] L. Amalia *et al.*, “Volatile compounds, texture, and color characterization of meatballs made from beef, rat, wild boar, and their mixtures,” *Heliyon*, vol. 8, no. 10, 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10882.
- [25] D. K. Trivedi *et al.*, “Meat, the metabolites: An integrated metabolite profiling and lipidomics approach for the detection of the adulteration of beef with pork,” *Analyst*, vol. 141, no. 7, pp. 2155–2164, 2016, doi: 10.1039/c6an00108d.
- [26] V. Maritha, P. W. Harlina, I. Musfiroh, A. M. Gazzali, and M. Muchtaridi, “The Application of Chemometrics in Metabolomic and Lipidomic Analysis Data Presentation for Halal Authentication of Meat Products,” *Molecules*, vol. 27, no. 21, p. 7571, 2022, doi: 10.3390/molecules27217571.
- [27] M. Adahchour, J. Beens, R. J. J. Vreuls, and U. A. T. Brinkman, “Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC). I. Introduction and instrumental set-up,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 25, no. 5, pp. 438–454, 2006, doi: 10.1016/j.trac.2006.03.002.
- [28] P. W. Harlina, V. Maritha, I. Musfiroh, S. Huda, N. Sukri, and M. Muchtaridi, “Possibilities of Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)-Based Metabolomics and Lipidomics in the Authentication of Meat Products: A Mini Review,” *Food Sci. Anim. Resour.*, vol. 42, no. 5, pp. 744–761, 2022, doi: 10.5851/kosfa.2022.e37.
- [29] D. E. Pavlidis, A. Mallouchos, D. Ercolini, E. Z. Panagou, and G. J. E. Nychas, “A volatilomics approach for off-line discrimination of minced beef and pork meat and their admixture using HS-SPME GC/MS in tandem with multivariate data analysis,” *Meat Sci.*, vol. 151, no. October 2018, pp. 43–53, 2019, doi: 10.1016/j.meatsci.2019.01.003.

BAB IX

ANALISIS KEHALALAN PRODUK DENGAN *HIGH PERFORMACE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)*

Mustofa Ahda

Faculty of Pharmacy, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta
Ahmad Dahlan Halal Center, Universitas Ahmad Dahlan,
Yogyakarta

A. Pendahuluan

Perkembangan teknologi mendorong perkembangan teknik analisis yang digunakan dikarenakan makanan atau produk komersial lainnya semakin kompleks komposisinya. Oleh karena itu, teknik analisis halal juga mengalami perkembangan. Menurut Mursyidi, (2013) melaporkan bahwa metode analisis yang dikembangkan untuk analisis halal produk seperti *Fourier transform infrared (FTIR)*, metode *chromatography-based*, *differential scanning calorimetry (DSC)*, *e-nose*, and *DNA-based methods*. Metode *chromatography-based* untuk analisis halal dapat digunakan sebagai salah satu instrumen yang mampu mendukung metode analisis halal lainnya seperti FTIR, *e-nose*, dan *Real Time polymerase chain reaction (RT-PCR)*. Secara umum, metode *chromatography-based* yang banyak dikembangkan untuk analisis halal adalah *Gas Chromatography (GC)* dan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Keunggulan penggunaan metode analisis *chromatography-based* dapat memberikan informasi senyawa penyusun yang memberikan ciri khas berkaitan bahan halal atau tidak. Metode GC banyak digunakan untuk deteksi senyawa-senyawa yang bersifat volatil sedangkan HPLC dapat digunakan untuk analisis senyawa non-volatil dan

senyawa-senyawa yang tidak tahan panas. Masing-masing metode analisis *chromatography-based* memiliki keunggulan dan kelemahan masing-masing. Menurut Nhari, Ismail, & Che Man, (2012) telah menyimpulkan bahwa berbagai metode analisis seperti spektroskopi, pengujian kimia konvensional, kromatografi dll memiliki batas deteksi tertentu dengan kelebihan dan kelemahannya.

Berkaitan mengenai analisis halal, banyak komponen non-halal yang bersifat non-volatil seperti kolagen dan gelatin, protein, lipid, asam amino dll. Oleh karena itu, metode HPLC sangat diperlukan untuk mendeteksi senyawa tersebut. Menurut Jaswir & Mirghani, (2017) menyatakan bahwa HPLC mampu membedakan enantiomer asam amino pada sampel. Selain itu, kemampuan HPLC ini juga digunakan untuk analisis komponen lainnya seperti karbohidrat, vitamin, bahan tambahan, pewarna sintetik, pewarna alami dan berbagai kontaminan sehingga dapat mengetahui senyawa kimia penyusunnya (Bélanger, Jocelyn Paré, & Sigouin, 1997). Informasi senyawa penyusun suatu komponen non-halal dapat diidentifikasi karena adanya perbedaan migrasi yang terjadi karena interaksi antara senyawa tersebut dengan fase diam (*stationary phase*) dan fase geraknya (*mobile phase*).

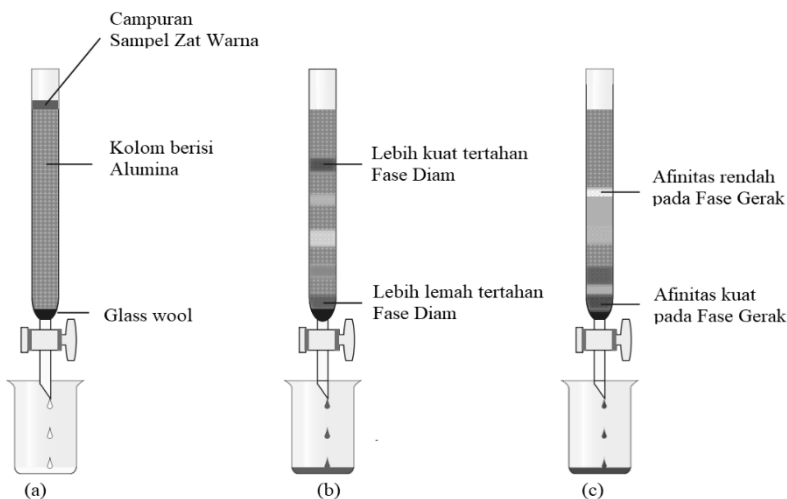
Umumnya, fase diam yang digunakan pada HPLC berupa kolom silika yang diimbangkan material non-polar sehingga fase diam bersifat non-polar. Kolom tersebut berupa kolom C18 fase terbalik (*reversed-phase*), tetapi kadang kala juga menggunakan kolom C8 yang memiliki sifat lebih polar dibandingkan kolom C18. Oleh karena itu, komponen kimia/senyawa yang bersifat non-polar akan tertahan lebih lama oleh kolom C18 tersebut sehingga waktu retensinya lebih besar. Prinsip ini yang menyebabkan setiap senyawa dengan kepolaran yang berbeda akan memiliki waktu retensi masing-masing. Perlu diperhatikan, proses pemisahan senyawa kimia selain terjadi oleh interaksi oleh fase diam dan fase gerak juga sangat

dipengaruhi *flow rate* yang digunakan. Oleh karena itu, pemisahan senyawa akan menjadi maksimal dengan pemilihan solvent dan komposisinya dan mengatur *flow ratenya* (Jaswir & Mirghani, 2017).

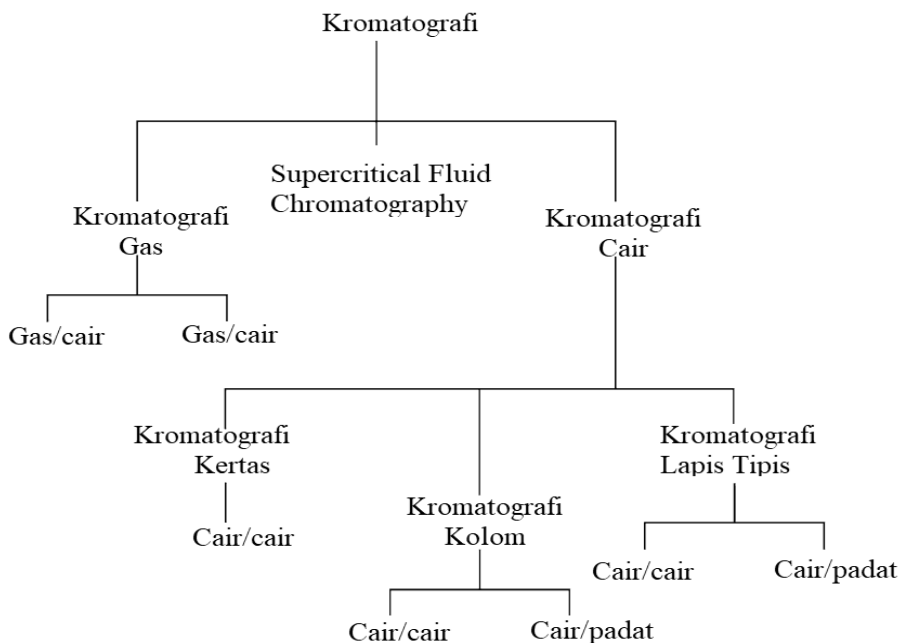
Aplikasi HPLC dalam analisis halal juga dikarenakan setiap hewan memiliki komposisi senyawa penyusun yang berbeda (*fingerprint area*). Perbedaan senyawa kimia penyusunnya ini akan dideteksi dengan HPLC dengan melihat waktu retensi setiap senyawa tersebut. Selain melihat jenis senyawa penyusunnya, perbedaan komponen halal dan non-halal juga dapat terjadi pada kuantitasnya. Widyaninggar, Triyana, & Rohman, 2012 melaporkan bahwa analisis komposisi asam amino pada gelatin babi dan gelatin sapi pada kapsul berbeda dimana asam glutamat, asparagin, glisin, treonin, dan tirosin pada gelatin babi lebih tinggi dibandingkan pada gelatin sapi. Identifikasi ini merupakan suatu bukti kemampuan HPLC sebagai suatu metode yang digunakan dalam analisis halal. Pembahasan lainnya mengenai keunggulan, kelemahan dan aplikasi HPLC lebih dalam dalam analisis halal akan dibicarakan pada sub-bab berikutnya.

B. Prinsip Pemisahan dan Sistem Instrumentasi HPLC

Proses analisis senyawa kimia menggunakan HPLC didasarkan pada pemisahan senyawa kimia yang terjadi karena ada perbedaan interaksi dan distribusi pada setiap senyawa pada fase diam (*stationary phase*) dan fase geraknya (*mobile phase*). Awal penamaan Chromatography berasal dari kata *chroma* yang artinya warna dan *Graphos* berarti spektrum (Syllabus, 2019). Oleh karena itu awal penemuan pemisahan ini dikembangkan metode analisis preparatif sederhana dengan pemisahan kolom sederhana seperti Gambar 9.1.



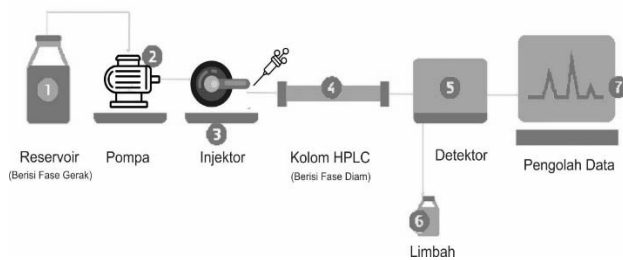
Gambar 9.1. Proses Dasar Pemisahan senyawa kimia menggunakan Packing Coloum: a) Proses sebelum pemisahan; b) Interaksi sampel pada Fase diam; c) Interaksi sampel pada Fase gerak (Syllabus, 2019).



Gambar 9.2. Jenis- jenis metode Kromatografi berdasarkan jenis fase gerak/fase diam (Ismail dan Nielsen, 2010).

Berdasarkan metode preparatif pada Gambar 9.1 ini, muncul metode yang dikenal dengan nama *Chromatography*. Metode yang dikembangkan tidak hanya sebagai analisis preparatif (kualitatif) akan tetapi juga dapat digunakan sebagai metode analisis kuantitatif. Metode analisis *chromatography-based* terbagi menjadi beberapa jenis seperti Gambar 9.2.

Secara umum, metode kromatografi berdasarkan jenis fase geraknya dibagi menjadi 3 yaitu *Gas Chromatography* (GC), *Supercritical Fluid Chromatography* (SFC), dan *Liquid chromatography* (LC). Sub-bab kali ini hanya membahas mengenai salah satu jenis LC dengan fase diam kolom yang dikenal dengan nama HPLC. HPLC menggunakan fase diam berbentuk kolom yang berisi dengan amino, siano, alumina atau silika. Perbedaan kepolaran fase diam yang digunakan membedakan nama metode kromatografi. Pemakaian fase diam bersifat non-polar dikenal sebagai metode *Reversed-Phase* HPLC (RP-HPLC) sedangkan penggunaan fase diam bersifat polar dikenal sebagai metode *Normal-Phase* HPLC (NP-HPLC). Penggunaan HPLC dalam analisis senyawa biasanya menggunakan jenis RP-HPLC. Akan tetapi NP-HPLC sebenarnya memiliki keunggulan dibandingkan RP-HPLC karena dapat digunakan untuk analisis senyawa yang bersifat non polar dikarenakan senyawa yang *water soluble* sangat terbatas dan juga untuk pemisahan berbagai isomer (Cooper, 2006).



Gambar 9.3. Bagan Instrument HPLC: 1) Fase gerak; 2) Pompa; 3) Tempat injek sampel; 4) kolom; 5) Detektor; 6) Limbah keluarnya eluen; 7) Pengolahan Data dalam bentuk Kromatogram.

Umumnya, ada 2 jenis komponen yang sangat mempengaruhi proses pemisahan pada HPLC yaitu fase gerak dan fase diamnya. Komponen tersebut sangat mempengaruhi pemisahan karena sampel sangat tergantung pada kekuatan interaksi pada keduanya. Kekuatan interaksi sampel dengan fase gerak akan menyebabkan sampel mudah terbawa oleh fase gerak sehingga akan memiliki waktu retensi (T_r) lebih cepat sedangkan sampel yang berinteraksi kuat dengan fase diam akan tertahan lebih lama sehingga waktu retensinya lebih besar. Proses pemisahan karena interaksi sampel dengan fase gerak dan fase diam akan terjadi pada kolom kromatografi (Gambar 9.3). Rangkaian instrumentasi HPLC seperti diilustrasikan oleh Gambar 9.3).

C. Analisis Halal Menggunakan HPLC

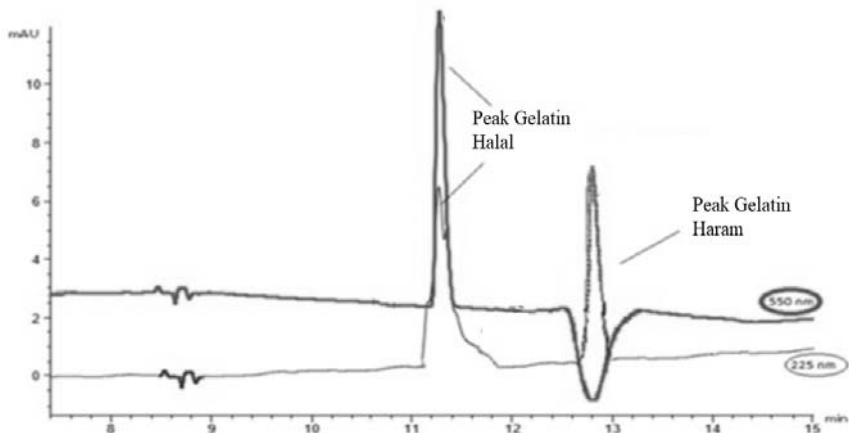
Analisis Halal menggunakan instrumen HPLC dapat mendukung analisis halal oleh instrumen lain seperti FTIR, e-nose, PCR dll. Hasil yang diperoleh menggunakan metode HPLC akan dapat mengidentifikasi komponen senyawa yang menjadi pembeda antara komponen halal dan non-halal khususnya untuk senyawa-senyawa yang bersifat non-volatil. Umumnya, analisis halal dilakukan dengan melihat ada dan tidaknya senyawa pembeda pada sampel sehingga metode analisis difokuskan pada identifikasi senyawa pembeda yang ada berdasarkan analisis kualitatif. Berbeda lagi dengan analisis *ingredient* dan kontaminan dalam sampel, analisis yang diperlukan tidak hanya kualitatif tetapi juga kuantitatifnya supaya kadar *ingredient* dan kontaminan dapat diketahui. Akan tetapi, Penyebab perbedaan senyawa (*fingerprnt area*) dengan HPLC pada komponen halal dan non-halal tidak hanya dibedakan pada jenis senyawanya tetapi dibedakan berdasarkan kuantitas senyawa pada sampel (secara analisis kuantitatif). Walaupun demikian, pernyataan kehalalan tidak bergantung besar kuantitas senyawa non-halal dalam sampel, tetapi

terkontaminasi bahan non halal (kontaminasi silang) akan menyebabkan sampel menjadi haram.

Oleh karena itu, analisis halal dengan HPLC tidak hanya difokuskan pada analisis kualitatif tetapi juga analisis kuantitatifnya. Hasil kromatogram yang diperoleh tidak hanya melihat jenis senyawa berdasarkan waktu retensinya tetapi juga kadar setiap senyawa yang terkandung didalamnya. Analisis kualitatif dan kuantitatif pada HPLC selain dipengaruhi oleh 2 komponen (fase gerak dan fase diam) sangat dipengaruhi oleh kemampuan detektor yang digunakan (sensitifitas detektor). Beberapa detektor HPLC yang digunakan dalam analisis halal seperti *diode array detector* (DAD) (Jorfi, et al., 2012; Eyupoglu., 2020); *detector refractive index* (RI) (Fadzillah et al., 2017), detektor UV (Eyupoglu., 2020), detektor fluorosensi (Nemati, Oveisi, Abdollahi, & Sabzevari, 2004; Widyaninggar et al., 2012; Azilawati, Hashim, Jamilah, & Amin, 2015; Zilhadia; Kusumaningrum, Farida; Supandi; Betha, 2018), detektor *Mass Spectrometry* (MS) (Zhang et al., 2009; Von Bargen, Brockmeyer, & Humpf, 2014; Ruiz Orduna, Yang, Ghosh, & Beaudry, 2019). Masing-masing detektor memiliki keunggulan dan kelemahan tergantung karakteristik senyawa yang akan dianalisis.

1. Analisis Gelatin

Kajian analisis gelatin menggunakan HPLC dengan detektor DAD dan UV dapat dilakukan pada panjang gelombang maksimal berturut-turut sebesar 225 nm dan 550 nm (Eyupoglu., 2020). Gelatin halal dan gelatin haram memiliki waktu retensi yang berbeda berdasarkan hasil analisis menggunakan HPLC-DAD dan HPLC-UV. Waktu retensi gelatin halal lebih cepat dibandingkan waktu retensi gelatin haram (Gambar 9.4). Hal ini menandakan bahwa gelatin halal memiliki komponen asam amino penyusun yang tidak berinteraksi kuat dengan fase diam.



Gambar 9.4. Perbandingan hasil kromatogram gelatin halal dan haram menggunakan HPLC-DAD (225 nm) dan HPLC-UV (550 nm) ((Eyupoglu., 2020)

Perbedaan waktu retensi pada gelatin halal dan gelatin haram dapat dijadikan penanda untuk mengidentifikasi gelatin halal dan gelatin haram. Kedua metode HPLC-DAD dan HPLC-UV ini juga memberikan nilai *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantification* (LOQ) berturut-turut sebesar 0,4-0,7 ppm dan 1,3-2,1 ppm. Hasil parameter pengujian lainnya disajikan dalam Tabel 9.1.

Tabel 9.1. menunjukkan bahwa metode HPLC dapat digunakan untuk analisis gelatin halal dan haram dengan nilai akurasi yang baik. Perbedaan detektor yang digunakan juga terlihat menghasilkan perbedaan pada beberapa parameter terutama parameter sensitifitas yaitu LOD dan LOQ. Perbedaan komposisi peptida pada gelatin sapi dan gelatin babi yang menyebabkan perbedaan waktu retensinya. Identifikasi peptida menunjukkan bahwa hidroksilasi prolin menjadi penanda pada gelatin sapi (urutan peptida: GPPGSAG**S**PGK) dan gelatin babi (urutan peptida: GPPGSAG**A**PGK) dimana gelatin sapi memiliki hidroksilasi prolin dengan serin dan gelatin babi memiliki hidroksilasi prolin dengan alanin (Zhang et al., 2009).

Tabel 9.1. Parameter Validasi pada analisis gelatin halal dan haram dengan HPLC-DAD dan HPLC-UV ((Eyupoglu., 2020)

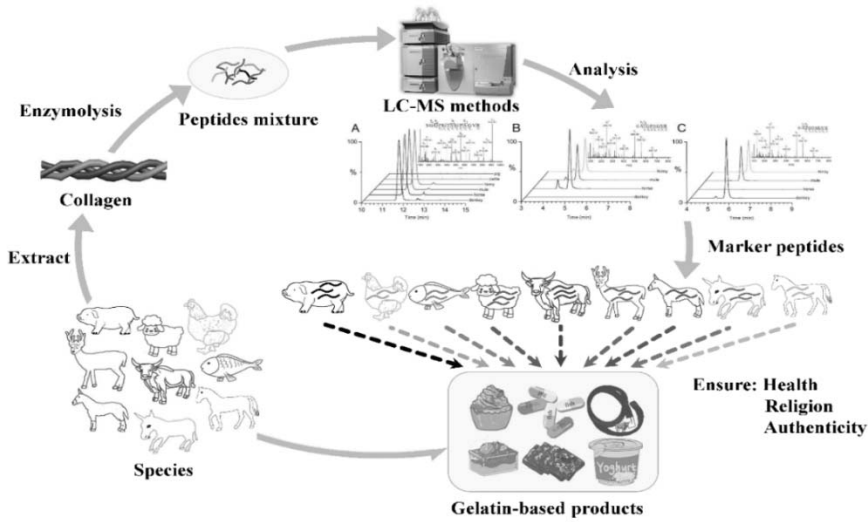
Parameter Pengujian	Metode HPLC	
	Detektor DAD	Detektor UV
Lambda maksimal (nm)	225	550
Konsentrasi kurva baku (ppm)	3,5-350 ppm	2,0-240
Linearitas	0,9997	0,9998
Akurasi (% rekovery)	96,750 – 98,850	97,945 – 99,765
Presisi (RSD,%)	<1,5	1,0
LOD (ppm)	0,6 ± 0,015*	0,5 ± 0,02*
	0,7 ± 0,025**	0,4 ± 0,01**
LOQ (ppm)	2,1 ± 0,045*	1,6 ± 0,01*
	1,8 ± 0,035**	1,3 ± 0,03**
Waktu retensi (Tr, menit)	11,5 ± 0,04	12,8 ± 0,04

*Gelatin halal; ** Gelatin haram

Berdasarkan hal tersebut, identifikasi gelatin halal dan gelatin haram dikembangkan metode analisis yang dapat melihat urutan ikatan peptidanya menggunakan HPLC yang ditandem spektrometri massa yang kita kenal dengan HPLC-MS/MS atau *Liquid chromatography mass spectrometry-mass spectrometry* (LC-MS/MS). Prinsip dasar analisis gelatin dengan LC-MS adalah suatu analisis *proteomic* dimana identifikasi gelatin halal ini akan menghasilkan marker peptida pada setiap hewan. Identifikasi halal melalui gelatin-based diilustrasikan dalam tahapan langkah Gambar 9.5.

Kemampuan LC-MS dalam mendeteksi campuran peptida ini menjadikan solusi untuk melihat perbedaan gelatin halal dan gelatin haram berdasarkan komposisi tersebut sehingga diperoleh marker peptidanya. Tingginya resolusi MS diharapkan akan dapat mendeteksi peptida unik pada babi (misal urutan peptida: GF**p**GS**p**GNVG PAGK) dimana babi mengandung 2 hidroksilasi p (p: hidroksi prolin).

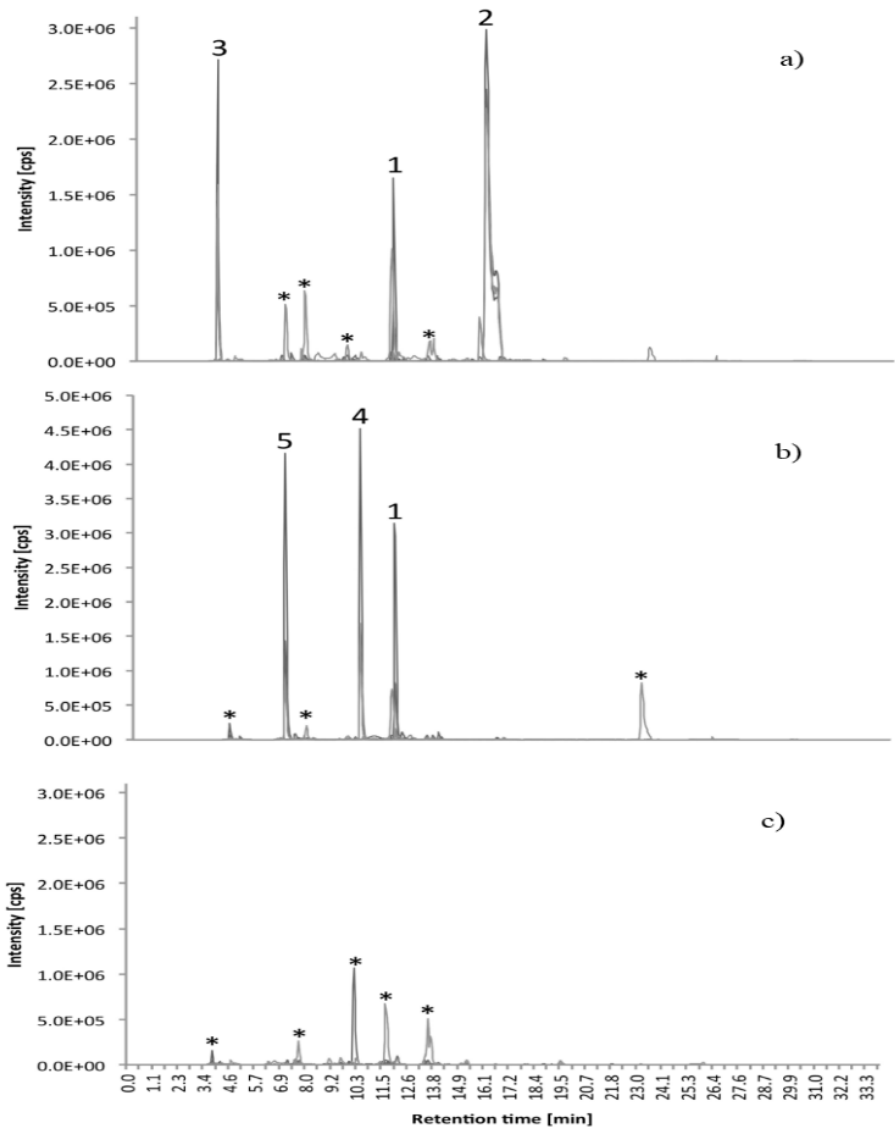
Hal ini sesuai dengan studi oleh Zang et al., (2009) bahwa hidrosilasi prolin menjadi penanda pada gelatin sapi (urutan peptida: GPPGSAG**SP**GK) dan gelatin babi (urutan peptida: GPPGSAG**AP**GK).



Gambar 9.5. Tahapan analisis halal dengan LC-MS (Huang, Li, Deng, Guo, & Zaman, 2020).

2. Analisis Protein

Protein merupakan suatu makromolekul yang tersusun oleh monomer asam amino seperti mentionin, sistin dan sistein melalui ikatan peptida. Sedangkan gelatin merupakan salah satu jenis protein dari hidrolisis dari kolagen pada tulang dan kulit. Oleh karena itu, analisis protein menggunakan HPLC-MS seperti analisis gelatin dengan melihat komponen asam amino penyusunnya. Berikut ini kromatogram analisis peptida marker pada produk yang dibuat dari pork, kuda dan daging sapi (Gambar 9.6).



Gambar 9.6. Hasil kromatogram suatu produk yang terbuat dari daging murni: a) Babi; b) Kuda; c) Sapi. Hanya 3 MRM (*multiple reaction monitoring*) yaitu merah, biru dan hijau. Warna merah: intensitas terbaik; warna biru: intensitas terbaik ke 2; warna hijau: intensitas terbaik ke 3. Tanda bintang: Peak tidak spesifik. Penomoran merupakan marker peptida dijelaskan pada Tabel 9.2 (Von Bargen et al., 2014)

Tabel 9.2. Karakteristik peptida marker untuk kuda dan babi (Von Bargen et al., 2014)

Mark er*	Spesies	Nama	Kode Akses	Urutan	Posisi AA**
1	Babi/ Kuda	Troponin T/protein tidak terkarakterisasi	Q75NG7/ F6 × 010	YDIINLR	239-245/ 185-191
2	Babi	Miosin-4	Q9TV62	TLAFLFAER	619-627
3	Babi	Miosin-1 dan Miosin-4	Q9TV61/ Q9TV62	SALAHAVQSSR	1331-1341/ 1329-1339
4	Kuda	Miosin-2	Q8MJV1	EFEIGNLQSK	1086-1095
5	Kuda	Miosin-1	Q8MJV0	LVNDLTGQR	1272-1280

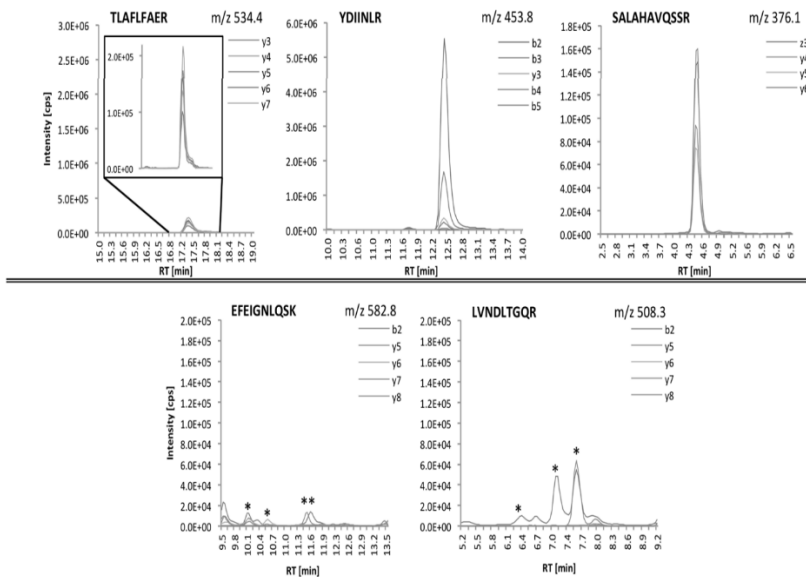
*Marker 1, 2, dan 4: Intensitas terbaik

**Posisi AA: lokasi suatu peptida biomarker pada protein target

Berdasarkan Gambar 9.6 menunjukkan bahwa marker 1 dapat sebagai marker kuda dan babi. Marker 1 memiliki urutan peptida yaitu YDIINLR. Oleh karena itu, deteksi Sampel yang memiliki puncak pada marker 1 memerlukan marker peptida pendukung lainnya untuk menyimpulkan bahwa sampel mengandung daging babi atau daging kuda. Deteksi babi dapat dilakukan dengan marker 2 dan 3 dimana marker 2 tersebut adalah marker dengan intensitas tertinggi. Sedangkan deteksi kuda dapat dilakukan dengan marker 4 dan 5 dimana marker 4 merupakan marker dengan sensitifitas baik (intensitas tinggi). Gambar 9.6 juga memperlihatkan bahwa deteksi babi dan kuda masih mungkin dengan puncak-puncak lainnya (peak tidak spesifik) akan tetapi studi ini belum menemukan jenis marker pada puncak tersebut. Data tersebut sudah dicukupkan untuk deteksi halal pada produk dikarenakan kehalalan produk adalah *zero tolerance*. Aplikasi penggunaan marker babi dan kuda seperti pada Gambar 9.7.

Gambar 9.7 menunjukkan bahwa sampel bakso yang dideeteksi menggunakan HPLC-MS dengan 5 marker sebelumnya dinyatakan mengandung babi dan tidak mengandung daging kuda. Hal ini sesuai dengan informasi yang diberikan bahwa bakso komersial ini

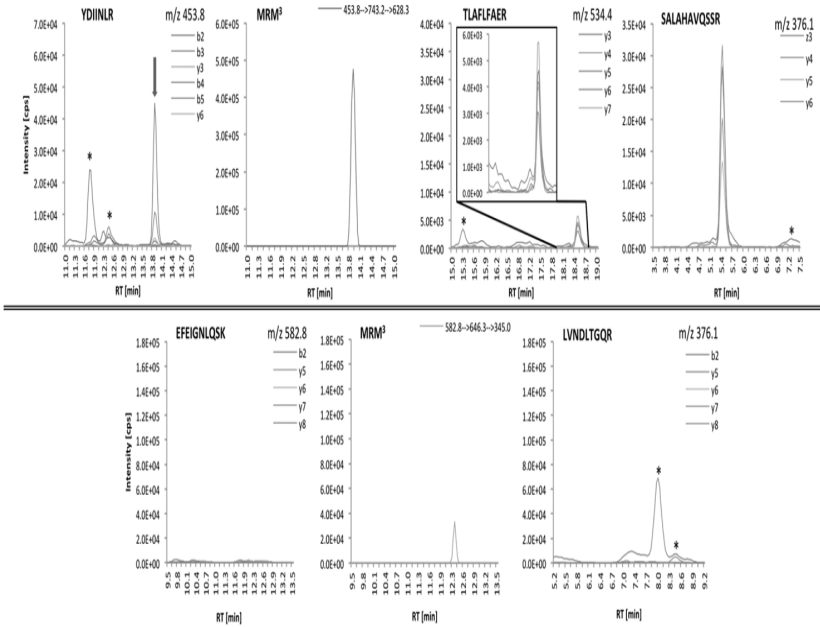
mengandung bakso. Hal ini dikarenakan hasil analisis halal pada bakso komersial menunjukkan bahwa 5 marker yang ada hanya marker 1 (YDIINLR), marker 2 (TLAFLFAER) dan marker 3 (SALAHAVQSSR) yang terdeteksi dalam sampel komersial tersebut (Gambar 9.7). Sedangkan marker 4 dan marker 5 tidak menunjukkan sebagai marker untuk daging kuda. Hal ini dikarenakan marker 4 dan 5 tidak menunjukkan satu puncak spesifik menunjukkan bakso komersial mengandung daging kuda akan tetapi hanya memiliki puncak-puncak tidak spesifik yang ditandai dengan dengan bintang (Gambar 9.7).



Gambar 9.7. Analisis bakso komersial mengandung babi. Marker 1 (YDIINLR) untuk deteksi babi/kuda; Marker 2 (TLAFLFAER) dan Marker 3 (SALAHAVQSSR) adalah spesifik untuk deteksi babi; Marker 4 dan Marker 5 digunakan spesifik untuk deteksi kuda. Tanda bintang: Peak tidak spesifik (Von Bargen et al., 2014).

Kasus lain pada *sauce Bolognese* memperlihatkan hasil kemiripan dengan Marker 1 (YDIINLR) untuk deteksi babi/kuda, Marker 2 (TLAFLFAER) dan Marker 3 (SALAHAVQSSR) yang spesifik untuk deteksi babi (Gambar 9.8). Seperti Gambar 9.7, hasil analisis halal

Gambar 9.8 juga menunjukkan bahwa *sauce Bolognese* komersial mengandung babi tetapi tidak mengandung kuda. Hal ini karena marker 4 dan marker 5 tidak menunjukkan puncak spesifik untuk daging kuda seperti Gambar 9.6B.



Gambar 9.8. Analisis *sauce Bolognese* komersial mengandung babi/kuda. Marker 1 (YDIINLR) dengan uji MRM³ untuk deteksi babi/kuda; Marker 2 (TLALFAER) dan Marker 3 (SALAHAVQSSR) adalah spesifik untuk deteksi babi; Marker 4 dengan uji MRM³ dan Marker 5 digunakan spesifik untuk deteksi kuda. Tanda bintang: Peak tidak spesifik (Von Bargen et al., 2014).

3. Analisis Triasilgliserol (TAG)

Selain untuk analisis gelatin, metode HPLC dapat digunakan untuk menentukan komposisi TAG pada komponen halal dan non halal. Analisis TAG dengan HPLC dapat dideteksi menggunakan detektor *refractive index* (RI) (Rohman, Triyana, Sismindari, & Erwanto, 2012; Fadzillah et al., 2017). Komposisi TAG pada berbagai minyak hewani dan minyak nabati tidak sama baik dari sisi jenis TAG dan kadarnya (Tabel 9.3 dan Tabel 9.4).

Tabel 9.3. Komposisi TAG pada berbagai jenis lemak hewan (Rohman et al., 2012)

Jenis TAG	Kadar (%)				
	Ayam	Sapi	Domba	Minyak ikan Cod	Babi
LaLaL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,28 ± 0,10	0,00±0,00	0,19 ± 0,08
LaLaLa	348 ± 0,23	4,00 ± 0,50	4,10 ± 0,89	18,32 ± 1,26	1,80 ± 0,42
MOLa	0,08 ± 0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,45 ± 0,03
OOLa	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,04	2,95 ± 0,17	4,56 ± 0,01
POL	0,08 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,02	7,04 ± 0,49	5,39 ± 0,01
POLa	0,64 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,07 ± 0,00	1,55 ± 0,08	4,26 ± 0,01
PPO	5,74 ± 0,07	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,04	3,24 ± 0,18	1,49 ± 1,55
MOP	3,38 ± 0,05	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,02	3,42 ± 0,05	1,12 ± 0,01
PLaP	8,43 ± 0,09	0,88 ± 0,04	0,34 ± 0,01	3,43 ± 0,14	5,13 ± 0,01
OOO	8,37 ± 0,10	1,00 ± 0,11	1,03 ± 0,04	5,78 ± 0,45	3,29 ± 0,13
POO	23,52 ± 0,06	10,76 ± 0,18	9,66 ± 0,25	11,71 ± 0,80	21,55 ± 0,08
PLaS	14,15 ± 0,04	13,51 ± 0,32	7,52 ± 0,08	3,83 ± 0,31	2,35 ± 0,04
POP	3,09 ± 0,13	0,00±0,00	6,48 ± 0,25	7,34 ± 0,45	5,10 ± 0,04
POS	5,77 ± 0,01	21,01 ± 0,44	19,44 ± 0,26	1,89 ± 0,06	14,08 ± 0,04
PPS	1,68 ± 0,01	11,83 ± 0,31	10,56 ± 0,18	4,94 ± 0,21	1,27 ± 0,01
SOS	0,66 ± 0,01	10,22 ± 0,23	16,12 ± 0,02	2,65 ± 0,30	1,71 ± 0,01
PSS	0,30 ± 0,00	8,17 ± 0,21	11,42 ± 0,40	2,48 ± 0,10	1,49 ± 0,01
SSS	0,00±0,00	0,00±0,00	5,19 ± 0,16	0,46 ± 0,25	0,17 ± 0,00

P= palmitic acid (16:0); S= stearic acid (18:0); O= oleic acid (18:1); M: asam miristat; La: asam laurat; L= linoleic acid (18:2).

Tabel 9.4. Komposisi TAG pada berbagai jenis minyak nabati (*Fadzillah et al., 2017; **Lee, et al., 2015; ***Marina, et al., 2009)

Jenis TAG	Kadar (%)				
	Mentega*	Minyak Kelapa**	Virgin Coconut Oils1***	Virgin Coconut Oils2***	CPO**
CClCl	4,57±0,52	1,29 ± 0,08	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
ClCIM	0,00±0,00	19,20 ± 0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
CpCpLa	6,06±0,42	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
CpLaLa	0,00±0,00	4,70 ± 0,05	1,12 ± 0,23	0,99 ± 0,23	0,00±0,00
CpCLa	5,02±0,64	0,00±0,00	4,08 ± 0,13	3,69 ± 0,38	0,00±0,00
CCLa	12,99±0,02	0,00±0,00	16,02±0,56	15,24±1,09	0,00±0,00
ClLaLa	12,34±0,14	4,33 ± 0,03	20,14±0,70	20,00±0,70	0,00±0,00
LaLaLa	15,8±0,18	19,2 ± 0,03	23,93±1,16	23,62±0,17	0,00±0,00
LaLaM	10,46±0,11	22,5 ± 0,04	14,53±0,83	15,43±0,94	0,00±0,00
LaLaO	5,02±0,60	0,00±0,00	1,57±0,24	1,58±0,24	0,00±0,00
LaLaP	3,65±0,06	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
LaMM	0,00±0,00	0,00±0,00	8,62±0,70	8,78±0,84	0,00±0,00
LaMO	5,38±0,07	0,00±0,00	1,33±0,27	1,29±0,15	0,00±0,00
LaMP	5,07±0,06	9,72 ± 0,23	4,85±0,07	4,85±0,45	0,00±0,00
LaOO	4,40±0,00	0,00±0,00	1,04±0,54	0,98±0,09	0,00±0,00
LaPP	0,00±0,00	0,00±0,00	1,50±0,68	1,85±0,12	0,00±0,00
LaPO	6,20±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
MOO	2,88±0,03	0,00±0,00	0,44±0,26	0,48±0,11	0,00±0,00
SOO	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,75 ± 0,16
POO	1,64±0,02	0,00±0,00	0,33±0,13	0,34±0,16	23,4 ± 1,00
PPO	1,80±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	29,0 ± 0,41
PPL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	12,2 ± 0,28
POS	0,40±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	5,39 ± 0,21
PPS	0,19±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,45 ± 0,52
SSO	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,34 ± 0,01

POL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	15,8 ± 0,83
OLL	0,00±0,00	4,75 ± 0,25	0,00±0,00	0,00±0,00	0,71 ± 0,04
PLL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,12 ± 0,19
MPL	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,77 ± 0,01
LLL	0,00±0,00	17,7 ± 0,19	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
PPP	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,16 ± 1,95

¹Asal Malaysia; ²Asal Indonesia

Cp= asam kaproat; Cl: asam kaprilat; C: asam kaprat; La: asam laurat; M: asam miristat; P: asam palmitat; S: asam stearat; O: asam oleat; L: asam linoleat.

Tabel 9.3. Menunjukkan bahwa komposisi TAG setiap hewan tidak sama. Hal ini menjadi dasar untuk analisis halal pada hewan dengan melihat komponen TAGnya. Komposisi TAG pada ayam yang dominan adalah POO, PLaS, OOO, dan PLaP yang besarnya berturut-turut adalah 23,52±0,06; 14,15 ±0,06; 8,37±0,10; dan 8,43±0,09. Berbeda dengan Ayam, komposisi TAG pada sapi yang dominan adalah POS, PLaS, PPS, SOS, POO, PSS yang kadarnya berturut-turut sebesar 21,01±0,44; 13,51±0,32; 11,83±0,31; 10,22±0,23; 10,76±0,18; dan 8,17±0,21. Sedangkan komposisi TAG pada babi memiliki TAG dominan seperti POO, POS, POL, PLaP, POP, OOLa, POLa, dan OOO yang kadarnya berturut-turut sebesar 21,55±0,08; 14,08±0,04; 5,39±0,01; 5,13±0,01; 5,10±0,04; 4,56±0,01; 4,26±0,01; dan 3,29±0,13. Perbedaan komposisi dominan ini memperjelas bahwa setiap hewan memiliki komposisi yang berbeda-beda.

Hal ini juga terlihat pada Tabel 9.4 bahwa setiap minyak nabati juga memiliki komposisi TAG yang berbeda-beda. Bukti-bukti ini dapat dijadikan dasar dalam proses autentikasi halal atau kemurnian bahan yang digunakan. Akan tetapi, problem dalam proses autentikasi halal dan kemurnian bahan sulit dilakukan jika dengan hanya melihat komposisi TAG tersebut dengan pengamatan mata. Oleh karena itu, pengolahan data TAG yang dihasilkan diperlukan

untuk mengambil kesimpulan yang tepat yaitu salah satunya dengan metode kemometrika yang akan dibahas pada sub-bab berikutnya. Masalah lainnya, Kompleksitas komersial produk dan proses pembuatannya menyebabkan analisis halal didasarkan pada komposisi TAG sangat sulit dikontrol. Hal ini dikarenakan TAG sangat mudah sekali terhidrolisis menjadi Diasilgliserol (DAG), Monoasilgliserol (MAG), gliserol, dan asam lemak bebas. Oleh karena itu, analisis halal direkomendasikan dengan melihat perbedaan asam lemak bebasnya bukan pada komposisi TAGnya.

4. Analisis Asam amino

Analisis halal berdasarkan komposisi asam amino merupakan analisis monomer terkecil penyusun protein. Pembahasan sebelumnya, gelatin halal atau gelatin haram dapat dianalisis berdasarkan komposisi ikatan peptida penyusunnya. Oleh karena itu, kehalalan gelatin juga dapat ditentukan berdasarkan komponen asam amino didalamnya. Perbedaan analisis halal antara *amino acid-based* dan *gelatin-based* dimana proses analisis asam amino dengan HPLC memerlukan agen penderivat sehingga asam amino dapat terdeteksi oleh detektor HPLC. Agen penderivat asam amino seperti ortho-phthalaldehyde dan 3-mercaptoethanol (OPA-MCE) (Widyaninggar et al., 2012); 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (Azilawati et al., 2015; Zilhada; Kusumaningrum, Farida; Supandi; Betha, 2018); O-Phthaldialdehyde 3-mercaptopropionic acid (OPA-3MPA) (Jorfi, et al., 2012), dan Orthophthaldialdehyde (OPA) and 4-chloro-7-nitro benzofurazane (NBD-Cl) (Nemati et al., 2004). Berdasarkan komposisi asam aminonya gelatin halal dan haram dapat dilihat pada Tabel 9.5.

Tabel 9.5. Komposisi asam amino pada gelatin babi, sapi dan ikan serta selisih perbedaannya (Azilawati et al., 2015).

Jenis asam amino	Kadar (%)			Selisih Perbedaan asam amino (%)		
	Gelatin sapi	Gelatin babi	Gelatin ikan	Sapi-Babi	Sapi-Ikan	Babi-Ikan
Hydroksi prolin	10,85 ± 0,54	10,91 ± 0,61	7,01 ± 0,37	0,06	3,84	3,90
Asam aspartat	4,92 ± 0,39	5,47 ± 0,33	5,55 ± 0,37	0,55	0,63	0,08
Serin	3,98 ± 0,16	4,27 ± 0,20	6,91 ± 0,23	0,29	2,93	2,64
Asam glutamat	9,26 ± 0,58	9,67 ± 0,58	9,23 ± 0,53	0,41	0,03	0,44
Glisin	23,05 ± 1,33	21,64 ± 2,70	22,37 ± 2,28	1,41	0,68	0,73
Arginin	8,80 ± 0,52	8,67 ± 0,47	9,23 ± 0,45	0,14	0,43	0,57
Teorinin	2,34 ± 0,12	2,18 ± 0,15	3,18 ± 0,15	0,16	0,84	1,00
Alanin	8,37 ± 0,73	8,05 ± 0,76	8,43 ± 0,73	0,32	0,06	0,37
Prolin	11,75 ± 0,53	11,21 ± 0,56	9,58 ± 0,38	0,54	2,18	1,64
Tirosin	0,63 ± 0,04	1,01 ± 0,07	0,72 ± 0,05	0,38	0,09	0,29
Valin	2,47 ± 0,32	2,33 ± 0,09	2,05 ± 0,05	0,14	0,42	0,28
Metionin	1,12 ± 0,20	1,51 ± 0,13	2,64 ± 0,11	0,39	1,51	1,12
Lisin	3,25 ± 0,27	3,78 ± 0,19	3,38 ± 0,27	0,53	0,13	0,41
Isoleusin	1,63 ± 0,13	1,56 ± 0,06	1,26 ± 0,04	0,07	0,37	0,30
Leusin	3,10 ± 0,12	3,10 ± 0,09	2,50 ± 0,06	0,00	0,59	0,60
Fenil alanin	2,38 ± 0,15	2,22 ± 0,15	2,31 ± 0,10	0,17	0,08	0,09

Berdasarkan Tabel 9.5 dan Tabel 9.6 Menunjukkan bahwa setiap gelatin hewan memiliki komposisi asam amino berbeda-beda. Perbedaan yang ada dapat dijadikan dasar untuk analisis halal. Kelemahan analisis halal dengan *amino-based* yaitu kesulitan dalam mengamati perbedaan secara langsung. Oleh karena itu, pengambilan kesimpulan analisis halal diperlukan metode kemometrik untuk membantu pengambilan kesimpulan tersebut. Metode kemome-

trik ini akan mengelompokkan gelatin yang memiliki kesamaan komposisi asam aminonya sehingga adanya perbedaan komposisi asam amino antara gelatin halal dan gelatin haram akan mudah diklasifikasikan. Pembahasan lebih lanjut mengenai aplikasi kemometrik dalam identifikasi komponen halal akan dibahas pada sub-bab selanjutnya.

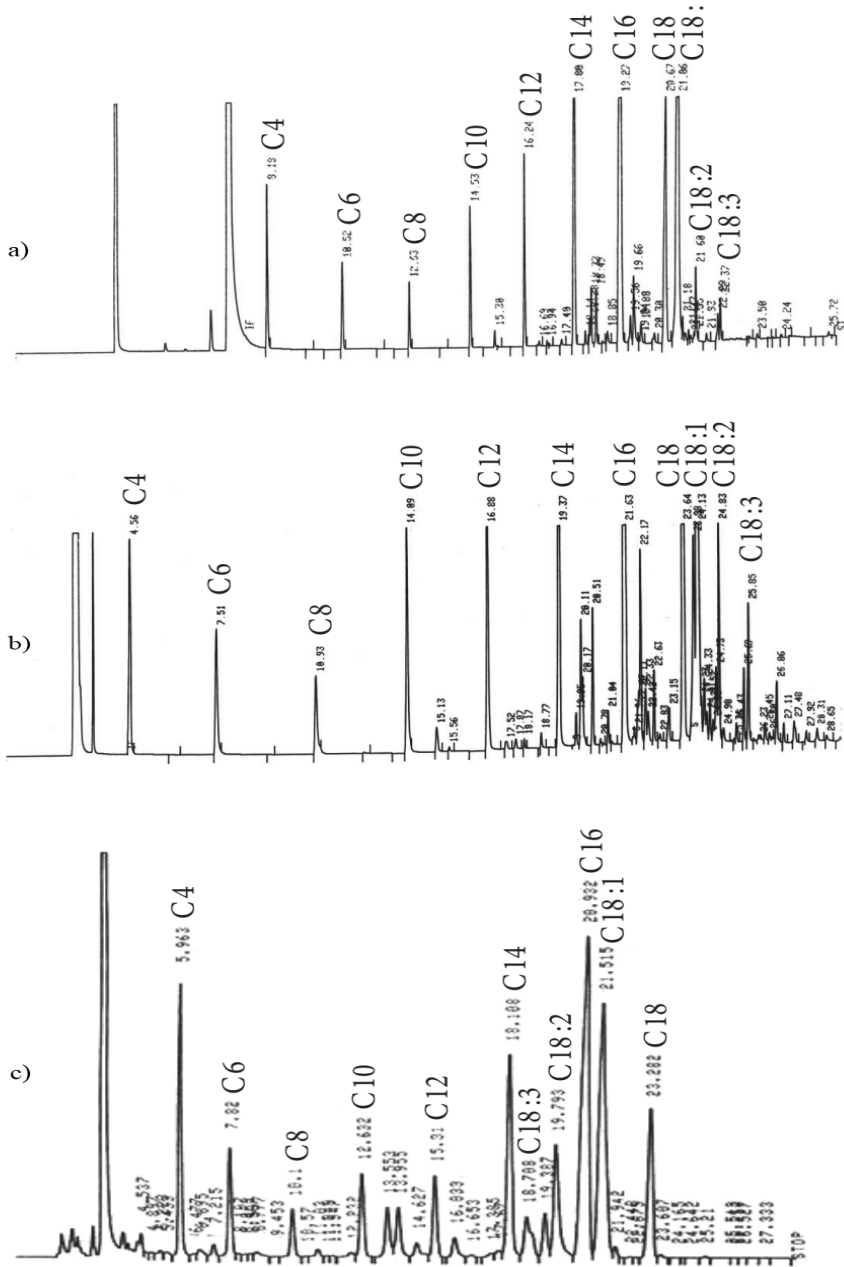
Tabel 9.6. Komposisi asam amino pada berbagai daging hewan (Jorfi, et al., 2012)

Jenis asam amino	Kadar asam amino (%)				
	Sapi	Domba	Chevon	Ayam	Babi
Histidin	5,89	6,24	5,28	7,29	6,74
Asam aspartat	2,82	2,92	2,98	2,70	2,86
Serin	4,06	4,16	4,20	3,81	4,15
Asam glutamat	7,81	7,81	8,26	7,11	7,67
Glisin	20,18	18,00	18,47	19,20	18,88
Arginin	8,66	9,95	8,37	9,27	8,54
Teorinin	3,03	2,88	3,42	3,96	2,76
Alanin	6,93	6,50	6,55	6,11	6,72
Prolin	8,17	8,66	8,46	7,43	8,15
Tirosin	2,13	2,36	2,45	2,40	2,27
Valin	4,33	5,63	4,50	5,79	4,05
Metionin	2,03	2,13	1,77	1,97	2,29
Lisin	8,05	8,35	8,42	7,83	8,23
Isoleusin	3,47	3,10	3,64	3,45	3,45
Leusin	7,08	5,82	7,13	6,94	7,26
Fenil alanin	3,05	3,02	3,25	3,01	3,14
Sistin	2,31	2,63	3,21	2,92	2,49

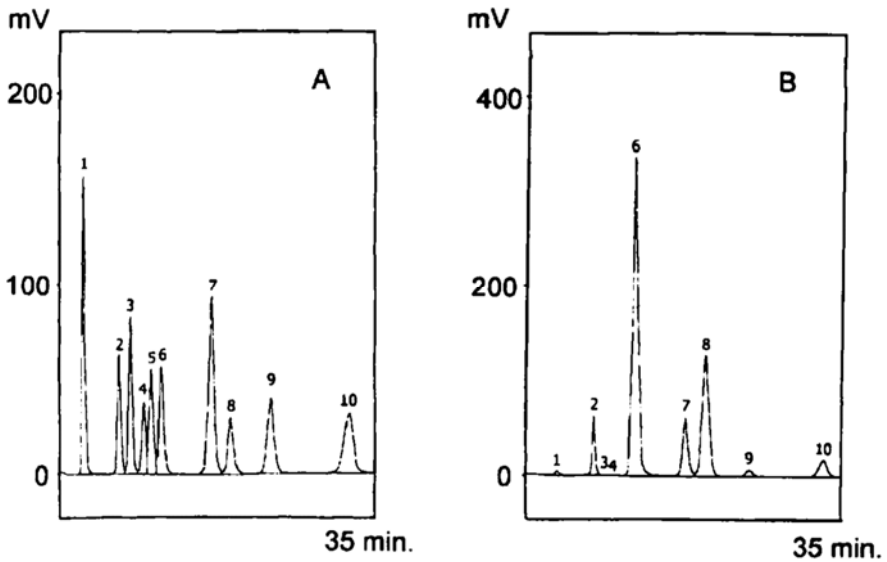
5. Analisis Asam Lemak

Ketidakstabilan TAG yang disebabkan adanya proses hidrolisis membentuk gliserol dan asam lemak selama proses pembuatan produk maka analisis halal produk akan lebih direkomendasikan pada analisis kandungan asam lemaknya. Akan tetapi analisis asam lemak menggunakan HPLC memerlukan detektor yang sensitif seperti sangat sulit dilakukan. Hal ini dikarenakan asam lemak memiliki serapan UV sangat kecil yaitu kisaran 205-210 nm sehingga asam lemak tersebut dapat diderivatisasi menggunakan reagen. Hasil studi dari Naviglio, Dellagreca, Ruffo, Andolfi, & Gallo, (2017) berhasil melakukan analisis asam lemak dengan agen penderifat *phenethyl ethanoate in phenyl ethanol*. Hasil identifikasi dan pemisahan asam lemak terderivatisasi menggunakan HPLC sama baiknya dengan hasil identifikasi asam lemak terderivatisasi menggunakan GC-FID (Gambar 9.9).

Selain proses derivatisasi pada asam lemak, analisis asam lemak menggunakan HPLC dapat dilakukan secara underivatisasi hanya tidak menggunakan detektor UV. Detektor *refractive index* (RI) adalah detektor yang dapat digunakan untuk analisis asam lemak secara langsung. Hasil analisis asam lemak underivatisasi dengan detektor RI dapat memisahkan jenis asam lemak yang berbeda (Gambar 9.10).



Gambar 9.9. Hasil kromatogram asam lemak pada GC (a dan b) dan HPLC (c): a) FA dalam fentil ester; b) FA dalam metil ester; dan c) FA dalam fenetil ester (Naviglio et al., 2017)



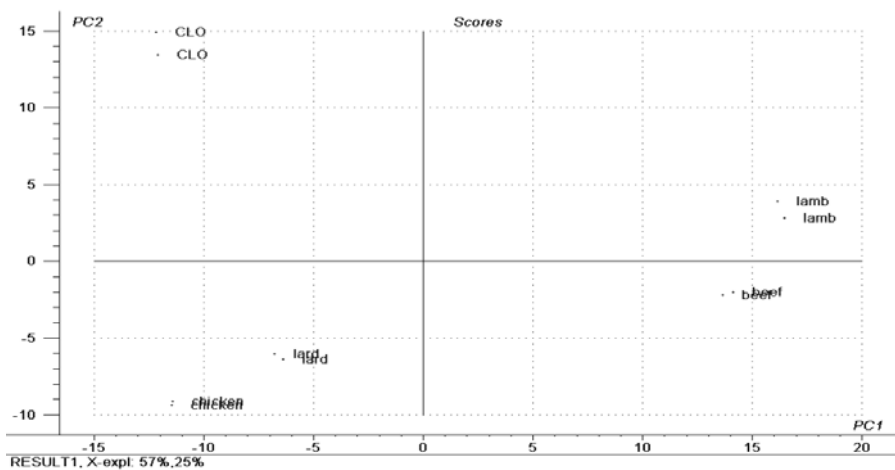
Gambar 9.10. Hasil analisis asam lemak underivatisasi dengan HPLC dan detektor RI (RID-6A-Shimadzu). A) Standar Campuran asam lemak; B) Sampel kedelai. 1) asam laurat; 2) asam linolenat; 3) asam miristat; 4) asam palmitoleat; 5) asam arakidonat; 6) asam linoleat; 7) asam palmitat; 8) asam oleat; 9) asam margarat; 10) asam stearat (Nishiyama-Naruke, Souza, Carnelós, & Curi, 1998).

Berdasarkan hasil ini, potensi analisis halal menggunakan HPLC dapat dilakukan dengan detektor RI. Seperti halnya analisis asam lemak menggunakan GC, analisis asam lemak menggunakan HPLC memerlukan panas yang lebih rendah (*low temperature*). Akan tetapi kebanyakan detektor HPLC adalah detektor UV, sehingga analisis asam lemaknya memerlukan tahapan derivatisasi yang dengan agen penderivat mahal dan katalis tertentu. Proses derivatisasi asam lemak ini menjadikan analisis halal menjadi tidak simpel dan sederhana. Oleh karena itu, analisis halal berdasarkan komponen asam lemaknya biasanya direkomendasikan menggunakan GC atau GC-MS di mana proses derivatisasinya hanya dengan metanol dalam keadaan asam atau basa.

D. Kombinasi Metode HPLC dan Kemometrik untuk Analisis Halal

1. Pengelompokan minyak hewani berdasarkan komposisi TAGnya

Berdasarkan hasil kajian sebelumnya, HPLC sebagai salah satu instrumen yang dapat digunakan dalam proses analisis kehalalan seperti analisis komponen peptida marker pada gelatin, analisis komponen TAG pada minyak nabati dan hewani, analisis komponen asam amino, dan analisis komponen asam lemaknya. Masing-masing analisis sangat tergantung pada sensitifitas detektornya.



Gambar 9.11. Pengelompokan lemak hewani berdasarkan komposisi TAG pada Tabel 9.3 (Rohman et al., 2012)

Detektor MS/MS akan mampu mendeteksi marker spesifik penanda bahan non-halal. Detektor lainnya mampu membedakan jenis komponen penyusunnya akan tetapi pengambilan kesimpulan terhadap data yang dihasilkan sangat rumit. Oleh karena itu, sub-bab kali ini akan mencoba mengolah data yang ada dengan bantuan metode kemometrik. Tabel 9.3 menampilkan bahwa setiap hewan tersusun TAG yang berbeda. Metode kemometrika akan mengolah data TAG masing-masing sehingga memudahkan dalam mengambil

kesimpulan. Hasil diskriminasi beberapa lemak/minyak hewani dapat dilihat pada Gambar 9.11.

Hasil pengalahan data minyak hewani berdasarkan komposisi TAGnya dapat terlihat bahwa lemak/minyak babi memiliki kemiripan dengan lemak/minyak ayam. Sedangkan lemak/minyak domba lebih memiliki kemiripan dengan lemak/minyak sapi. Hasil pengolahan data menggunakan metode kemometrika lebih memudahkan dalam mengambil kesimpulan terutama untuk analisis halal dikarenakan analisis tersebut bersifat *zero tolerance*.

2. Pengelompokan gelatin berdasarkan komposisi asam aminonya melalui proses derivatisasi

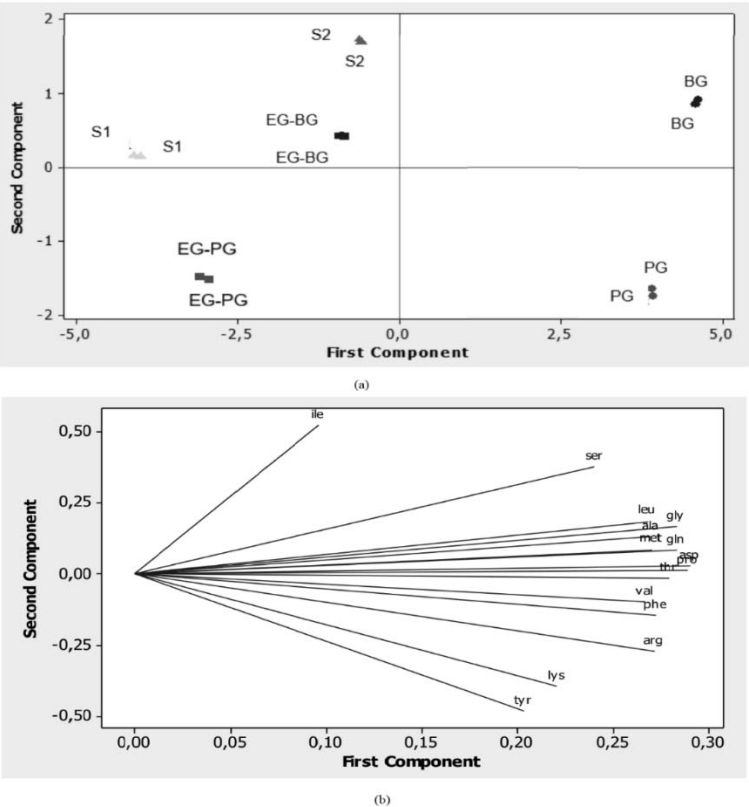
Selain pengelompokan berdasarkan komposisi TAG, analisis halal pada gelatin dapat juga dikelompokkan berdasarkan komposisi asam aminonya. Penelitian dari Zilhadia; Kusumaningrum, Farida; Supandi; Betha, (2018) melakukan analisis halal pada gelatin berdasarkan komposisi asam aminonya melalui proses derivatisasi sehingga asam amino dapat berfluorosensi dan dideteksi dengan detektor flourosensi. Penelitian lainnya mendeteksi kehalalan gelatin menggunakan LC-MS/MS setelah proses hidrolisis dengan enzim tripsin (Salamah, Erwanto, Martono, Maulana, & Rohman, 2019). Pemilihan prosedur derivatisasi atau tidak tergantung kemampuan deteksi detektornya terhadap senyawa yang akan dianalisis. Hasil komposisi asam amino pada gelatin halal dan produk permen seperti digambarkan pada Tabel 9.6.

Tabel 9.6. Komposisi asam amino pada gelatin Babi, sapi dan Produk permen (Zilhadia; Kusumaningrum, Farida; Supandi; Betha, 2018)

Jenis asam amino	Kadar asam amino (%)					
	Non Produk		EG dengan Vit C		CG dengan Vit C	
	BG	PG	BG	PG	S1	S2
L-Asam aspartat (asp)	5.116 ± 0.065	5.173 ± 0.086	0.493 ± 0.015	0.402 ± 0.053	0.253 ± 0.027	0.372 ± 0.011
L-Serin (ser)	3.539 ± 0.074	3.309 ± 0.009	0.374 ± 0.004	0.299 ± 0.004	0.203 ± 0.002	0.264 ± 0.000
L-Asam glutamat (glu)	10.510 ± 0.086	10.550 ± 0.010	0.996 ± 0.001	0.809 ± 0.014	0.573 ± 0.003	0.755 ± 0.005
Glisin (gly)	26.600 ± 0.077	25.860 ± 0.106	2.478 ± 0.003	1.990 ± 0.034	1.388 ± 0.014	1.940 ± 0.005
L-Histidin (his)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
L-Arginin (arg)	8.228 ± 0.085	8.608 ± 0.309	0.715 ± 0.001	0.599 ± 0.013	0.358 ± 0.000	0.410 ± 0.012
L-Teorinin (thr)	2.035 ± 0.098	2.233 ± 0.080	0.232 ± 0.008	0.171 ± 0.001	0.109 ± 0.002	0.150 ± 0.002
L-Alanin (ala)	8.106 ± 0.057	8.260 ± 0.092	0.789 ± 0.016	0.687 ± 0.012	0.429 ± 0.005	0.654 ± 0.014
L-Prolin (pro)	12.610 ± 0.054	12.930 ± 0.650	1.202 ± 0.027	1.032 ± 0.016	0.644 ± 0.005	0.937 ± 0.011
L-Sistin (sis)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
L-Tirosin (try)	0.324 ± 0.002	0.489 ± 0.074	0.032 ± 0.001	0.024 ± 0.000	0.013 ± 0.001	0.006 ± 0.000
L-Valin (val)	2.170 ± 0.011	2.447 ± 0.027	0.236 ± 0.007	0.199 ± 0.002	0.119 ± 0.002	0.180 ± 0.002
L-Metionin (met)	1.248 ± 0.106	1.117 ± 0.024	0.084 ± 0.005	0.043 ± 0.005	0.049 ± 0.001	0.061 ± 0.002
L-Lisin HCl (lys)	4.093 ± 0.047	4.607 ± 0.009	0.456 ± 0.000	0.386 ± 0.000	0.188 ± 0.001	0.243 ± 0.003
L-Isoleusin (Ile)	1.434 ± 0.026	1.183 ± 0.002	0.182 ± 0.005	0.105 ± 0.000	0.089 ± 0.000	0.108 ± 0.002
L-Leusin (leu)	2.654 ± 0.061	2.695 ± 0.028	0.306 ± 0.004	0.219 ± 0.003	0.144 ± 0.001	0.208 ± 0.001
L-Fenil alanin (phe)	1.894 ± 0.044	2.055 ± 0.035	0.179 ± 0.002	0.152 ± 0.002	0.106 ± 0.002	0.130 ± 0.001
Triptopan (tri)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000

BG: Gelatin sapi; PG: Gelatin babi; EG: Permen eksperimental; CG: Permen komersial; S: sampel ke

Tabel 9.6 menunjukkan bahwa gelatin babi dan gelatin sapi memiliki perbedaan komposisi asam aminonya. Selain itu, produk permen berbahan gelatin babi dan gelatin sapi juga berbeda jika dibandingkan sumber gelatinnya. Banyaknya data yang ada sangat menyulitkan untuk mengambil kesimpulannya. Hasil komposisi asam amino yang diperoleh kemudian dilakukan pengolahan data dengan salah satu jenis metode kemometrika yaitu PCA. Hasil penggolongan menggunakan PCA pada berbagai sumber gelatin dan produknya berdasarkan komposisi asam aminonya terlihat seperti Gambar 9.12.



Gambar 9.12. Hasil Pengolahan Tabel 7 dengan *Principal Component Analysis* (PCA); a) Score Plot; b) Loading Plot. BG: Gelatin sapi; PG: Gelatin babi; EG-BG: Permen standar dari gelatin sapi; EG-PG: Permen standar dari gelatin babi (Zilhadia; Kusumaningrum, Farida; Supandi; Betha, 2018).

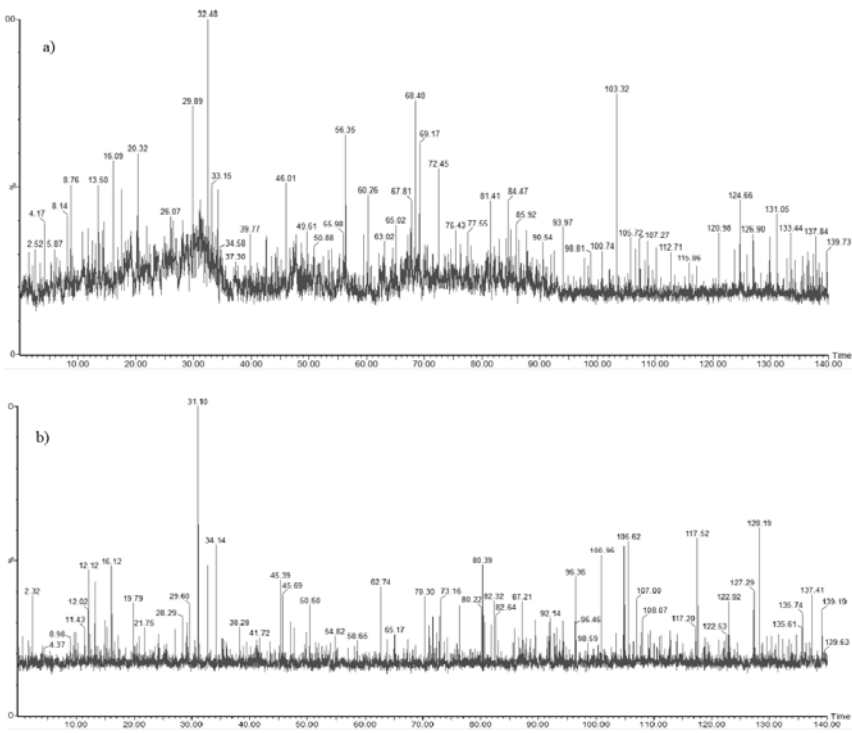
Gambar 9.12 memperlihatkan hasil sampel permen komersial (S1 dan S2) mengandung gelatin sapi. Hal ini dikarenakan letak S1 dan S2 berdekatan dengan permen standar berbahan gelatin sapi (Gambar 9.12a). Selain itu, permen standar berbahan gelatin sapi terletak berjauhan dengan sumber gelatinnya. Hal ini terjadi karena pembuatan permen memerlukan pencampuran bahan/matrik lainnya. Oleh karena itu, proses analisis halal pada suatu komersial produk dianjurkan agar komposisi matrik yang digunakan sebagai bahan standar/*reference* material mirip dengan produk komersialnya. Hal ini supaya menghindarkan/meminimalisir kesalahan yang terjadi dalam proses analisisnya. Berdasarkan Kemampuan pengelompokan antara komponen halal dan komponen non-halal menghasilkan hasil konsisten dalam aplikasi sampel komersial.

Hasil pengolahan PCA juga menunjukkan bahwa beberapa komponen asam amino yang sangat berperan pada PC1 dan PC2 (Gambar 9.12b). Berdasarkan *loading plot* diperoleh bahwa asam aspartat (asp), prolin (pro), asam glutamat (glu), dan glisin (gli) sangat berperan pada pembentukan PC1 sedangkan isoleusin (Ile), tirosin (tyr), lisin (lys) dan serin (ser) berkontribusi pada pembentukan PC2. Jenis asam amino seperti asam aspartat (asp), prolin (pro), asam glutamat (glu), dan glisin (gli) memiliki kontribusi pada PC1 dikarenakan jarak yang dekat dengan sumbu $x=0$ dengan nilai koefisiennya berturut turut 0,290; 0,289; 0,283; dan 0,283. Hal ini juga terjadi pada PC2, asam amino seperti isoleusin (Ile), tirosin (tyr), lisin (lys) dan serin (ser) memiliki nilai koefisiensi berturut turut 0,522; 0,480; 0,396; dan 0,375 (Zilhadia; Kusumaningrum, Farida; Supandi; Betha, 2018).

3. Pengelompokan gelatin berdasarkan komposisi asam aminonya tidak melalui proses derivatisasi

Pengelompokan gelatin berdasarkan komposisi asam amino-

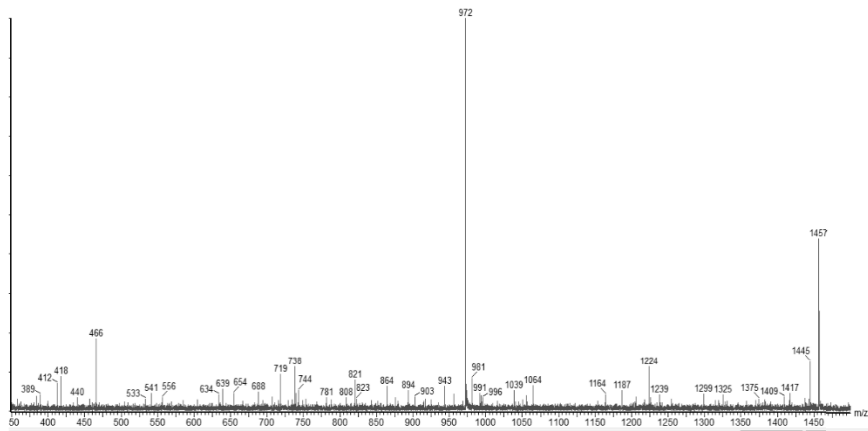
nya dapat dilakukan dengan metode derivatisasi atau underivatisasi. Hal ini tergantung kemampuan detektor dalam menangkap senyawa yang akan dianalisis. Sebelumnya telah dibahas mengenai pengelompokan gelatin halal dan gelatin non-halal berdasarkan komposisi asam aminonya dimana proses analisis asam aminonya melalui proses derivatisasi. Penentuan asam amino penyusun gelatin menggunakan LC-MS/MS merupakan metode analisis tanpa derivatisasi. Hasil penentuan asam amino pada gelatin terhidrolisis oleh enzim tripsin seperti Gambar 9.13.



Gambar 9.13. Hasil kromatogram hasil hidrolisis gelatin dengan enzim tripsin yang dianalisis dengan LC-MS/MS. a) Gelatin babi; b) Gelatin sapi (Salamah et al., 2019)

Gambar 9.13 menunjukkan bahwa gelatin babi ada peak dominan pada waktu retensi 32,48 menit dan 103,32 menit sedangkan

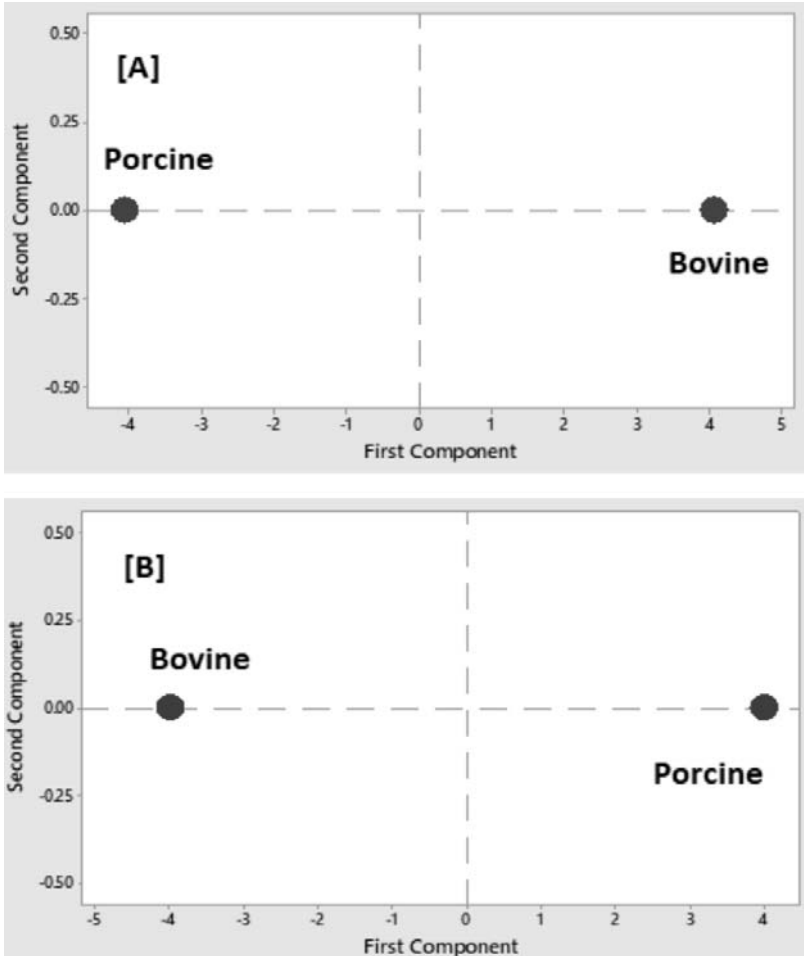
gelatin sapi peak dominan pada 31,1 menit. Berdasarkan kromatogram tersebut bahwa gelatin sapi dan gelatin babi memang berbeda. Selain dilihat dari komposisi asam amino penyusunnya, metode analisis gelatin menggunakan LC-MS/MS juga dapat dibedakan berdasarkan fragmentasi m/z pada peak dominannya. Gambar 14 merupakan salah satu peak dominan dari gelatin sapi pada waktu retensi 31,1 menit. Peak dominan gelatin sapi pada 31,1 menit memiliki fragmentasi utama pada m/z 972 dan memiliki pola fragmentasi seperti Gambar 9.14. Prinsip analisis halal dengan melihat pola fragmentasi m/z adalah untuk meminimalisir kesalahan yang mungkin bahan non-halal memiliki kromatogram yang mirip sehingga bahan tersebut tidak bisa dibedakan berdasarkan komponen penyusun monomernya akan tetapi hanya dapat dibedakan berdasarkan fragmentasi monomernya.



Gambar 9.14. Hasil fragmentasi pada peptida spesifik di gelatin sapi pada waktu retensi (tr) 3,1 menit (Salamah et al., 2019)

Hasil pengelompokan gelatin halal dan gelatin non-halal berdasarkan komposisi asam aminonya dan pola fragmentasi asam aminonya seperti Gambar 9.15. Pengelompokan gelatin sapi dan gelatin babi didasarkan komposisi asam amino dan pola fragmentasi m/z mampu membedakan keduanya. Hal ini merupakan langkah awal

yang perlu dilanjutkan aplikasinya produk yang lebih kompleks yang mungkin tidak dapat/sulit dibedakan menggunakan FTIR atau metode lainnya.



Gambar 9.15. Hasil pengelompokan gelatin berdasarkan: a) komposisi asam amino; b) fragmentasi m/z peak dominan (Salamah et al., 2019).

Berdasarkan penjelasan sebelumnya, analisis kehalalan gelatin berdasarkan komposisi asam aminonya baik melalui proses derivatisasi atau tanpa derivatisasi menghasilkan pengelompokan

yang sama (dapat membedakan gelatin halal dan gelatin non halal). Akan tetapi, proses derivatisasi kadang kala membutuhkan waktu yang lebih lama dan harga agen penderivat yang tidak murah. Selanjutnya, kombinasi metode analisis dengan kemometrika sangat membantu pengambilan kesimpulan peneliti sehingga mereka dapat meminimalisir waktu dibandingkan jika mengamati dan menelaah secara manual. Pemanfaatan metode kemometrika dalam analisis halal ini sangat direkomendasikan karena merupakan metode analisis canggih (*Advanced analytical method*) yang efisien dan simpel.

Referensi

- Azilawati, M. I., Hashim, D. M., Jamilah, B., & Amin, I. (2015). RP-HPLC method using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate incorporated with normalization technique in principal component analysis to differentiate the bovine, porcine and fish gelatins. *Food Chemistry*, 172, 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.093>
- Bélanger, J. M. R., Jocelyn Paré, J. R., & Sigouin, M. (1997). Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, 18(C), 37–59. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80011-X](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80011-X)
- Cooper, W. T. (2006). Normal-Phase Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5913>
- Eyupoglu., O. E. (2020). Halal Gelatin Analysis Using Developed On-line RP-HPLC-DAD-UV Henna Protein Detection in Confectionery and Food Supplements. *EC EMERGENCY MEDICINE AND CRITICAL CARE*, 10, 89–96.
- Fadzillah, N. A., Rohman, A., Salleh, R. A., Amin, I., Shuhaimi, M., Farahwahida, M. Y., ... Khatib, A. (2017). Authentication of butter from lard adulteration using high-resolution of nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-performance liquid chromatography. *International Journal of Food Properties*, 20(9), 2147–2156. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1233428>
- Huang, Y., Li, T., Deng, G., Guo, S., & Zaman, F. (2020). Recent advances in animal origin identification of gelatin-based pro-

- ducts using liquid chromatography-mass spectrometry methods: A mini review. *Reviews in Analytical Chemistry*, 39(1), 260–271. <https://doi.org/10.1515/revac-2020-0121>
- Ismail, B., & Nielsen, S. S. (2010). Chapter 27: Basic Principles of Chromatography. In *Food Analysis* (pp. 473–498). https://doi.org/doi:10.1007/978-1-4419-1478-1_27
- Jaswir, I., & Mirghani, M. E. S. (2017). Contemporary Issues and Development in the Global Halal Industry. *Contemporary Issues and Development in the Global Halal Industry*, (January), 291–300. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1452-9>
- Lee, S. T., Radu, S., Ariffin, A., & Ghazali, H. M. (2015). Physico-chemical characterization of oils extracted from Noni, Spinach, Ladys Finger, bitter gourd and mustard seeds, and copra. *International Journal of Food Properties*, 18(11), 2508–2527. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.986577>
- Marina, A. M., Che Man, Y. B., Nazimah, S. A. H., & Amin, I. (2009). Chemical properties of virgin coconut oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(4), 301–307. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1351-1>
- Mursyidi, A. (2013). The Role of Chemical Analysis in the Halal Authentication of Food and Pharmaceutical Products. *J.Food Pharm.Sci.*, 1(2013), 1–4.
- Naviglio, D., Dellagrecia, M., Ruffo, F., Andolfi, A., & Gallo, M. (2017). Rapid analysis procedures for triglycerides and fatty acids as pentyl and phenethyl esters for the detection of butter adulteration using chromatographic techniques. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9698107>
- Nemati, M., Oveisi, M. R., Abdollahi, H., & Sabzevari, O. (2004). Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(3), 485–492. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00574-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00574-0)
- Nhari, R. M. H. R., Ismail, A., & Che Man, Y. B. (2012). Analytical methods for gelatin differentiation from bovine and porcine origins and food products. *Journal of Food Science*, 77(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02514.x>
- Nishiyama-Naruke, A., Souza, J. A., Carnelós, M., & Curi, R. (1998). HPLC determination of underivatized fatty acids saponified at 37 °C analysis of fatty acids in oils and tissues. *Analytical Letters*, 31(14), 2565–2576. <https://doi.org/10.1080/00032719808005325>

- Ramin Jorfi, Shuhaimi Mustafa, Yaakob B Che Man, Dzulkifly B Mat Hashim, Awis Q Sazili, Abdoreza Soleimani Farjam, Leila Nateghi, and P. K. (2012). Differentiation of pork from beef, chicken, mutton and chevon according to their primary amino acids content for halal authentication. *African Journal of Biotechnology*, 11(32), 8160–8166. <https://doi.org/10.5897/ajb11.3777>
- Rohman, A., Triyana, K., Sisindari, & Erwanto, Y. (2012). Differentiation of lard and other animal fats based on triacylglycerols composition and principal component analysis. *International Food Research Journal*, 19(2), 475–479.
- Ruiz Orduna, A., Yang, C. T., Ghosh, D., & Beaudry, F. (2019). Goal Develop a simple, reliable, robust, sensitive, and specific HPLC-HRAM-MS assay for the detection of pork meat at low levels in meat products using specific peptide biomarkers. In *Meat authentication and adulteration testing by HPLC combined with high-resolution, accurate-mass (HRAM) mass spectrometry* (pp. 1–10). Thermo Fisher Scientific Inc.
- Salamah, N., Erwanto, Y., Martono, S., Maulana, I., & Rohman, A. (2019). Differentiation of bovine and porcine gelatines using lc-ms/ms and chemometrics. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(4), 159–163. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i4.30248>
- Syllabus, G. S. (2019). Chapter 13: Chromatography Techniques. In *Chemistry for Quensland Unit 1 & 2* (pp. 298–232). Oxford University Press.
- Von Bargaen, C., Brockmeyer, J., & Humpf, H. U. (2014). Meat authentication: A new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(39), 9428–9435. <https://doi.org/10.1021/jf503468t>
- Widyaninggar, A., Triyana, K., & Rohman, A. (2012). Differentiation Between Porcine and Bovine Gelatin in Capsule Shells Based on Amino Acid Profiles and Principal Component Analysis. *Indonesian J. Pharm*, 23(2), 104–109.
- Zhang, G., Liu, T., Wang, Q., Chen, L., Lei, J., Luo, J., ... Su, Z. (2009). Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: A new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 2001–2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.010>
- Zilhadia; Kusumaningrum, Farida; Supandi; Betha, O. S. (2018). Principal Component Analysis (Pca)-Combined High Perfor-

mance Liquid Chromatography (Hplc) for Differentiation of Bovine and Porcine Gelatin in Vitamin C Gummies. *International Research Journal Of Pharmacy*, 9(9), 30–34. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.099183>

BAB X

ANALISIS KEHALALAN PRODUK DENGAN LC-MS/MS

Anjar Windarsih¹

¹*Research Division for Natural Product Technology (BPTBA),
National Research and Innovation Agency (BRIN),
Yogyakarta, 55861, Indonesia.*

A. Pendahuluan

Metode analisis *liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) merupakan metode analisis yang menggabungkan kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Kromatografi cair berfungsi untuk memisahkan senyawa yang terkandung dalam sampel sedangkan spektrometer massa berfungsi sebagai detektor untuk mendeteksi ion atau fragmen senyawa dalam sampel. Terdapat tiga jenis pemisahan dalam kromatografi cair, yaitu fase normal (*normal phase*), fase terbalik (*reversed phase*), dan HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography*) [1]. Fase normal dan HILIC cocok untuk pemisahan senyawa-senyawa polar sedangkan fase terbalik cocok untuk pemisahan senyawa semi polar dan non-polar. Spektrometer massa terdiri dari tiga komponen utama, yaitu tempat ionisasi, *mass analyzer*, dan detektor. Terdapat berbagai jenis mode ionisasi dalam spektrometer massa. Mode ionisasi *electrospray ionization* (ESI) merupakan mode yang paling banyak digunakan karena memiliki beberapa keuntungan [2]. Untuk *mass analyzer* dapat dibagi menjadi tiga jenis, yaitu resolusi rendah (*low resolution*), resolusi sedang (*medium resolution*), dan resolusi tinggi (*high resolution*). *Mass analyzer* resolusi rendah seperti *Quadrupole*, *mass analyzer* resolusi sedang seperti *triple Quadrupole* dan *time of flight*

(TOF), sedangkan *mass analyzer* resolusi tinggi seperti *Orbitrap* dan *Fourier transform-ion cyclotron resonance* (FT-ICR). *Quadrupole* hanya mampu digunakan untuk *scanning MS1* dan tidak dapat dilakukan untuk *scanning MS2* (fragmentasi) [3]. *Quadrupole* sering dikombinasikan dengan *mass analyzer* yang lain seperti *Quadrupole time of flight (QTOF)* and *Quadrupole Orbitrap*. Kromatografi cair yang dikombinasikan dengan spektrometer massa resolusi tinggi seperti *Orbitrap* dan FT-ICR dikenal sebagai LC-HRMS (*liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*).

Analisis dengan LC-MS/MS memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk analisis komponen non-halal dalam suatu sampel. Terdapat dua macam pendekatan yang dapat digunakan untuk autentikasi halal dengan menggunakan LC-MS/MS, yaitu proteomik dan metabolomik [4]. Analisis proteomik telah banyak digunakan dalam autentikasi halal dengan menganalisis marker peptida, misalnya marker peptida dari protein babi untuk mendeteksi adanya daging babi dalam produk makanan [5]. Selain itu, analisis proteomik juga telah dilakukan untuk autentikasi halal gelatin dengan mendeteksi peptida marker pada kolagen babi [6]. Di lain sisi, analisis metabolomik saat ini mulai banyak dikembangkan untuk autentikasi halal. Metabolomik dengan pendekatan *non-targeted metabolomic* dapat digunakan untuk mengidentifikasi profil metabolit secara komprehensif pada sampel halal dan non-halal. Sehingga dapat diketahui perbedaan komposisi metabolit pada sampel halal dan non-halal [7].

Penggunaan statistika seperti kemometrika sangat diperlukan dalam analisis *non-targeted* metabolomik karena data yang dihasilkan sangat banyak. Kemometrika *pattern recognition* seperti *principal component analysis* (PCA), *partial least square-discriminant analysis* (PLS-DA), *orthogonal partial least square-discriminant analysis* (OPLS-DA), dan *soft independent class modeling analogy* (SIMCA)

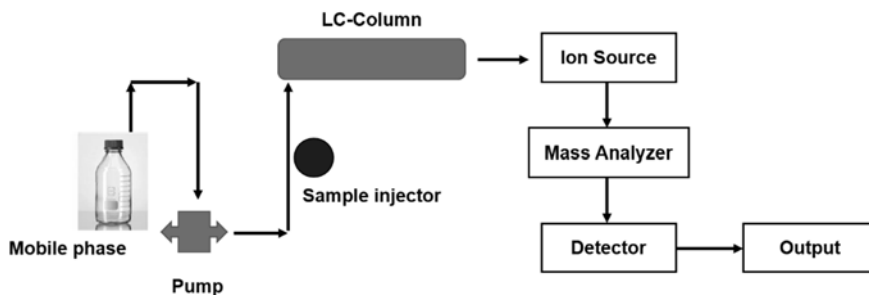
sering digunakan untuk pengelompokan, diskriminasi, dan klasifikasi sampel. Sedangkan kemometrika *partial least square* (PLS) dan *orthogonal* PLS (OPLS) digunakan untuk memprediksi target analit di dalam suatu sampel [8, 9]. Analisis dengan LC-MS/MS atau LC-HRMS menggunakan mode *non-targeted* yang dikombinasikan dengan kemometrika dapat digunakan untuk identifikasi biomarker potensial untuk membedakan sampel halal dan sampel non-halal.

Oleh karena itu, pengembangan metode analisis dengan LC-MS/MS untuk autentikasi kehalalan produk sangat berpotensi untuk memperoleh metode analisis yang efektif, efisien, akurat, sensitif, dan *powerful* dalam mendeteksi komponen non-halal dalam suatu produk.

B. Sistem Instrumentasi LC-MS/MS

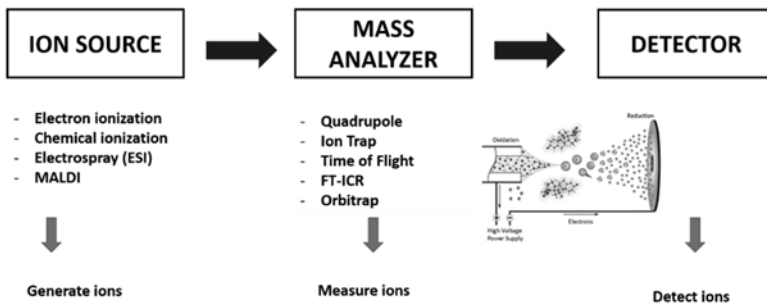
Kromatografi cair-tandem spektrometer massa (LC-MS/MS) terdiri atas dua instrument utama, yaitu kromatografi cair dan spektrometer massa. Kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) telah banyak dikombinasikan dengan detektor spektrometer massa untuk pemisahan senyawa-senyawa dalam sampel. Seiring dengan perkembangan teknologi, *ultra-high performance liquic chromatography* (UHPLC) saat ini mulai menggantikan HPLC konvensional untuk dikombinasikan dengan spektrometer massa. UHPLC memiliki keunggulan dibandingkan HPLC konvensional seperti, tekanan yang lebih tinggi, ukuran partikel lebih kecil, sensitivitas tinggi, spesifisitas yang lebih baik, dan resolusi tinggi. Kelebihan ini memberikan keuntungan tersendiri ketika dikombinasikan dengan spektrometer massa untuk analisis molekul-molekul dalam sampel [10]. Secara umum, skema LC-MS/MS ditunjukkan seperti pada gambar 10.1. Sistem kromatografi terdiri atas fase gerak, pompa, injector sampel, kolom untuk pemisahan senyawa. Kemudian analit dideteksi dengan menggunakan spektrometer massa yang terdiri atas *ion source*, *mass*

analyzer, dan detektor. Kemudian hasil yang dideteksi oleh detektor diinterpretasikan menjadi output dalam bentuk *total ion chromatogram* (TIC) [11].



Gambar 10.1. Skema LC-MS/MS [1]

Pada spektrometer massa, terdapat berbagai mode ionisasi seperti *chemical ionization* (CI), *electrospray ionization* (ESI), *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI), dan MALDI (*matrix assisted laser desorption ionization*). Mode ionisasi ESI merupakan mode ionisasi yang paling banyak digunakan dalam LC-MS/MS. Kemudian pada bagian *mass analyzer*, merupakan bagian yang menentukan hasil analisis karena berkaitan dengan resolusi. Terdapat beberapa *mass analyzer* yang mana masing-masing mempunyai kemampuan resolusi yang berbeda-beda. *Quadrupole/Ion trap* memiliki kemampuan *resolving power* antara 1000-10.000 FWHM (*full width at half maximum*). Sementara TOF juga memiliki kemampuan 10.000 FWHM sedangkan TOF resolusi tinggi sampai 60.000 FWHM. Sedangkan untuk Orbitrap memiliki kemampuan sampai 100.000 FWHM. FT-ICR memiliki kemampuan yang lebih tinggi dari Orbitrap [12]. Skema dari spektrometer massa ini ditunjukkan dalam gambar 2.



Gambar 10.2. Skema dari spektrometer massa [12]

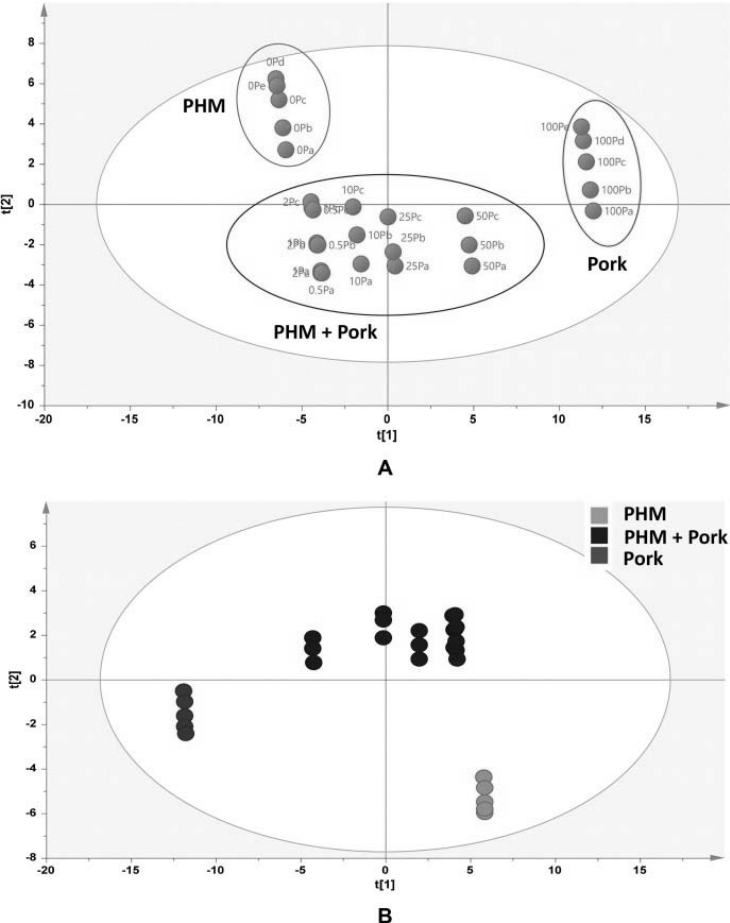
C. Analisis Daging Babi dengan Menggunakan LC-MS/MS *Based Metabolomics*

Analisis daging babi di dalam daging sapi telah berhasil dilakukan menggunakan LC-MS/MS oleh Trivedi dkk. (2016) [13]. Deteksi dilakukan dengan menganalisis komponen lipid menggunakan LC-MS/MS. Sampel daging sapi dengan menggunakan daging sapi dengan berbagai jenis kandungan lemak (5%, 15%, 20%, dan 23%) yang dicampurkan dengan daging babi yang mengandung lemak 5%. Pemalsuan dilakukan dengan beberapa seri konsentrasi daging babi. Kemudian dilakukan pengukuran metabolit lipid dengan menggunakan LC-HRMS. Analisis dilakukan dengan kolom C-18 dengan menggunakan fase gerak air dan metanol. Teknik yang digunakan adalah teknik gradien dengan laju alir 0.4 mL/menit dan waktu total analisis 30 menit. Analisis PLS-DA dengan menggunakan komponen metabolit lipid sebagai variable dalam membuat model, mampu membedakan sampel daging sapi murni, daging babi murni, dan daging sapi yang mengandung berbagai konsentrasi daging babi. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan metabolit pada daging sapi dan daging babi, sehingga ketika di dalam sampel daging sapi yang mengandung daging babi pada berbagai konsentrasi juga mengalami perubahan komposisi metabolit.

Deteksi daging babi yang dicampurkan dalam daging ikan patin juga telah berhasil dilakukan dengan menggunakan LC-HRMS yang dikombinasikan dengan kemometrika oleh Windarsih et al. (2022) [14]. Analisis dilakukan dengan pendekatan metabolomik menggunakan mode *non-targeted*. Metabolomik dengan LC-HRMS dapat digunakan untuk mengetahui komposisi metabolit pada daging ikan patin dan daging babi. Oleh karena itu, dengan adanya penambahan daging babi pada daging ikan patin, terdapat perubahan komposisi metabolit yang dapat diidentifikasi menggunakan LC-HRMS. Ekstraksi metabolit dilakukan dengan pelarut metanol pada seluruh sampel. Ekstrak kemudian dilakukan pengukuran dengan LC-HRMS mode *reverse-phase* (RP) dengan fase gerak air (A) dan metanol (B) yang mengandung asam format 0.1%. Analisis dilakukan dengan teknik gradien, total waktu 25 menit. Mode ionisasi baik positif maupun negatif digunakan dalam analisis metabolit.

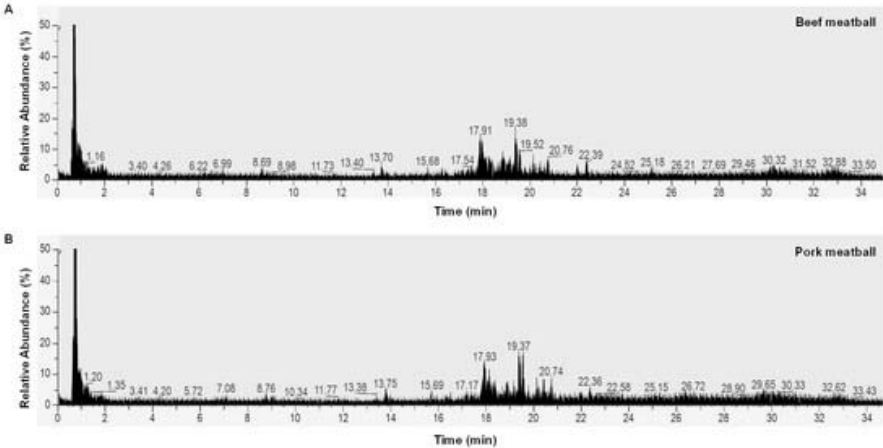
Analisis dengan kemometrika PCA dapat membedakan sampel daging ikan patin murni, daging babi murni, dan daging ikan patin yang dicampur dengan daging babi menggunakan beberapa konsentrasi. Analisis kemometrika PLS-DA mampu mengklasifikasikan dengan jelas antara daging ikan patin murni, daging babi murni, dan daging ikan patin yang dicampur dengan daging babi. Hasil analisis dengan PCA dan PLS-DA ini ditunjukkan pada gambar 3. Metabolit pembeda yang berperan pada diskriminasi sampel murni dan sampel yang dipalsukan dengan daging babi, dapat dianalisis dengan menggunakan *variable importance for projections* (VIP) dari PLS-DA. Sejumlah 15 metabolit yang berpotensi sebagai marker pembeda dapat diidentifikasi menggunakan analisis nilai VIP. Metabolit tersebut adalah PC (o-18:0/18:2(9Z,12Z)), DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), (2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecenal, (9R)-6-Hydroxy-6-oxido-12-oxo-5,7,11-trioxa-2-aza-6lambda ~ 5 ~ -phosphaheptacosan-9-yl palmitate, 1-(1Z-hexa-

decenyl)-2-(8Z,11Z,14Z-icosatrienoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, Dacisteine, Coumarone, 8-hydroxy-deoxyguanosine, 5-Formamidoimidazole-4-carboxamide ribotide, 1-(1Z-hexadecenyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, 2-Methylthiazolidine, 16,18-Tritriacontanedione, Pyrrolidine, Pyrophosphoric Acid, dan Xanthine. Hasil ini menunjukkan bahwa LC-HRMS dapat digunakan untuk mendeteksi dan menganalisis daging babi untuk autentikasi halal produk makanan.



Gambar 10.3. Analisis PCA (A) dan PLS-DA (B) untuk membedakan daging ikan patin, daging babi, dan daging ikan patin yang dicampur dengan daging babi [14].

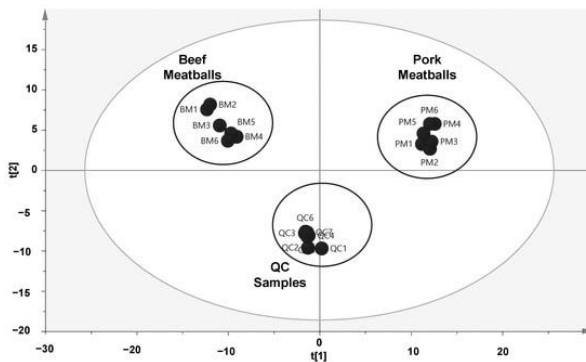
Selanjutnya, LC-HRMS yang dikombinasikan dengan kromatografi telah berhasil digunakan untuk mendeteksi adanya daging babi dalam bakso sapi dengan pendekatan *non-targeted* metabolomik [15]. Sampel bakso diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol, kemudian dilanjutkan dengan sonikasi selama 30 menit. Selanjutnya protein diendapkan dengan meletakkan sampel dalam freezer -20°C selama minimal 30 menit. Sampel ekstrak kemudian di sentrifugasi dan supernatant disaring dengan filter 0.22 mikron untuk dilakukan analisis dengan LC-HRMS. Analisis metabolomik dilakukan dengan mode *non-targeted* menggunakan fase gerak air dan metanol dengan teknik gradien. Gambar 4 menunjukkan total ion chromatogram (TIC) dari pengukuran sampel bakso sapi dan bakso babi dengan menggunakan LC-HRMS.



Gambar 10.4. Total ion chromatogram (TIC) bakso sapi (A) dan bakso babi (B) yang diukur menggunakan LC-HRMS [15]

Hasil analisis LC-HRMS kemudian dilakukan analisis dengan kemometrika. Analisis PCA dapat membedakan bakso sapi dan bakso babi dengan baik seperti ditunjukkan pada gambar 5. Selanjutnya analisis PLS-DA dan OPLS-DA mampu membedakan bakso sapi, bakso babi, dan bakso sapi yang mengandung daging babi

dengan berbagai konsentrasi. Semua sampel bakso sapi yang mengandung daging babi dapat diklasifikasikan dengan benar dan muncul terpisah dengan baik dari sampel bakso sapi. Analisis nilai VIP diperoleh metabolit pembeda yang potensial sebagai metabolit marker/pembeda antara bakso sapi dan bakso babi. Sebanyak 35 metabolit pembeda berhasil diidentifikasi dari nilai VIP pada model OPLS-DA. Selanjutnya, analisis kalibrasi multivariat OPLS mampu mendeteksi dan memprediksi konsentrasi daging babi yang terkandung dalam bakso sapi. Analisis dengan S-line plot menunjukkan metabolit yang berperan pada proses prediksi OPLS, yaitu 1-(1Z-hexadecenyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, acetyl-L-carnitine, DL-carnitine, anserine, hypoxanthine, linoleic acid, dan prolylleucine.



Gambar 10.5. Analisis PCA untuk membedakan bakso sapi dan bakso babi [15]

Berdasarkan hasil di atas dapat diambil kesimpulan bahwa analisis metabolomik dengan menggunakan LC-HRMS dan kemometrika dapat digunakan untuk autentikasi halal produk makanan. LC-HRMS dapat digunakan untuk identifikasi komposisi metabolit secara komprehensif dan dapat dilakukan untuk identifikasi metabolit yang berbeda pada setiap jenis sampel.

Referensi

1. Zeki ÖC, Eylem CC, Reçber T, Kır S, Nemutlu E (2020) Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. *J Pharm Biomed Anal* 190:Article#113509. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113509>
2. Muguruma Y, Nunome M, Inoue K (2022) A review on the foodomics based on liquid chromatography mass spectrometry. *Chem Pharm Bull* 70:12-18. <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00765>
3. Fraga-Corral M, Carpena M, Garcia-Oliveira P, Pereira AG, Prieto MA, Simal-Gandara J (2020) Analytical metabolomics and applications in health, environmental and food science. *Crit Rev Anal Chem* 52:712-734. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1823811>
4. Capozzi F, Trimigno A, Ferranti P (2017) Proteomics and metabolomics in relation to meat quality. Elsevier Ltd
5. Pan XD, Chen J, Chen Q, Huang BF, Han JL (2018) Authentication of pork in meat mixtures using PRM mass spectrometry of myosin peptides. *RSC Adv* 8:11157-11162. <https://doi.org/10.1039/c8ra00926k>
6. Guo S, Xu X, Zhou X, Huang Y (2018) A rapid and simple UPLC-MS/MS method using collagen marker peptides for identification of porcine gelatin. *RSC Adv* 8:3768-3773. <https://doi.org/10.1039/c7ra12539a>
7. Windarsih A, Rohman A, Riswanto FDO, Dachriyanus, Yuliana ND, Bakar NKA (2022) The metabolomics approaches based on LC-MS/MS for analysis of non-halal meats in food products: A review. *Agriculture* 12:984. <https://doi.org/10.3390/agriculture12070984>
8. Paul A, De P, Harrington B (2021) Chemometric applications in metabolomic studies using chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 135:Article#116165. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2020.116165>
9. Zettl D, Bandoniene D, Meisel T, Wegscheider W, Rantitsch G (2017) Chemometric techniques to protect the traditional Austrian pumpkin seed oil. *Eur J Lipid Sci Technol* 1600468:1-11. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600468>
10. Pascale R, Onzo A, Ciriello R, Scrano L, Bufo SA, Bianco G (2020) LC/MS Based Food Metabolomics. In: *Comprehensive Foodomics*. Elsevier, pp 39-53

11. Aszyk J, Byliński H, Namieśnik J, Kot-Wasik A (2018) Main strategies, analytical trends and challenges in LC-MS and ambient mass spectrometry-based metabolomics. *TrAC - Trends Anal Chem* 108:278–295.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.010>
12. Wu B, Wei F, Xu S, Xie Y, Lv X, Chen H, Huang F (2021) Mass spectrometry-based lipidomics as a powerful platform in foodomics research. *Trends Food Sci Technol* 107:358–376. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.045>
13. Trivedi DK, Hollywood KA, Rattray NJW, Ward H, Trivedi DK, Greenwood J, Ellis DI, Goodacre R (2016) Meat, the metabolites: An integrated metabolite profiling and lipidomics approach for the detection of the adulteration of beef with pork. *Analyst* 141:2155–2164
14. Windarsih A, Suratno, Warmiko HD, Indrianingsih AW, Rohman A, Ulumuddin YI (2022) Untargeted metabolomics and proteomics approach using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry to detect pork adulteration in *Pangasius hypophthalmus* meat. *Food Chem* 386:Article#132856.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132856>
15. Windarsih A, Riswanto FDO, Bakar NKA, Yuliana ND, Dachriyanus, Rohman A (2022) Detection of Pork in Beef Meatballs Using LC-HRMS Based Untargeted Metabolomics and Chemometrics for Halal Authentication. *Molecules* 27:8325.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES27238325/S1>

BAB XI

ANALISIS DERIVAT BABI DENGAN POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Sudjadi, Yuny Erwanto, dan Abdul Rohman

Center of Excellence, Institute of Halal Industry and Systems
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta Indonesia

A. Pendahuluan

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan suatu tehnik dalam biologi molekuler yang berdasarkan replikasi DNA dan dilakukan *in vitro* dan akan mengamplifikasi suatu fragmen DNA target menjadi $10^6 - 10^9$ kali jumlah DNA target awal. PCR merupakan metode multiplikasi molekul DNA target secara *in vitro* menjadi jumlah yang dapat dianalisis menggunakan bantuan enzim [1]. Pada awal 1980, Kary Mullis bekerja pada *Cetus Corporation* pada sintesis DNA untuk bidang bioteknologi. Dia menggunakan oligonukleotida DNA sebagai pelacak untuk mencari DNA target dan penggunaan primer untuk sekuensing DNA serta penggunaan primer untuk sintesis cDNA. Pada tahun 1983, dia mulai mengembangkan dengan menggunakan dua primer pada suatu DNA target, dan menambahkan DNA polimerase. Pada reaksi ini terjadi replikasi DNA secara eksponensial, menghasilkan fragmen DNA dengan batas kedua primer itu dalam jumlah banyak (dengan panjang 100 -600 basa dalam bentuk molekul DNA untai ganda). Akan tetapi, setelah satu kali replikasi campuran itu perlu dipanaskan di atas 90°C supaya terjadi denaturasi DNA yang baru saja terbentuk sehingga terbentuk DNA untai tunggal yang menjadi cetakan pada amplifikasi selanjutnya. Pemanasan ini juga menyebabkan fragmen Klenow DNA polimerase I dari *E.coli* terdenaturasi sehingga setelah pemanasan itu perlu ditambah

kan DNA polimerase baru [2].

Pada sintesis DNA diperlukan dNTP, Mg^{++} , DNA polimerase, dan sepasang primer, masing-masing dengan panjang sekitar 20 nukleotida, yang komplemen dengan urutan tertentu pada setiap dari dua untai DNA. Primer ini diperpanjang oleh DNA polimerase sehingga terbentuk untai DNA baru untai ganda. Setelah membuat ini, DNA diubah menjadi DNA untai tunggal dan molekul primer hibridisasi dan kemudian terjadi polimerisasi, tidak hanya menempel pada untai DNA awal tetapi dapat juga menempel untai pendek yang dibuat pada siklus pertama. Hal ini akan terjadi amplifikasi eksponensial. Pada setiap siklus suhu dinaikkan untuk memisahkan dua untai DNA menjadi DNA untai tunggal. Oleh karena itu diperlukan DNA polimerase yang tahan panas. Sebagaimana istilah namanya, DNA polimerase digunakan dalam metode ini untuk membuat salinan DNA menggunakan molekul DNA *template* yang sudah ada. Selanjutnya, setiap DNA yang baru saja disintesis akan menjadi *template* DNA pada proses selanjutnya, sehingga akan terjadi reaksi berantai yang akan menghasilkan salinan DNA secara eksponensial. Metode PCR hanya akan mengamplifikasi sekuen target tertentu dalam sampel DNA kompleks yang ditentukan oleh potongan kecil DNA beruntai tunggal yang disebut primer [3].

Taq polimerase merupakan enzim termostabil yang diperoleh dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus* yang diisolasi oleh Thomas D. Brock pada 1965. *T. aquaticus* merupakan bakteri yang hidup dalam sumber air panas sehingga Taq polimerase merupakan enzim yang tahan pada suhu tinggi yang diperlukan pada PCR. Oleh karena itu enzim ini menggantikan fragmen Klenow polymerase dari *E.coli*. Taq polimerase mempunyai suhu optimum pada 75–80°C, dengan waktu paro lebih 2 jam pada 92.5°C, 40 menit pada 95°C dan 9 menit pada 97,5°C, dan dapat melakukan relipasi 1000 basa untai DNA kurang dari 10 detik pada 72°C. Kelemahan enzim ini tidak mempu-

nyai aktivitas *proofreading* eksonuklease 3' ke 5' sehingga dapat menimbulkan kemungkinan kesalahan pemasangan basa sekitar 1 dalam 9.000 nukleotida. Pada kondisi normal, *Taq polimerase* dapat digunakan 30 - 40 siklus. Beberapa DNA polimerase termostabil telah diisolasi di antaranya adalah *Pfu* DNA polimerase yang mempunyai aktivitas *proofreading* [4]. Setelah beberapa siklus amplifikasi (30-40 siklus), produk PCR (amplikon) dianalisis pada gel agarose, dan dalam jumlah cukup DNA dideteksi dengan pewarnaan etidium bromid. Metoda analisis ini bersifat kualitatif untuk mendeteksi ada atau tidak ada untai DNA yang dikehendaki atau dapat diusahakan menjadi semi-kuantitatif. Dalam banyak hal, jumlah amplikon ini sulit dihubungkan dengan jumlah DNA awal. Dengan demikian, dari seluruh kemajuan teknologi di bidang biologi molekular modern, PCR dan berbagai variasinya merupakan salah satu metode yang paling umum digunakan [5]. PCR telah diaplikasikan pada setiap bidang biologi molekular dan bioteknologi, baik dasar maupun terapan, mulai dari analisis dan manipulasi DNA, ilmu forensik, diagnosis medis, terapi gen, tanaman dan hewan transgenik, dan analisis lingkungan, serta dalam analisis farmasi dan makanan termasuk untuk analisis autentikasi halal [6]. PCR juga merupakan metode standar (*gold method*) untuk deteksi virus yang menyebabkan penyakit Covid 19 [7].

B. Prinsip dan Prosedur PCR

PCR digunakan untuk amplifikasi daerah tertentu dari suatu untai DNA (target DNA). Untuk keperluan deteksi umumnya metoda PCR mengamplifikasi fragmen dengan panjang sekitar 100 - 600 pasang basa. Sedangkan untuk keperluan kloning dapat mengamplifikasi sampai 10.000 pasang basa, bahkan beberapa teknik ini dapat mengamplifikasi dengan panjang sampai 40.000 pasang basa [8]. Reaksi pada PCR memerlukan beberapa senyawa dan pereaksi [9],

yang meliputi:

- 1) *Cetakan DNA* yang membawa daerah yang diamplifikasi. DNA *template* merupakan DNA untai ganda yang diamplifikasi dengan sistem PCR. *Template* akan mendefinisikan sekuen DNA, di mana nukleotida yang baru akan ditambahkan selama proses PCR. DNA yang diisolasi dari sumber mana pun dapat digunakan sebagai *template* asalkan mengandung target sekuen. DNA target dimungkinkan merupakan bagian dari sampel DNA yang kompleks, yang mengandung banyak genom dari organisme yang berbeda. Meskipun begitu, diperlukan informasi mengenai sekuen DNA target, sehingga dapat merancang primer yang sesuai
- 2) *Dua primer* yang komplemen pada ujung 3' pada setiap untai target DNA (untai sense dan anti-sense). Primer adalah DNA untai tunggal pendek yang berkomplemen dengan sekuen di kedua ujung segmen DNA target (Clark et al., 2019). Untai DNA polinukleotida pendek tersebut memiliki gugus 3' hidroksil bebas, atau disebut ujung 3'. Gugus 3' hidroksil bebas pada primer dibutuhkan oleh DNA polimerase untuk menambahkan nukleotida baru selama proses ekstensi. Pada reaksi PCR, dibutuhkan 2 jenis primer, yakni primer untuk untai *sense* DNA *template*, yang disebut *forward primer*, dan primer untuk untai *antisense* DNA *template*, yang disebut *reverse primer*
- 3) *Taq polimerase* atau DNA polimerase lainnya yang tahap pada pemanasan dengan suhu optimum sekitar 70°C. DNA polimerase merupakan enzim yang membentuk polimer DNA dengan menggabungkan *individual*. DNA polimerase yang paling umum digunakan adalah Taq DNA polymerase, polimerase termostabil yang diisolasi dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*.

- 4) *Deoksinukleosida trifosfat* (dNTP; nukleotida yang mengandung gugus trifosfat), merupakan substrat bagi DNA polimerase untuk mensintesis untai baru. Komponen dNTP merupakan DNA *building block* yang dibutuhkan DNA polimerase untuk membuat salinan DNA baru. Sistem PCR membutuhkan empat dNTP yang berbeda untuk mensintesis untai DNA baru: adenine (A), guanine (G), cytosine (C), thymine (T). Umumnya dNTP diberikan pada konsentrasi 200 μM dalam campuran reaksi. Konsentrasi keempat dNTP harus sama dalam campuran reaksi, karena konsentrasi yang tidak sama, bahkan dari satu dNTP tunggal, dapat menyebabkan kesalahan penggabungan nukleotida oleh DNA polimerase.
- 5) *Larutan bufer* memberikan lingkungan kimiawi yang cocok supaya terjadi aktivitas dan stabilitas optimum bagi DNA polimerase.
- 6) *Kation bervalensi dua*, ion magnesium atau mangan; umumnya digunakan Mg^{2+} , tetapi Mn^{2+} dapat juga digunakan untuk mutagenesis DNA dengan PCR, semakin tinggi konsentrasi Mn^{2+} menaikkan kesalahan pada sintesis DNA.
- 7) *Kation monovalen, ion kalium*.

PCR biasanya dilakukan dalam volume reaksi 50 μL dalam tabung reaksi kecil (volume 0,2–0,5 mL) dalam alat PCR (*thermal cycler*). Alat ini memanasi dan mendinginkan tabung reaksi untuk mencapai suhu yang diinginkan pada setiap tahap reaksi. Banyak alat PCR modern menggunakan efek Peltier sehingga pemanasan dan pendinginan bagian penyangga tabung reaksi PCR hanya dengan mengubah arah arus listrik. Dinding tabung reaksi yang tipis menyebabkan penghantaran panas lebih baik sehingga cepat mencapai keseimbangan. Kebanyakan alat PCR mempunyai sistem dengan tutup terpanasi sehingga mencegah kondensasi pada tutup

tabung reaksi. Alat PCR lama tanpa pemanas ini sehingga diperlukan penambahan minyak pada campuran larutan pereaksi dalam tabung [10].

C. Proses Amplifikasi

Proses PCR meliputi sejumlah siklus untuk amplifikasi suatu sikuen DNA tertentu. Setiap siklus amplifikasi terdiri dari tiga tahap berturutan (Gambar 11.1). Secara rinci, tahapan-tahapan dalam PCR adalah sebagai berikut:

- 1) *Tahap permulaan:* Tahap ini merupakan modifikasi dari cara kerja konvensional, yang terdiri dari pemanasan larutan campuran sehingga suhu 94–96 atau bahkan 98°C, selama 5–15 menit. Pada beberapa sediaan, aktivitas polimerase dihambat oleh antibodi yang berikatan dengan polimerase atau oleh efektor yang berikatan secara kovalen dengan enzim, yang akan mengalami disosiasi setelah pemanasan ini. Tahap ini diperlukan untuk DNA polimerases yang memerlukan pengaktifan dengan pemanasan dengan *hot-start* PCR. Pada tahap ini DNA kromosom juga mengalami denaturasi menjadi DNA untai tunggal. Ada beberapa enzim yang dijual tanpa memerlukan pengaktifan dengan pemanasan.
- 2) *Tahap denaturasi:* Tahap ini merupakan kejadian siklus pertama yang terdiri dari pemanasan reaksi pada suhu 94 °C selama 20-30 detik. Pada keadaan ini menyebabkan cetakan DNA meleleh karena merusak ikatan hidrogen antara basa komplemennya, menghasilkan molekul DNA untai tunggal. Pada proses denaturasi, sampel DNA diubah dari DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal dengan melakukan pemanasan hingga sekitar 94°C. Panas akan memutus ikatan hidrogen yang menyatukan 2 basa komplementer. Proses denaturasi harus dipastikan sesuai untuk memisahkan untai

ganda DNA *template* sepenuhnya, karena untai yang telah terpisah dapat dengan cepat akan menempel kembali (*reanneal*) ketika temperatur diturunkan, dan mengakibatkan primer tidak bisa menempel [11].

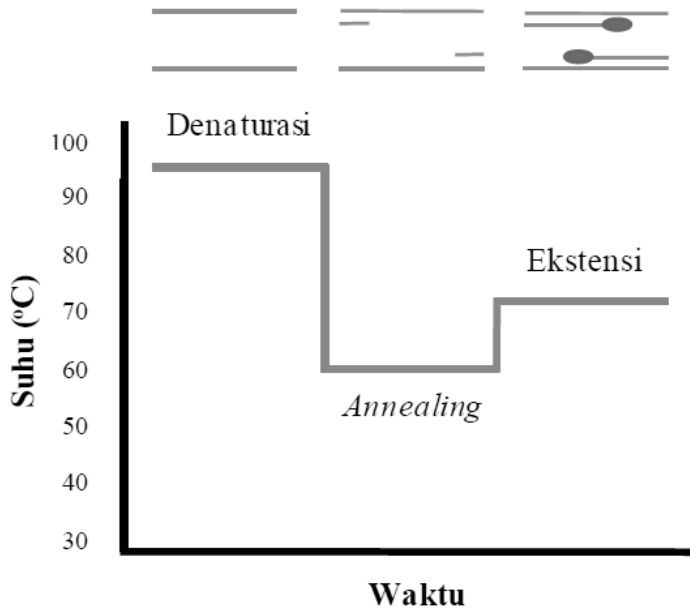
- 3) *Tahap hibridisasi primer*: Suhu larutan reaksi diturunkan sampai 50–65 °C selama 20–40 detik sehingga sepasang primer itu akan hibridisasi/menempel pada daerah komplemennya pada cetakan DNA untai tunggal (Gambar 2). Umumnya suhu hibridisasi primer ini sekitar 3–5°C dibawah suhu T_m primer yang digunakan. Ikatan hidrogen DNA-DNA hanya terbentuk jika urutan primer cocok atau agak cocok dengan urutan pada cetakan DNA. Taq polimerase menempel pada hibrid cetakan-primer dan mulai sintesis DNA. Jika suhu hibridisasi terlalu tinggi maka rendah kemungkinan primer menempel ke target sehingga jumlah amplikon yang dihasilkan tendah. Akan tetapi jika suhu hibridisasi ini terlalu rendah maka primer akan menempel pada non target dengan berpasangan yang kurang cocok sehingga menghasilkan amplikon yang tidak spesifik. Kekuatan suatu reaksi atau stabilitas hibridisasi dipengaruhi oleh konsentrasi garam.
- 4) *Tahap perpanjangan/polimerisasi*: Suhu pada tahap ini tergantung pada jenis DNA polimerase yang digunakan; Taq polimerase mempunyai aktivitas optimum pada suhu 75–80°C, dan biasanya digunakan suhu 72°C. Pada tahap ini DNA polimerase mensintesis untai DNA baru yang komplemen dengan cetakan DNA dengan menambahkan dNTP yang merupakan pasangan cetakan dengan arah dari 5' ke 3' dengan reaksi gugus fosfat dNTP dengan gugus hidroksil pada ujung untai DNA baru. Waktu yang diperlukan untuk reaksi ini tergantung pada DNA polimerase yang digunakan

dan panjang fragmen yang diamplifikasi. Pada suhu optimum, DNA polimerase akan mempolimerisasi seribu basa permenit tergantung jenis DNA polimerase yang digunakan. Pada kondisi optimum, misal jika tidak ada keterbatasan substrat atau pereaksi lainnya, pada setiap tahap perpanjangan, jumlah target DNA menjadi dua kalinya, sehingga terjadi amplifikasi eksponensial jumlah fragmen DNA pada bagian itu. Reaksi ini kemudian menurun ketika jumlah substrat menjadi terbatas dan reaksi berhenti atau mencapai plateau jika sistem itu sudah kelelahan.

- 5) *Perpanjangan akhir*: Tahap ini biasanya dilakukan dengan mengatur suhu pada 72°C selama 5–15 menit setelah siklus PCR terakhir. Hal ini diperlukan untuk meyakinkan bahwa semua DNA mempunyai ukuran penuh.
- 6) *Penghentian reaksi*: Pada tahap ini suhu diatur pada 4°C sehingga reaksi enzimatik berhenti selama waktu yang tidak ditentukan yang merupakan penyimpanan hasil waktu sementara.

Pengaturan program antara suhu dan waktu seperti di bawah ini, dapat digambarkan seperti pada Gambar 11.1.

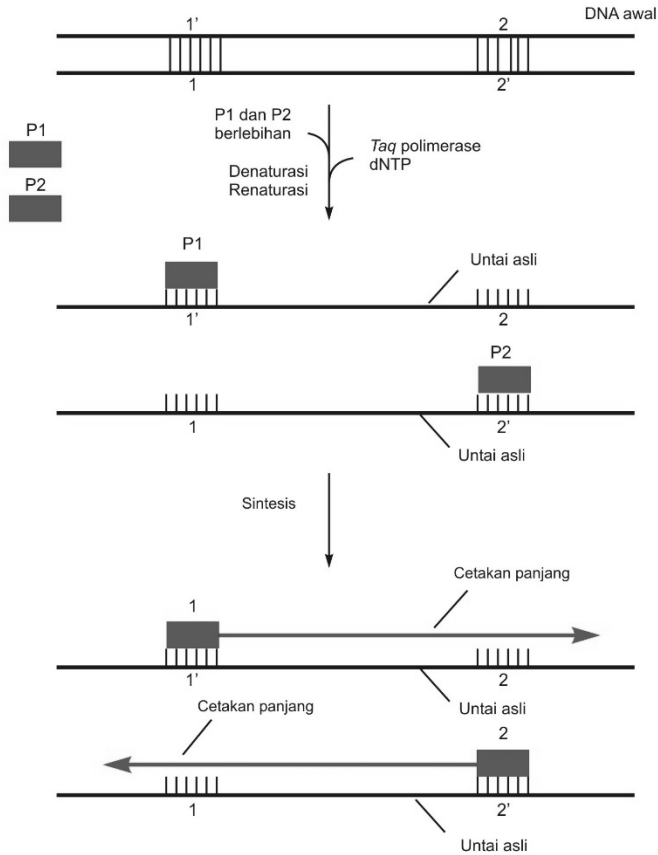
Siklus	Denaturasi	Hibridisasi primer	Polimerisasi
Pertama	5 menit, 94°C	1 menit, 55°C	2 menit, 72°C
2 – 29	1 menit, 94°C	1 menit, 55°C	2 menit, 72°C
Terakhir	1 menit, 94°C	1 menit, 55°C	10 menit, 72°C
	Ditahan pada 4°C		



Gambar 11.1. Siklus suhu dan ilustrasi jalannya reaksi PCR yang menyatakan hubungan suhu dan waktu dengan sistem terprogram. Urutan denaturasi, annealing dan polimerisasi atau ekstensi diadaptasi dari [11].

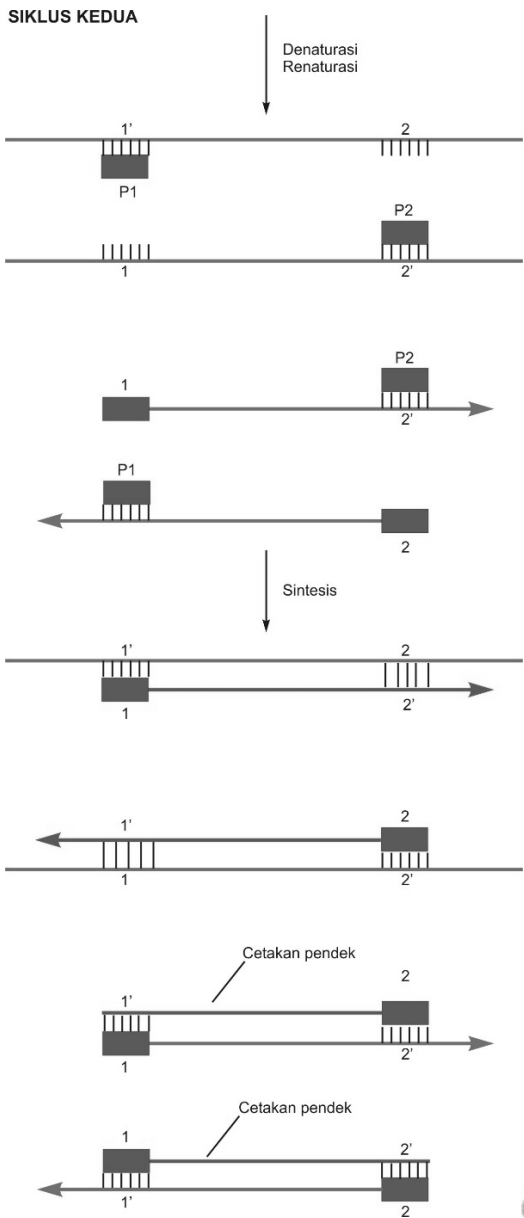
Pada siklus pertama, pada suhu 94°C selama 5 menit, DNA terdenaturasi. Pada suhu 55C selama 30 detik terjadi hibridisasi primer (*annealing*) pada target. Pada suhu 72°C selama 1 menit, terjadi sintesis DNA sehingga menjadi DNA untai ganda (Gambar 11.2).

SIKLUS PERTAMA

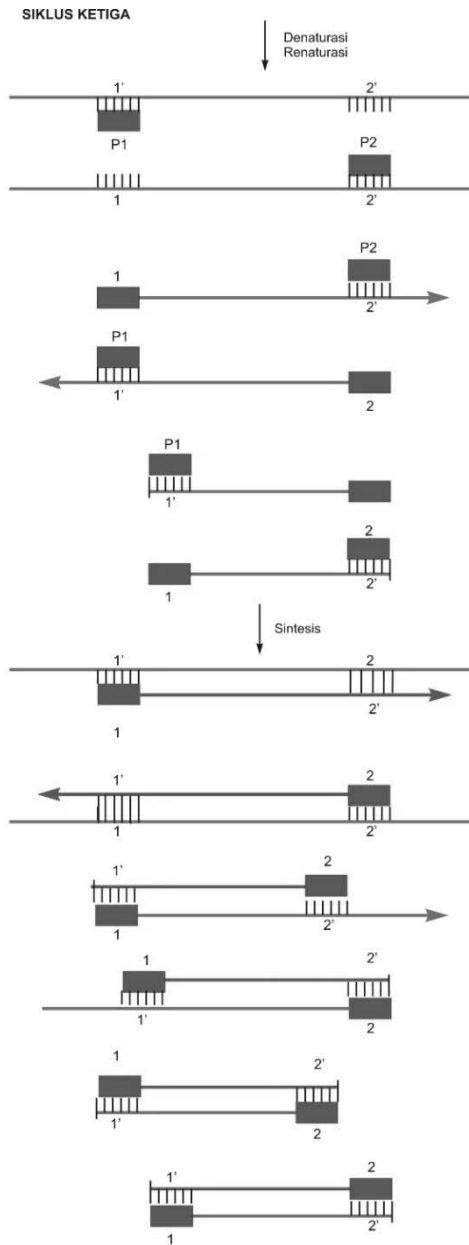


Gambar 11.2. Siklus pertama PCR. P1 dan P2 adalah primer 1 dan 2 yang masing-masing menempel pada lokus 1' dan 2'. Gambar diadaptasi dari [12].

Pada siklus kedua, untai DNA asli dan untai yang baru saja disintesis pada siklus pertama, didenaturasi dan kemudian hibridisasi dengan masing-masing primer. Pada siklus kedua, sintesis menghasilkan untai yang panjang dan untai DNA yang kedua ujungnya mengandung primer dan komplemen primer (cetakan pendek) (Gambar 11.3).



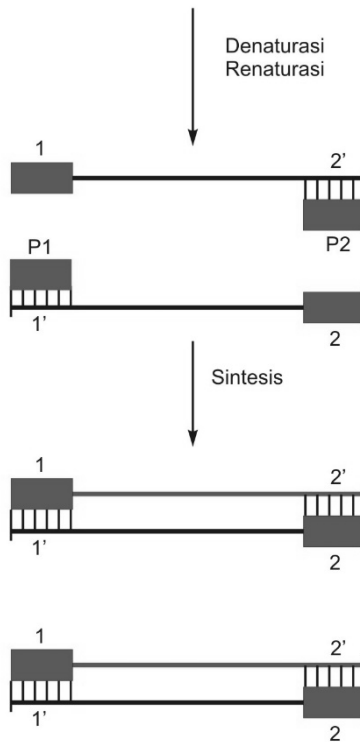
Gambar 11.3 Siklus kedua PCR. Sebagai cetakan adalah DNA asli dan hasil sintesis pada sisklus pertama. Selama renaturasi primer hibridisasi dengan komplementennya pada untai DNA. Sintesis DNA menghasilkan cetakan baru untuk siklus berikutnya. Cetakan pendek mempunyai sikuen salah satu primer dan ujung satunya adalah sikuen yang komplemen dengan primer lainnya. Gambar diadaptasi dari [12].



Gambar 11.4. Siklus ketiga PCR. Hasil amplifikasi siklus kedua digunakan sebagai cetakan pada siklus ketiga. Gambar diadaptasi dari [12].

Pada siklus ketiga, untai pendek hasil amplifikasi, untai panjang hasil amplifikasi dan untai asli dihibridisasi oleh primer dan kemudian polimerisasi (Gambar 11.4). Pada tahap berikutnya, akan terakumulasi untai pendek dan sampai pada siklus 30 untai ini sekitar satu milyar kali banyaknya dari pada untai asli jika efisiensi amplifikasi 100% (Gambar 11.5).

SIKLUS KETIGAPULUH



Gambar 11.5. Siklus ketigapuluh. Populasi molekul DNA terdiri utamanya adalah untai yang pendek yang dibatasi oleh kedua primer. Gambar diadaptasi dari [12].

Pada akhir prosedur, produk PCR biasanya dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% atau poliakrilamid. Hal ini untuk membuktikan apakah prosedur PCR tersebut menghasilkan fragmen DNA (amplikon atau amplimer) maka setelah tahap terakhir larutan

diambil sebagian dan dielektroforesis gel agarosa dan dilihat ukuran amplicon. Dengan menggunakan marker DNA yang telah diketahui ukurannya maka dapat dihitung berapa ukuran amplicon dan apakah ukuran tersebut sesuai dengan perhitungan. Proses PCR dapat dibagi dalam tiga tingkat:

- 1) *Amplifikasi eksponensial*: Pada setiap siklus, jumlah amplicon menjadi dua kali lipat (dengan anggapan efisiensi reaksi 100%). Reaksi ini sangat peka dan hanya beberapa nanogram DNA yang diperlukan.
- 2) *Leveling off stage*: Reaksi ini melambat begitu DNA polimerase menurun aktivitasnya dan sebagai akibat penurunan konsentrasi dNTP dan primer akibat penggunaan pada reaksi.
- 3) *Plateau*: Tidak ada akumulasi produk sebab jumlah pereaksi rendah dan enzim yang sudah lemah.

D. Desain Primer

Desain primer untuk mendapatkan antara dua tujuan: spesifisitas dan efisiensi amplifikasi. Spesifisitas dinyatakan sebagai frekuensi kejadian salah penempelan primer pada non-target. Primer spesifisitas cukup sampai jelek menghasilkan berbagai ukuran amplicon dengan ukuran tidak seperti diharapkan. Hal ini dapat dilihat pada gel agarosa yang diwarnai dengan etidium bromida. Efisiensi merupakan gambaran seberapa dekat sepasang primer itu mengamplifikasi produk yang naik dua kali pada setiap siklus PCR [13].

Pada umumnya primer diperoleh dengan menggunakan perangkat lunak desain primer dan menghasilkan beberapa pasang primer. Walaupun pada banyak kasus pemilihan primer untuk PCR tanpa pengetahuan prinsip terjadinya amplifikasi dapat memperoleh hasil yang baik. Ketika mendesain primer PCR ada rekomendasi umum untuk pemilihan primer PCR dan berbagai aspek yang perlu dipertimbangkan. Beberapa parameter yang dapat mempengaruhi

optimal tidaknya suatu primer, antara lain panjang primer, kesesuaian urutan sekuen primer, konsentrasi primer, dan GC *content* [14].

1. Panjang Primer

Panjang primer mempengaruhi spesifisitas dan suhu hibridisasi primer. Oligonukleotida dengan panjang antara 18 dan 24 basa cenderung sangat spesifik jika suhu hibridisasi primer diatur beberapa derajat di bawah T_m primer. Suhu leleh (T_m) suatu primer adalah suhu dimana 50% target ditemplei primer. Suhu leleh untuk primer yang baik antara 52-58°C biasanya menghasilkan efisiensi amplifikasi terbaik. Jenis oligonukleotida ini bekerja sangat bagus untuk target tertentu yang tidak mempunyai banyak variasi urutan basa. Untuk primer yang lebih panjang, pada amplifikasi secara eksponensial, akan menyebabkan efisiensi amplifikasi kurang baik pada setiap tahap hibridisasi primer sehingga akan menghasilkan jumlah ampikon yang lebih rendah. Untuk mengoptimalkan PCR, penggunaan primer dipilih paling tidak mempunyai nilai T_m 54°C. Nilai T_m lebih tinggi akan memberikan kemungkinan mendapatkan spesifitas dan efisiensi yang diharapkan. Oligonukleotida pendek dengan 15 basa atau kurang hanya untuk penggunaan tertentu saja seperti pada primer acak pada pemetaan genom yang sederhana. Ukuran panjang primer minimal tergantung ukuran genom organisme. Pada umumnya, 4^n harus lebih besar dari ukuran genom, dimana n adalah ukuran primer. Untuk setiap penambahan satu nukleotida, primer itu menjadi empat kali lebih spesifik. Panjang primer minimal yang biasa digunakan adalah 18 nukleotida. Jelasnya untuk amplifikasi cDNA murni, tanpa DNA genom, panjang primer dapat dikurangi karena kemungkinan penempelan primer pada daerah non-spesifik akan sangat kecil. Dengan alasan entropi, semakin pendek suatu primer, semakin cepat primer itu menempel pada DNA target dan membentuk untai ganda yang stabil kemudian DNA

polimerase dapat berikatan. Untuk primer lebih pendek dari 20 basa, nilai T_m dapat dihitung $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$, sedangkan primer yang lebih panjang memerlukan parameter termodinamik yang terdapat pada program desain primer PCR [15].

2. Ujung primer

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa posisi ujung 3' pada suatu primer sangat penting. Adanya G atau C dalam lima basa pada ujung 3' menghasilkan ikatan lebih kuat terhadap target tetapi sebaiknya dihindari jumlah G/C lebih dari tiga. Hal ini dapat mengurangi kesalahan hibridisasi primer pada non-target. Apabila suatu primer ujung 3'nya tidak komplemen dengan target DNA maka DNA polimerase tidak dapat memperpanjang primer, berarti tidak terjadi sintesis DNA. Keadaan ini mengakibatkan tidak terjadi amplifikasi fragmen secara eksponensial. Perlu diperhatikan bahwa sepasang primer tidak boleh komplemen terutama pada ujung 3'nya. Penempelan primer dengan primer akan menghasilkan kejadian yang disebut primer dimer dan menghasilkan produk amplifikasi primer-primer itu sendiri. Kejadian ini akan menghasilkan kejadian kompetisi antara produk primer-dimer dan cetakan-primer yang mengganggu keberhasilan amplifikasi. Pada PCR multipleks (digunakan beberapa pasang primer), perlu dilihat kemungkinan komplemen antar primer yang digunakan. Program komputer telah mendesain adanya homologi ujung 3' sehingga kemungkinan terjadinya primer dimer sangat kecil [15].

3. Kandungan rasio GC

Primer PCR sebaiknya mengandung GC cukup sehingga primer dengan ukuran 20 basa dan kandungan 50% G dan C mempunyai nilai T_m 56 – 62°C. Primer yang kurang komplemen dengan target menjadi kurang efisien dan kurang spesifik sebab spesifitas menurun pada primer dengan T_m rendah. Untuk primer dengan T_m

tinggi tetapi kurang komplemen dengan target memperbesar kemungkinan salah menempel pada kondisi itu. Jika digunakan suhu terlalu tinggi, primer ini tidak dapat menempel pada cetakan. Pada waktu memilih sepasang primer kandungan GC dan nilai Tm merupakan hal yang harus diperhatikan. Sebagai contoh urutan DNA di bawah ini, lokus primer primer sense dari basa 51 dan primer antisense dari basa 232. Hitung harga Tm masing-masing primer dan hitung berapa ukuran amplikon yang dihasilkan.

1 atgaagaagt tgatggatta tagattgcca agtggctac acatgggac ttgataccca
 61 atgagatcat acatatagat atcacttgat aagatgattc tctctcttt ctctatata
 121 ttctcaacc caactaact catcttcac accatcaaa cacttaattc ttctctaaa
 181 at aaacacaa atggcagctg ct acaatggc tctttctcc ccttcatttg ctggacaggc
 241 *agtcaaaact tcaccatctg cctcagaaat ttctggaaat ggaaggatca ctatgagaaa*
 301 ggctgttgc aagtcgccc catctagcag cccatggtat ggccctgacc gtgttaagta

 361 ctgggccc ttctctggg agtccccaag ctacttgacc ggtgaatttc *ctggtgatta*
 421 *cggtgggat accgctggac ttcagcaga ccctgaaact tttccaaga accgtgaact*
 481 tgaagtgac cactgcagat gggctatgct tggctctt ggatgtgtct tcctgagct
 541 ctggcccg aatggtgca agttcgtga ggctgtgtg ttcaaggccg gatcccagat

Contoh tugas mencari susunan primer tanpa program untuk urutan basa diatas.

Primer	Mulai	Panjang	Tm	%GC	Urutan basa
P1	55	21	59,8	47,6	?
P2	232	20	60,7	50	?

Penyusunan dan uji primer dapat dilakukan melalui cara *online* (misal, BLAST, *basic local alignment search tool*, National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) yang akan mengurangi kemungkinan amplifikasi non-spesifik. Urutan nukleotida target maupun primer dapat diperoleh (misal, urutan nukleotida target diunduh kedalam NCBI nukleotida; pencocokan urutan dapat dilakukan melalui, <http://www.clustal.org/>). Banyak program untuk mendesain primer diantaranya adalah Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, NCBI) C.

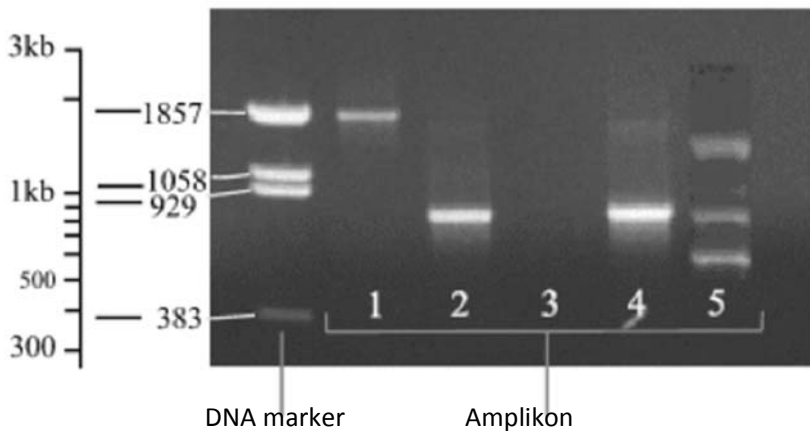
Sepasang primer dengan atau tanpa pelacak harus diuji pada waktu pengembangan metoda untuk meyakinkan bahwa metoda ini hanya bereaksi dengan sekuen target. Ini untuk menunjukkan spesifitasnya. Pertama, perlu diuji *in silico* dengan melakukan pencarian terhadap bank data sekuen DNA organisme itu dan organisme yang umumnya terdapat bersama dengan organisme target. Kedua, berdasarkan hasil *in silico* tadi, pilih sepasang primer untuk diuji secara nyata terhadap organisme target, akan lebih baik jika dapat menggunakan (*Certified Reference Materials* (CRM)).

4. Panjang ampikon

Pada umumnya, panjang ampikon berpengaruh pada efisiensi amplifikasi. Ukuran spesifik ampikon yang diinginkan tergantung dari keperluannya. Untuk tujuan deteksi suatu urutan DNA dengan PCR standar, panjang ampikon sekitar 100 – 500 pasang basa, walaupun di atas itu juga dapat diperoleh hasil. Untuk mengetahui ukuran produk PCR dilakukan elektroforesis gel agarosa (Gambar 11.6). Perlu diperhatikan pada analisis produk PCR. Apakah terbentuk produk dengan ukuran seperti yang diharapkan. Kualitas DNA yang tidak baik atau terlalu banyak jumlah DNA awal dapat menyebabkan salah satu primer tidak dapat menempel target. Produk terbentuk dengan ukuran yang tidak sesuai dengan yang

diharapkan, misalnya terbentuk pita dengan ukuran 500 pasang basa, tetapi yang diharapkan 800 pasang basa. Dalam hal ini salah satu primer mungkin menempel pada bagian fragmen yang lebih pendek. Ada kemungkinan bahwa kedua primer menempel pada lokus lain. Jika diperoleh beberapa pita pada gel, ini berarti sepasang primer itu juga menempel ditempat lain. Hal ini menunjukkan sepasang primer kurang spesifik atau suhu hibridisasi terlalu rendah.

Untuk PCR pada uji klinik untuk mendeteksi fragmen DNA tertentu, ukuran amplikon optimal sekitar 120 – 300 pasang basa. Apabila konsentrasi DNA sampel sangat rendah dan juga untuk menaikkan spesifitasnya dan batas deteksinya dapat dilakukan amplifikasi dua tahap (*Nested PCR*). Kuantifikasi ekspresi gena, pada umumnya tidak dianjurkan. Untuk kuantifikasi digunakan digunakan *real-time PCR*.



Gambar 11.6. Verifikasi produk PCR pada gel agarosa. Marker yang merupakan campuran fragmen dengan ukurang yang telah diketahui. Kolom 1: fragmen PCR dengan ukuran sekitar 1850 pasangbasa. Kolom 2 dan 4: fragmen dengan ukuran sekitas 800 pasangbasa. Kolom 3: tidak dihasilkan produk, berarti gagal. Kolom 5: terbentuk tiga pita, berarti primer menempel pada bebera lokus.

E. Real-time Polymerase chain reaction (RT-PCR atau q-PCR)

Metode PCR konvensional memiliki beberapa limitasi, antara lain *end-point* pada PCR konvensional tidak dapat memberikan informasi mengenai jumlah awal molekul DNA target yang terdapat dalam sampel. PCR konvensional hanya memberikan informasi kualitatif terkait sampel yang positif dan negative DNA target [11]. Lebih lanjut, analisis kuantitatif PCR konvensional dapat dilakukan dengan didasarkan pada pengukuran titik akhir reaksi PCR dengan visualisasi menggunakan ethidium bromide dari produk DNA yang dipisahkan dengan elektroforesis gel agarose. Namun, pendekatan tersebut memiliki kekurangan dalam mengukur sampel secara akurat dan handal dikarenakan sensitifitas yang rendah dari prosedur pewarnaan ethidium bromide. Lebih lanjut, kuantifikasi tersebut dilakukan pada reaksi akhir PCR ketika proses amplifikasi telah mencapai *plateau phase*, yang mana intensitas pewarnaan gel DNA tidak berkorelasi secara linear dengan jumlah DNA input. Metoda PCR konvensional bersifat kualitatif untuk mendeteksi apakah ada atau tidak ada untai DNA target yang dideteksi. Dalam banyak hal, jumlah ampikon ini sulit dihubungkan dengan konsentrasi DNA awal. Untuk amplifikasi mRNA, metoda ini diawali dengan sintesis cDNA dengan pertolongan *reverse transcriptase* yang kemudian cDNA ini diamplifikasi dengan PCR. Hasil amplifikasi kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. Pada umumnya metoda ini telah digunakan untuk mengukur jumlah mRNA tertentu pada beberapa kondisi berbeda akan tetapi metoda seperti itu kurang kuantitatif. Alasan bahwa *reverse-transcriptase-PCR* konvensional, seperti yang biasa dilakukan, bersifat non-kuantitatif karena ethidium bromid merupakan pewarnaan yang kurang peka dan pengukuran jumlah ampikon dilakukan pada daerah di mana tahapan

eksponensial amplifikasi telah lewat (plateau). Oleh karena itu dikembangkan *real-time* PCR. Kelebihan *real-time* PCR terhadap PCR konvensional dapat dilihat pada Tabel 1. Suatu hal yang membingungkan bahwa analisis mRNA dengan *reverse transcriptase*-PCR biasanya disingkat dengan RT-PCR yang ternyata sama dengan singkatan *real-time* PCR juga. Oleh karena itu diusulkan menggunakan singkatan qPCR untuk *quantitative real-time* PCR dan RT-PCR untuk singkatan dari *reverse transcriptase*-PCR bukan untuk *real-time* PCR, akan tetapi banyak juga tidak menurutinya.

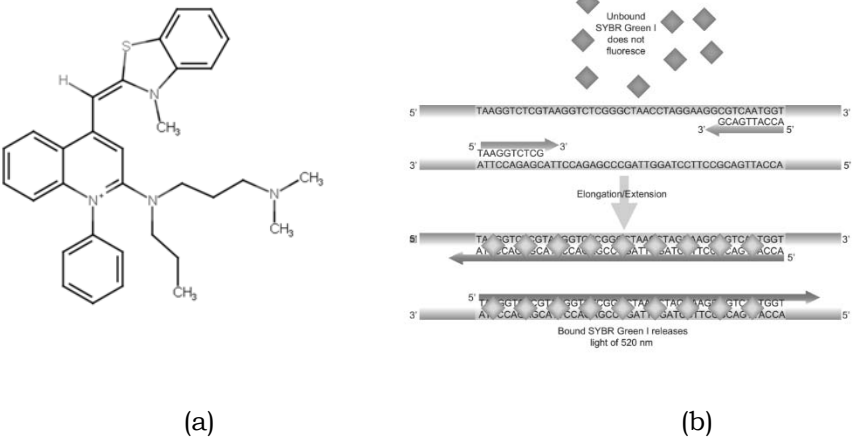
Tabel 1. Perbandingan antara q-PCR dengan PCR konvensional

	Q-PCR	PCR
Kepekaan	Tinggi	Rendah
Spesifitas	Tinggi, menggunakan pelacak	Rendah, hanya ukuran amplicon
Hasil kuantifikasi	Ya, fluoresensi spesifik	Tidak, dengan pewarnaan dengan etidium bromid
Metode deteksi	Amplikon berfluoresensi, analisis kura leleh atau dengan pelacak berfluoresensi	Elektroforesis gel agarosa
Batas deteksi	Rentang luas	Rentang sempit (<2log)
Waktu reaksi	1 jam	3 jam
Pekerjaan setelah PCR	Tidak ada	Elektroforesis
Kontaminasi silang	Tidak ada, system tertutup, hanya satu tahap	Mungkin, system terbuka, ada beberapa tahap

1. Sistem deteksi

Etidium bromid merupakan senyawa yang berikatan dengan DNA untai ganda dengan cara interkalasi di antara dua basa. Senyawa itu akan berfluoresensi walaupun tidak terlalu tajam jika di-radiasi dengan sinar UV pada panjang gelombang tertentu. Senyawa lain seperti *SYBR Green*, menghasilkan sinar yang lebih kuat dari

pada etidium bromid, jika digunakan pada *real-time* PCR. *SYBR Green* merupakan pewarna yang berikatan dengan DNA untai ganda membentuk kompleks DNA-*SYBR Green* dan menyerap sinar biru (λ_{max} 497nm) dan memancarkan sinar hijau (λ_{max} 520nm) (Gambar 11.7). Senyawa ini lebih suka berikatan dengan DNA untai ganda, sedangkan terhadap DNA untai tunggal intensitasnya rendah. *SYBR Green* sering digunakan *real-time* PCR. Jika senyawa itu berikatan dengan DNA untai ganda akan berfluoresensi dengan kuat (lebih kuat dari pada etidium bromid) [16]. Lebih lanjut, rasio fluoresensinya karena adanya DNA untai ganda terhadap adanya DNA untai tunggal jauh lebih tinggi daripada rasio etidium bromid. Metoda lain dapat digunakan untuk deteksi amplicon selama reaksi amplifikasi. Oleh karena itu dinamakan *real-time* PCR.

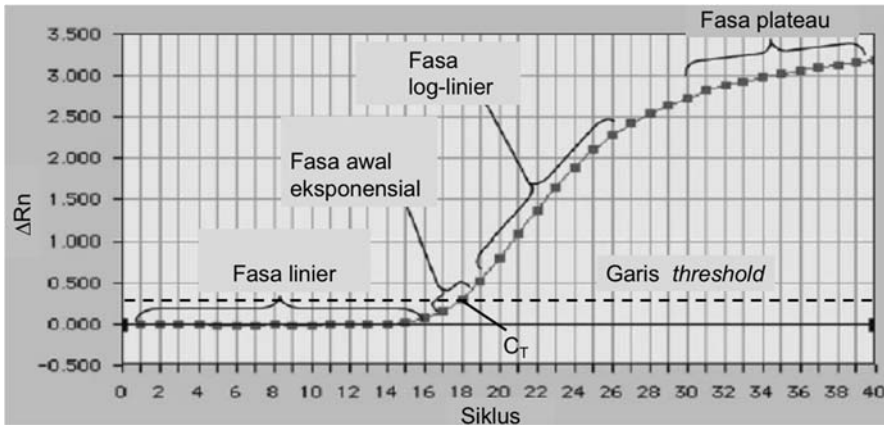


Gambar 11.7. (a) Struktur kimia SYBR Green I (Anonim, 2022) (b) Mekanisme fluorosensi dsDNA-binding dye SYBR Green I pada *real-time* PCR [17].

Real-time PCR merupakan suatu pendekatan kinetik dengan melihat reaksi pada tahap awal yang masih linier. Ada beberapa alat *real-time* PCR yang ada di pasaran. Alat yang canggih dapat mengerjakan 96 sampel yang terletak pada 96 sumuran. Hal ini berarti bahwa 96 sampel tadi dapat dikerjakan secara bersamaan. Alat dileng-

kapi kamera yang peka yang memonitor fluoresensi pada setiap sumuran pada interval waktu tertentu selama reaksi amplifikasi. Demikian DNA disintesis, lebih banyak *SYBR Green* terikat pada DNA, intensitas fluoresensi akan naik. Jika data tersebut dibuat grafik dengan model standar (Gambar 11.8), maka kenaikan amplifikasi pada siklus awal yang linier karena kenaikan signal yang sangat rendah. Pada siklus lebih lanjut terlihat fasa awal eksponensial yang muncul diatas garis dasar. Pada fasa awal eksponensial terjadi kenaikan jumlah ampikon yang linier dan pada fasa ini sinyal diukur pada titik potong dengan garis *threshold* (garis kepercayaan) yang disebut C_T . Pada Gambar 7 harga C_T nya 18, artinya pada siklus 18 intensitas warna memotong garis *threshold*. Kemudian mulai mencapai fasa non-linier yang dinamakan fasa log-linier dan akhirnya mencapai fasa plateau. Pada kenyataannya fasa linier terjadi pada siklus lebih awal daripada yang terlihat di sini. Jika data yang sama disajikan pada pola logaritmik (semi-log), perbedaan kecil dalam jumlah DNA pada fasa awal eksponensial akan terlihat jelas. Kedua jenis grafik itu dapat digunakan untuk menguji data. Hubungan lurus antara jumlah DNA dan jumlah siklus terlihat pada jenis semi-log. Hal ini disebabkan amplifikasi PCR merupakan reaksi eksponensial.

Secara garis besar ada dua metoda untuk deteksi ampikon pada Q-PCR: (1) tak-spesifik, pewarna berfluoresensi jika berinterkalasi dengan DNA untai ganda baik ampikon yang diharapkan maupun sembarang DNA untai ganda, dan (2) spesifik untuk urutan DNA tertentu, dengan pelacak DNA yang diberi label reporter berfluoresensi yang akan memberikan sinyal setelah pelacak itu hibridisasi dengan ampikon tertentu yang diharapkan.



Gambar 11.8. Grafik hubungan antara siklus PCR dan intensitas warna yang menggambarkan jumlah amplicon. Fasa awal eksponensial terjadi terjadi kenaikan jumlah amplicon yang linier menunjukkan C_T 18 [18].

Ada beberapa format deteksi amplicon, pada kesempatan ini hanya dibicarakan beberapa:

1. *SYBR Green I*. Senyawa ini berikatan dengan DNA untai ganda dan menyebabkan fluoresensi. Intensitas fluoresensi tergantung pada jumlah DNA untai ganda hasil amplifikasi. Sebagai reporter fluoresensi dapat digunakan juga *Eva Green* atau FAM (Tabel 2).
2. *Hidrolisis pelacak (TaqMan)*. Metoda ini menggunakan aktivitas eksonuklease 5' – 3' dari enzim DNA polimerase. Pelacak membawa molekul reporter fluoresen dan molekul pemadam yang jika molekul itu dalam keadaan utuh tidak terjadi fluoresensi. Jika pelacak menempel pada amplicon dan DNA polimerase pada waktu sintesis DNA menjumpai pelacak yang menempel di depannya, maka aktivitas eksonuklease 5' – 3' menghidrolisis pelacak itu sehingga reporter berfluoresensi. Sebagai reporter fluoresensi dapat digunakan FAM (Tabel 2).

3. *Hibridisasi pelacak (Molecular beacon)*. Ada dua ujung pelacak, satunya membawa molekul donor fluoresen, sedang lainnya membawa molekul reseptor fluoresen. Pada keadaan bebas kedua ujung berdekatan sehingga tidak terjadi fluoresensi. Apabila pelacak itu menempel pada amplikon sedemikian rupa sehingga molekul donor dan reseptor fluoresen sedemikian jauh, maka terjadi fluoresensi. Intensitas fluoresensi tergantung dari jumlah amplikon.

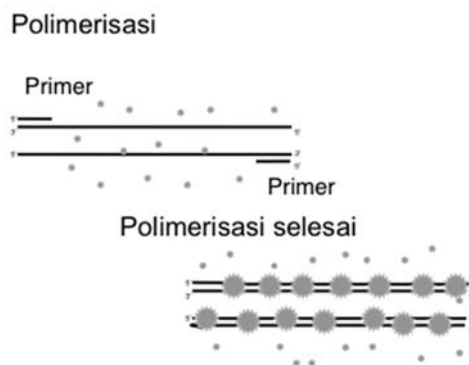
Metoda qPCR untuk amplifikasi DNA dalam jumlah kecil, dengan cara seperti PCR konvensional dengan menggunakan cetakan DNA, sepasang primer, deoksiribonukleotida, larutan buffer, DNA polimerase yang tahan panas dan ditambah senyawa dengan fluorofor. Alat PCR ini mempunyai detektor untuk mengukur intensitas fluoresensi senyawa fluorofor setelah dieksitasi pada panjang gelombang tertentu sehingga memancarkan sinar pada panjang gelombang tertentu pada setiap siklus. Kenaikan intensitas fluoresensi ini sesuai dengan jumlah amplikon pada setiap siklus PCR. Beberapa fluorofor yang banyak digunakan (Tabel 2).

Tabel 11.2. Fluorofor dan penggunaannya [16].

Kanal	Eksitasi (nm)	Emisi (nm)	Fluorofor
1	450-490	515-530	FAM™, SYBR Green I™, Eva Green
2	515-535	560-580	VIC®, HEX™, TET™, Cal Gold 540™
3	560-590	610-650	ROX™, TEXAS RED®, Cal Red 610™
4	620-650	675-690	CY5, Quasar 670™
5	672-684	705-730	Quasar 705™
6	450-490	560-580	Digunakan untuk FRET

Pada *real-time* PCR dengan senyawa pewarna interkalasi reaksi dibuat seperti biasa, dengan menambahkan senyawa tersebut pada campuran. Pada waktu polimerisasi, *SYBR Green* I akan interkalasi pada DNA untai ganda dan berfluoresensi (Gambar 11.9). Kenaikkan jumlah amplicon dapat dideteksi dengan senyawa yang berfluoresensi jika interkalasi pada DNA untai ganda. Kenaikkan jumlah amplicon pada setiap siklus, sebanding dengan kenaikan intensitas fluoresensi. Senyawa yang banyak digunakan adalah *SYBR Green* I yang akan berinterkalasi dengan semua DNA untai ganda, baik DNA yang diharapkan maupun kontaminan sehingga kontaminasi dapat mengganggu. Selain *SYBR Green* I dapat juga digunakan *Eva Green* atau TAM (Tabel 2).

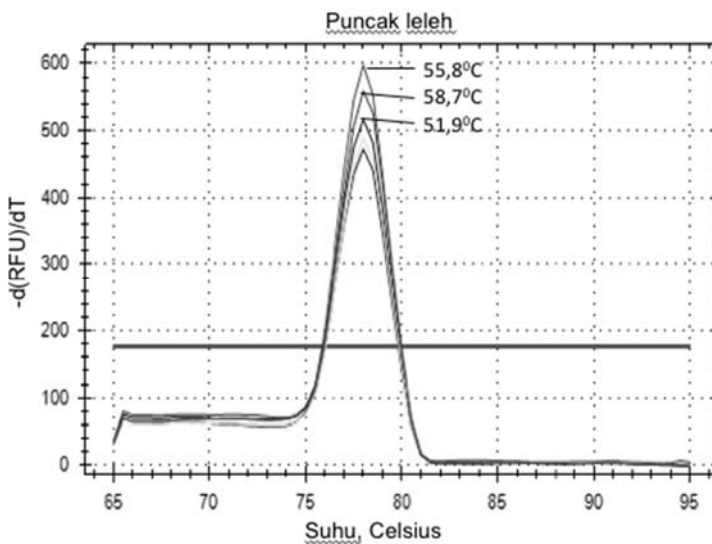
Metoda ini mempunyai keuntungan, hanya memerlukan sepasang primer untuk melakukan amplifikasi, sehingga tergolong murah. Kemajuan teknologi menyebabkan metoda ini tidak lagi termasuk golongan metoda deteksi non-spesifik karena dengan menggunakan analisis kurva leleh pada setiap amplicon menyebabkan metoda ini dapat digunakan untuk multiplex PCR jika nilai T_m amplicon berbeda.



Gambar 11.9. *SYBR Green* berfluoresensi kuat hanya jika berinterkalasi dengan DNA untai ganda. Atas, *SYBR Green* tidak berikatan dengan DNA untai tunggal maka tidak berfluoresensi. Bawah, *SYBR Green* berikatan dengan DNA untai ganda dan berfluoresensi [19].

2. Penentuan suhu hibridisasi (*annealing*)

Pada penentuan suhu hibridisasi dapat dilakukan dengan mengubah suhu hibridisasi dan dicari pada suhu berapa yang menghasilkan sinyal tertinggi. Optimasi suhu hibridisasi primer pada target sangat penting karena akan mempengaruhi pada spesifitas, kepekaan, dan efisiensi amplifikasi. Hal ini berarti suhu hibridisasi yang dipilih merupakan kondisi yang menghasilkan sinyal tertinggi (amplikon terbanyak), yang berarti hibridisasi primer pada DNA target paling efisien, seperti ditunjukkan pada Gambar 11.10.



Gambar 11.10. Hubungan antara suhu hibridisasi dan signal yang dianalisis dengan suhu lelehnya. Suhu hibridisasi 55,8°C menunjukkan signal tertinggi (diadaptasi dari [20])

Proses qPCR biasanya memerlukan waktu sekitar 25 – 40 menit. Alat ini mampu dengan cepat memanasi dan mendinginkan sampel. Pada umumnya amplikon yang dihasilkan berukuran kecil. Tahap akhir pada PCR konvensional yang berupa sintesis beberapa menit dihilangkan karena pengukuran intensitas ada analisis kuantitatif dilakukan pada waktu kenaikan intensitas masih linier. Enzim

dapat menaikkan jumlah amplicon selama perubahan suhu antara tahap penempelan primer dan tahap denaturasi. Perubahan suhu dari satu siklus ke siklus berikutnya hanya dalam waktu beberapa detik dan dijaga pada suhu 80°C. Hal ini akan mengurangi *noise* yang disebabkan oleh primer dimer mengikat *SYBR Green*. Suhu dan waktu yang digunakan setiap siklus sangat bervariasi tergantung pada: enzim yang digunakan, konsentrasi ion divalen dan dNTP dalam reaksi dan suhu hibridisasi primer. Hal ini akan berpengaruh pada efisiensi amplifikasi. Gambar 11.11 menunjukkan bahwa perubahan efisiensi akan sangat berpengaruh pada jumlah amplicon yang dihasilkan.

3. Pengaruh efisiensi amplifikasi.

Pertama, perlu dipahami sifat reaksi PCR untuk memahami pengukuran secara kuantitatif. Secara teori, setiap siklus PCR jumlah menjadi dua kalinya dari sebelumnya. Artinya, setelah siklus 2 menjadi 2x2 dari jumlah sebelumnya. Setelah siklus 3 menjadi 2x2x2 atau 2³ kali jumlah sebelumnya, setelah siklus 4 menjadi 2⁴ kali jumlah sebelumnya. Setelah siklus n, menjadi 2ⁿ kali jumlah sebelumnya.

Jika berbeda efisiensi amplifikasi, maka berbeda jumlah DNA yang dihasilkan. Pada efisiensi 100%, jumlah DNA menjadi dua kalinya setiap siklus. Pada efisiensi 90%, jumlah DNA akan naik dari 1 menjadi 1,9. Artinya setiap siklus dikalikan dengan factor 1,9. Demikian juga untuk efisiensi 80% dan 70%, dikalikan dengan 1,8 dan 1,7 setiap siklusnya. Perbedaan efisiensi akan menghasilkan perbedaan jumlah DNA yang dihasil, lihat Gambar 11.11. Oleh karena itu metoda PCR yang baik mempunyai efisiensi antara 90 – 110% [21].

Siklus	Jumlah DNA Efisiensi 100%	Jumlah DNA Efisiensi 90%	Jumlah DNA Efisiensi 80%	Jumlah DNA Jumlah 70%
0	1	1	1	1
1	2	2	2	2
2	4	4	3	3
3	8	7	6	5
4	16	13	10	8
5	32	25	19	14
6	64	47	34	24
7	128	89	61	41
8	256	170	110	70
9	512	323	198	119
10	1,024	613	357	202
11	2,048	1,165	643	343
12	4,096	2,213	1,157	583
13	8,192	4,205	2,082	990
14	16,384	7,990	3,748	1,684
15	32,768	15,181	6,747	2,862
16	65,536	28,844	12,144	4,866
17	131,072	54,804	21,859	8,272
18	262,144	104,127	39,346	14,063
19	524,288	197,842	70,824	23,907
20	1,048,576	375,900	127,482	40,642
21	2,097,152	714,209	229,468	69,092
22	4,194,304	1,356,998	413,043	117,456
23	8,388,608	2,578,296	743,477	199,676
24	16,777,216	4,898,763	1,338,259	339,449
25	33,554,432	9,307,650	2,408,866	577,063
26	67,108,864	17,684,534	4,335,959	981,007
27	134,217,728	33,600,615	7,804,726	1,667,711
28	268,435,456	63,841,168	14,048,506	2,835,109
29	536,870,912	121,298,220	25,287,311	4,819,686
30	1,073,741,824	230,466,618	45,517,160	8,193,466

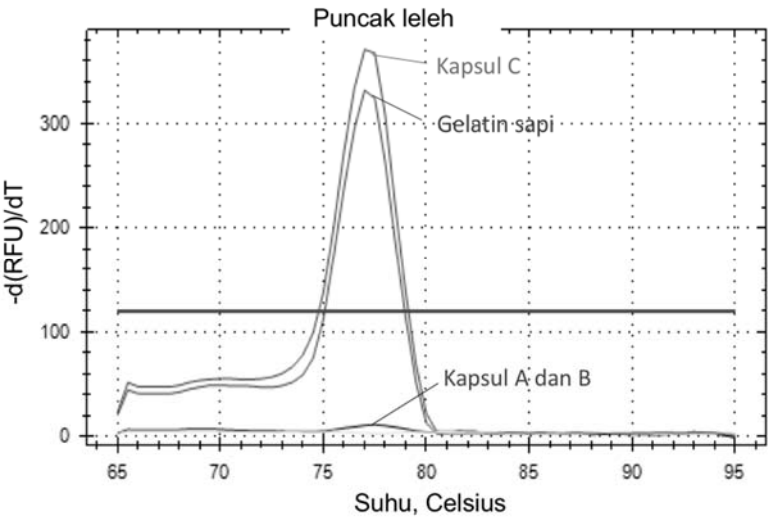
Gambar 11.11. Pengaruh efisiensi terhadap amplikon yang dihasilkan pada siklus 30. Pada efisiensi 100% dihasilkan 1.073.741.824, sedangkan pada efisiensi 70% dihasilkan 8.193.466.

4. Analisis kualitatif dengan suhu leleh

Q-PCR dapat mengidentifikasi secara spesifik amplikon dengan menganalisis suhu leleh (dinamakan nilai T_m , dari *melting temperature*). Metoda ini menggunakan pewarna sebagai reporter yang berinterkalasi pada DNA untai ganda dan senyawa yang biasa digunakan adalah *SYBR Green*. Nilai suhu leleh suatu DNA tergantung pada panjang fragmen dan komposisi basa penyusun sehingga suhu leleh DNA spesifik untuk amplikon tertentu. Hasilnya diperoleh kurva leleh dari sampel DNA yang berupa gelatin sapi untuk kapsul C, sedangkan kapsul A dan B dibuat bukan dari gelatin sapi (Gambar 11.12). Metoda ini bahkan dapat digunakan untuk analisis amplikon yang berukuran sama tetapi ada perbedaan urutan basanya sehingga akan memberikan perbedaan suhu leleh. Pada kasus deteksi campuran daging babi dan kuda dengan menggunakan sepasang primer

menghasilkan amplicon dengan ukuran sama, 121 pb. Babi mengandung rasio G/C rendah, sedangkan kuda mengandung rasio G/C tinggi, Pada analisis suhu leleh dari amplicon babi menghasilkan T_m 78°C, sedangkan amplicon kuda menunjukkan T_m 82,5°C. Dengan menggunakan analisis suhu leleh (T_m) dapat dilakukan multiplek PCR jika amplicon yang dihasilkan mempunyai ukuran berbeda.

Pada PCR konvensional, digunakan teknik elektroforesis untuk menunjukkan hasil akhir amplifikasi dengan melihat panjang fragmen DNA untuk identifikasi. Pada qPCR valuasi dilakukan pada titik akhir tertentu dan dilihat kurva lelehnya sehingga dapat diketahui nilai T_m untuk identifikasi. Sedangkan kuantifikasi dilihat pada awal amplifikasi.



Gambar 11.12. Analisis kapsul gelatin dengan kurva leleh. (diadaptasi dari [20])

5. Analisis Kuantitatif dengan SYBR Green sebagai reporter
 Senyawa pewarna berikatan dengan DNA untai ganda pada PCR, menghasilkan fluoresensi. Kenaikan jumlah amplicon selama

PCR menaikkan intensitas fluoresensi yang diukur setiap siklus, sehingga konsentrasi DNA terukur secara kuantitatif. Pewarna seperti *SYBR Green* akan interkalasi dengan semua DNA untai ganda produk PCR, termasuk produk PCR yang tak spesifik seperti primer dimer. Produk seperti itu akan mengganggu kuantifikasi yang tepat amplicon target. Reaksi dilakukan seperti PCR konvensional dengan penambahan pewarna. Reaksi ini dilakukan dalam alat PCR kuantitatif (Q-PCR), setiap siklus intensitas fluoresensi dapat dicatat oleh detektor. Senyawa pewarna hanya berfluoresensi jika interkalasi dengan DNA untai ganda, misalnya amplicon.

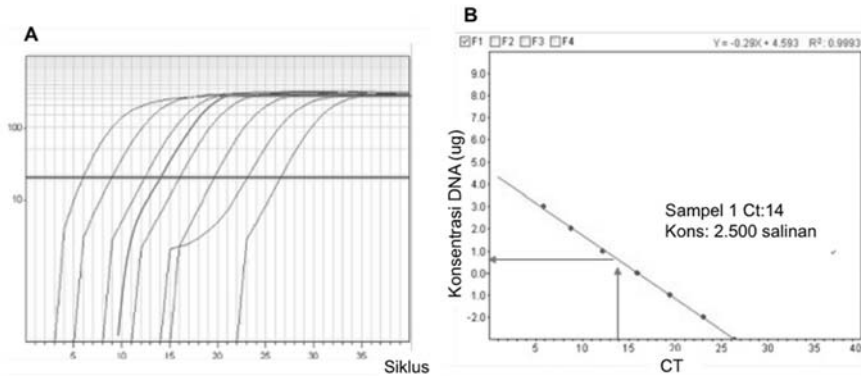
Pada PCR konvensional yang mengukur amplicon pada akhir siklus, sedangkan pada *real time* PCR dapat dilakukan kuantifikasi amplicon yang diinginkan setiap saat pada proses amplifikasi dengan mengukur fluoresensi (pada kenyataan, pengukuran dilakukan pada garis *threshold*). Metoda kuantifikasi DNA yang biasa digunakan oleh qPCR dengan menghubungkan intensitas fluoresensi pada skala log dengan siklusnya. Nilai ambang untuk deteksi fluoresensi diatur sedikit di atas sinyal latar belakang. Siklus keberapa, fluoresensi memotong nilai ambang dinamakan siklus nilai ambang (C_t) atau siklus kuantifikasi (C_q).

Selama fasa eksponensial, jumlah amplicon berlipat dua setiap siklus. Contoh, sampel yang nilai C_q nya selisih 3 siklus, berarti sampel mengandung $2^3 = 8$ kali lebih banyak dari cetakan. Akan tetapi, efisiensi amplifikasi kerap berbeda antara beberapa primer dan cetakan. Oleh karena itu, efisiensi kombinasi primer-cetakan perlu diuji dengan percobaan titrasi dengan satu seri konsentrasi DNA cetakan untuk membuat kurva baku. Nilai kemiringan (*slope*) pada regresi linear dan kemudian digunakan C_q untuk menetapkan efisiensi amplifikasi, nilai 1005 jika pengenceran 1:2 menghasilkan perbedaan C_q 1. Dengan menggunakan kurva baku yang diperoleh dari satu seri larutan DNA yang telah diketahui konsentrasinya,

maka konsentrasi awal DNA untai ganda dalam PCR dapat dihitung (Gambar 11.13). Metoda mempunyai keuntungan hanya diperlukan sepasang primer untuk melakukan amplifikasi.

Deteksi ampikon pada gel agarosa atau hibridisasi Southern tidak memberikan kuantifikasi yang tepat. Sebagai contoh, setelah 20-40 siklus, jumlah ampikon mencapai plateau sehingga tidak dapat dihubungkan langsung dengan jumlah awal target DNA. *Real-Time* PCR terutama mengukur pada fasa eksponensial karena hal ini memberikan data untuk kuantifikasi paling tepat dan teliti. Pada fasa eksponensial alat ini menghitung dua nilai: 1) garis ambang yang merupakan tingkat deteksi di mana intensitas fluoresensi di atas latar belakang. Siklus PCR pada saat sampel mencapai tingkat ini dinamakan ambang siklus, Ct. Nilai Ct digunakan untuk kuantifikasi atau untuk menetapkan ada atau tidak ada amplifikasi. Dengan membandingkan nilai Ct sampel yang tidak diketahui konsentrasi dapat ditetapkan dengan tepat, dengan satu seri standar jumlah DNA sampel untuk menghasilkan kurva baku.

Quantitative PCR dapat mengukur jumlah ampikon secara tidak langsung pada tahap awal amplifikasi, pada waktu hubungan antara respon dan jumlah ampikon masih linier. Metoda ini dapat digunakan untuk mengkuantifikasi asam nukleat dengan dua pendekatan: Kuantifikasi relatif dan kuantifikasi absolut. Kuantifikasi absolut memberikan jumlah tepat molekul DNA target dengan membandingkan dengan standar DNA menggunakan kurva kalibrasi. Oleh karena itu penting bahwa sampel dan standar mempunyai efisiensi amplifikasi yang sama.



Gambar 11.13. Analisis kuantitatif dengan reporter SYBR Green. A. Kurva dari satu seri pengenceran DNA baku dan sampel (merah). B Kurva kaliberasi dan perhitungan konsentrasi awal DNA sampel [22].

Syarat penggunaan kurva baku, perlu diperhatikan linieritas yang dinyatakan sebagai $r^2 > 0,98$ dan tidak boleh penggunaan ekstrapolasi. Sudut kemiringan kurva (*slope*) antara $-2,9$ sampai $-3,3$. Gambar 11.13 (kanan) menunjukkan $R^2 = 0,9993$ dan kemiringan kurva $-0,29$, berarti metoda ini memenuhi persyaratan [23].

6. Metoda hidrolisis TaqMan

Keuntungan menggunakan *dsDNA-binding dyes* seperti dengan SYBR Green antara lain sederhana (tidak membutuhkan desain *probe*), memiliki kemampuan untuk menguji gen dalam jumlah banyak dengan cepat tanpa perlu merancang banyak *probe*, kemampuan dalam melakukan *melt-curve analysis*, dan biaya yang lebih murah (BioRad, 2006). Kelemahan utama *dsDNA-binding dyes* adalah kurangnya spesifisitas, yang mana *dsDNA-binding dyes* akan berikatan dengan *dsDNA* apapun dan tidak dapat membedakan antara sekuen yang berbeda. Lebih lanjut, terjadinya *mispriming* atau pembentukan primer-dimer, akan membuat fluorofor mengemisikan cahaya. Akibatnya, adanya produk non spesifik dalam reaksi *real-time PCR* dapat berkontribusi pada fluoresensi total dan mengenga-

ruhi keakuratan kuantifikasi. Selain itu, dsDNA-*binding dyes* tidak dapat digunakan untuk analisis *multiplex* karena sinyal fluoresensi dari amplicon yang berbeda, tidak dapat dibedakan (BioRad, 2006; Clark et al., 2019).

Pada awalnya, untuk mengukur produk PCR digunakan pewarna yang interkalasi pada DNA untai ganda, seperti SYBR *Green*. Kelemahan utama metoda ini, pewarna ini akan mendeteksi produk PCR baik yang spesifik maupun yang nonspesifik. Sinyal yang terbentuk merupakan produk keduanya. Pelacak TaqMan merupakan pelacak hidrolisis yang didesain untuk menaikkan spesifisitas metoda Q-PCR. Metoda ini dilaporkan pertama kali pada 1991 oleh peneliti dari *Cetus Corporation*,[1] dan teknologi ini kemudian dikembangkan oleh *Roche Molecular Diagnostics* untuk uji diagnosis dan oleh *Applied Biosystems* untuk penggunaan penelitian.

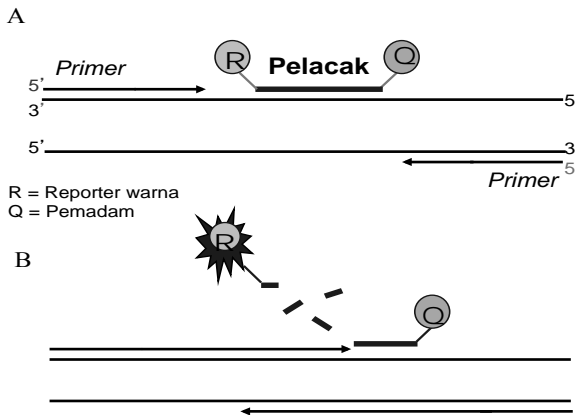
Pelacak dengan reporter fluoresen akan hibridisasi hanya pada DNA yang membawa urutan basa yang komplemen dengan pelacak. Oleh karena itu penggunaan pelacak ini menaikkan spesifitas metoda ini dan dapat dikuantifikasi walaupun ada amplicon yang tidak spesifik (Tabel 11.3). Metoda ini dapat digunakan pada uji secara multipleks, deteksi beberapa gena dalam satu reaksi, berdasarkan pada pelacak yang berlabel warna yang berbeda, pada spesifitas pelacak sehingga semua gena target teramplifikasi dengan efisiensi hampir sama. Metoda ini juga mencegah gangguan pengukuran yang disebabkan oleh primer dimer. Akan tetapi, pelacak ini tidak mencegah efek penghambatan dimer primer, yang mungkin menekan akumulasi amplicon yang diinginkan pada reaksi ini.

Tabel 11.3. Perbandingan antara metode SYBR Green dengan TaqMan

	SYBR Geen	TaqMan
Spesifitas	Cukup	Tinggi
Kepekaan	Bervariasi	1-10 molekul
Reprodusibilitas	Cukup	Tinggi
Multipleks	Ya	Ya
Kuantifikasi ekspresi gena	Rendah	Tinggi
Penggunaan	Ekspresi gena, kuantifikasi DNA awal	Ekspresi gena, kuantifikasi DNA awal, deteksi mutasi misalnya SNP.

PCR dilakukan seperti biasanya, dan ditambah pelacak reporter. Begitu reaksi mulai, selama tahap hibridisasi baik pelacak maupun primer menempel target DNA. Pelacak TaqMan ini pada salah satu ujungnya membawa reporter fluoresen (5' fluoresen turunan FAM) dan pada ujung lainnya membawa senyawa pemadam fluoresensi FAM (3', rodamin turunan TAMRA). Beberapa fluorofor yang sering digunakan adalah 6-carboxyfluorescein (*FAM*), atau *tetrachloro-fluorescein* (TET) pemadam seperti *tetramethylrhodamine* (TAMRA) (Tabel 11.2). Molekul pemadam menyerap fluoresensi yang diemisikan oleh fluorofor ketika senyawa itu tereksitasi karena sinar melalui FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Jika letak reporter fluoresensi relative dekat pada senyawa pemadam maka tidak terjadi fluoresensi karena energi yang ditangkap reporter ditarik senyawa pemadam. Sedangkan pada polimerisasi untai DNA baru dimulai dari primer, dan ketika polimerisasi mencapai pelacak, aktivitas eksonuklease 5'-3' dari Taq polimerase akan mendegradasi pelacak sehingga melepaskan reporter fluoresen FAM dari senyawa pemadam yang dapat dideteksi dan menghasilkan kenaikan intensitas fluoresensi. Intensitas fluoresensi ini sesuai dengan jumlah pelacak

yang terdegradasi yang berarti juga sesuai dengan jumlah amplicon yang terbentuk yang ditemplei pelacak itu (Gambar 11.14). Fluoresensi dideteksi dan diukur oleh detektor alat PCR dan kenaikan ini sesuai dengan kenaikan jumlah amplicon yang digunakan untuk menentukan siklus kuantifikasi (Cq) pada setiap reaksi.



25

Gambar 11.14. Hidrolisis pelacak TaqMan. Ketika pelacak untuk fluoresensi reporter dipadamkan. A. Pelacak hibridisasi pada target dan tidak terjadi fluoresensi. B, Pada waktu sintesis DNA, pelacak didegradasi oleh Taq polimerase dan terjadi fluoresensi [24].

Desain primer dan pelacak untuk metoda TaqMan

Banyak perangkat lunak untuk mendesain primer dan pelacak untuk metoda TaqMan, diantaranya SciTools Web Tools dan biasanya memberikan hasil baik untuk qPCR.

Primer. Panjang primer sebaiknya antara 18 – 30 basa dan perlu diperhatikan nilai Tm dan spesifitasnya. Primer tidak boleh membentuk struktur sekunder yang kuat dan komplemen sendiri atau dengan primer pasangannya. Perangkat lunak akan memberikan beberapa pasang primer dan ada petunjuk dibawah ini yang perlu diperhatikan.

1. Suhu leleh (T_m): Suhu leleh optimal primer adalah $60 - 64^{\circ}\text{C}$, dengan suhu ideal 62°C , yang berdasarkan suhu optimum reaksi. Suhu leleh kedua primer tidak berbeda lebih dari 2°C , supaya menempel target bersamaan dan menghasilkan efisiensi amplifikasi.
2. Suhu *annealing* primer tergantung pada panjang dan susunan basanya, tidak boleh lebih rendah 5°C di bawah T_m primer. Jika suhu *annealing* terlalu rendah, primer akan menempel pada non-target walaupun ada basa yang tidak komplemen sehingga hasil ampikon yang diharapkan rendah. Sebaliknya, jika suhu *annealing* terlalu tinggi, efisien amplifikasi menurun karena jumlah target yang ditempel primer berkurang.
3. Kandungan GC paling ideal adalah 50% dan tetap spesifik.
4. Tidak boleh ada bagian yang mengandung 4 atau lebih G berturut turut.
5. Panjang ampikon sekitar 70 - 150 pb supaya dapat diperoleh T_m pelacak yang baik.

Pelacak. Penggunaan pelacak dengan pemadam ganda akan memberikan latar belakang yang rendah dan dan sinyal yang lebih tinggi daripada pelacak dengan pemadam tunggal. Pada pelacak dengan pemadam tunggal, panjang pelacak 20 – 30 basa. Dari beberapa pelacak yang dihasilkan oleh perangkat lunak, dipilih sesuai petunjuk dibawah ini.

1. Sebaiknya pelacak dekat dengan salah satu primer, tetapi tidak boleh berimpitan dengan primer
2. T_m pelacak $6 - 8^{\circ}\text{C}$ lebih tinggi daripada T_m primer. Jika T_m pelacak terlalu rendah, persentase pelacak menempel pada target juga rendah. Pada kasus seperti ini, terjadi amplikasi tetapi hanya sedikit ampikon yang ditempeli pelacak sehingga

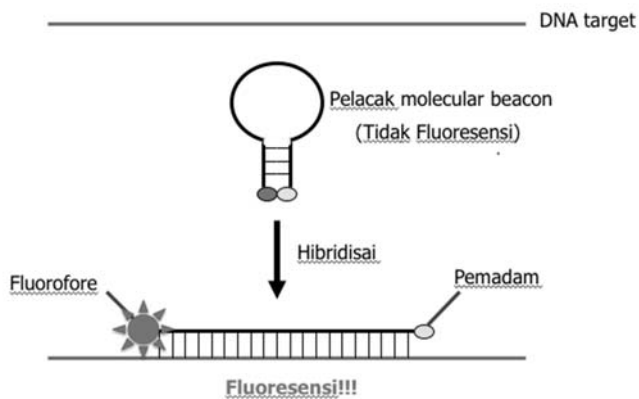
ga intensitas fluoresensi tidak sesuai dengan jumlah ampikon.

3. Suhu *annealing* tidak boleh lebih rendah 5°C dibawah T_m primer terendah dan perlu dilakukan optimalisasi.
4. Pada ujung 5' hindari nukleotida G supaya tidak terjadi pemadaman 5' fluorofor.

7. Metoda *molecular beacon*

Sejak dikenalkan 1996 *molecular beacon* banyak digunakan secara luas dalam bidang biologi. Urutan pelacak yang spesifik untuk mengidentifikasi fragmen target. Metoda *molecular beacon* merupakan kelompok hibridisasi pelacak, yang menghasilkan fluoresensi ketika pelacak menempel pada target. Bentuk pelacak ini berupa jepit rambut dan bagian tengah mempunyai urutan yang komplemen dengan DNA target, diapit oleh 5-6 basa yang komplemen sehingga berpasangan. Fluorofor terikat pada ujung 5' pelacak, sedangkan pemadam, DABCYL, pada ujung 3' (Gambar 11.15). *Molecular beacon* hibridisasi pada siku target ampikon. Peristiwa ini tidak mengganggu penempelan primer dan sintesis DNA. *Molecular beacon* didesain sedemikian rupa sehingga dapat hibridisasi pada target pada suhu *annealing* primer. Akan tetapi pada suhu tersebut *molecular beacon* bebas tetap tidak berfluoresensi. Umumnya panjang pelacak 22 -30 nukleotida. T_m pelacak sebaiknya 7 – 10°C di atas suhu *annealing* primer. Pada waktu pelacak ini ini tidak menempel pada target posisi fluorofor dekat dengan pemadam sehingga fluoresensi fluorofor dipadamkan secara pemindahan energi oleh pemadam. Ketika pelacak menempel pada target, terjadi perubahan konformasi sehingga fluorofor berfluoresensi. Metoda ini sangat spesifik, dan dapat mendeteksi urutan DNA genom, polimorfisme satu basa yang berarti membedakan antara target yang hanya berbeda satu basa, dan ekspresi suatu gena.

Pada reaksi PCR maka target teramplifikasi, pelacak dapat menempel dengan stabil selama tahap penempelan pelacak. Intensitas fluoresensi pada tahap ini sesuai dengan jumlah amplicon yang dihasilkan. Kelebihan metoda ini dapat digunakan beberapa pelacak dengan fluorofor yang berbeda warna fluoresensinya. Hal ini berarti metoda ini dapat dilakukan secara multiplek dimana beberapa fragmen DNA dapat diamplifikasi dan dideteksi secara bersamaan dalam satu tabung.



Gambar 11.15. Cara kerja pelacak *molecular beacon*. Ketika pelacak belum hibridisasi fluoresensi reporter dipadamkan. Ketika pelacak hibridisasi pada target dan terjadi fluoresensi karena jarak antara fluorofor jauh dengan pemadam [16].

Pelacak *molecular beacon* didesain untuk hibridisasi 7-10°C lebih tinggi daripada primer, untuk meyakinkan deteksi sebelum primer diperpanjang. Sedangkan bagian pengapit cukup pendek sehingga tidak mengganggu saat hibridisasi. Metoda ini banyak digunakan untuk analisis SNP dan dapat dilakukan secara kuantitatif.

Target

- 1) DNA target dan sekuen primer dan DNA cetakan dapat mempengaruhi efisiensi amplifikasi PCR.
- 2) Target teramplifikasi 75 -250 pasang basa.

- 3) Hindari sekuen target yang dapat membentuk struktur sekunder yang kuat.
- 4) Analisis sekuen terpilih dengan program DNA folding seperti DNA mfold atau UNAFold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>).

Desain primer

- 1) Primer mengandung GC antara 50 – 60%.
- 2) Tm primer antara 50 – 65°C.
- 3) Hindari struktur sekunder yang kuat.
- 4) Hindari adanya pengulangan G/C lebih dari 3 basa.
- 5) Hindari adanya primer dimer.
- 6) Pada ujung primer sebaiknya berupa G/C.
- 7) Hindari primer menempel pada non-target, yang berarti kurang spesifik. Gunakan BLAST, “Basic Local Alignment Search Tool” untuk mengujinya.
- 8) Uji primer terpilih menggunakan RT-PCR menggunakan SYBR Green untuk melihat selektifitas dan efisiensi amplifikasi.

Desain *molecular beacon*

Molecular beacon didesain sedemikian rupa sehingga dapat hibridisasi pada target pada suhu *annealing*. Akan tetapi, *molecular beacon* bebas tetap tertutup sehingga tidak berfluoresensi pada suhu itu. Berbagai perangkat lunak dapat menghasilkan ini. Biasanya Panjang pelacak antara 22 – 30 nukleotida dengan Tm 7 – 10°C diatas suhu *annealing*. Bagian pelacak ini dapat diuji pola dinaturasi termal. Semakin panjang bagian pelacak menyebabkan tetap terjadi hibridisasi pada suhu *annealing* walaupun ada bagian yang tidak komplemen.

1. Apabila bagian pelacak ini komplemen dengan target, *molecular beacon* harus membentuk hibrid yang stabil dengan target.

2. Jika ada bagian yang tidak komplemen dengan target, *molecular beacon* tetap dalam struktur tertutup sehingga tidak terjadi fluoresensi.
3. Dipilih sekuen pelacak yang akan terdenaturasi dari target pada suhu 5 – 8°C di atas suhu *annealing*.

Desain Stem-loop

Setelah memilih sekuen pelacak, perlu ditambahkan sekuen dua pengapit yang komplemen. Bagian ini harus tetap berikatan pada suhu *annealing*. PRIMER BIOSOFT menawarkan perangkat lunak untuk desain ini, <http://www.premierbiosoft.com/qpcr/>. Daftar petunjuk untuk desain:

1. Pelacak mengandung beberapa basa, G dan C, pada awal bagian pengapit.
2. Penggunaan fluorofor dapat ditambahkan dengan fosforamidit untuk mendapatkan hasil optimum, walaupun label lain dapat juga digunakan.
3. Pada ujung 5' diletakan pemadam seperti dabsil.
4. Hindari peletakan G di samping fluorofor karena akan menurunkan fluoresensi.
5. Bagian pengapit biasanya 5 atau 6 basa yang tersusun oleh GC. Standar bagian itu adalah CCGCGC-pelacak-GCGCGG. Tm bagian ini dapat berubah tergantung dari panjang dan sekuen bagian pelacak.

8. Multiplex PCR

Multiplex polymerase chain reaction (Multiplex PCR) pertama kali digunakan untuk mendeteksi delesi pada gena distrofin. Pada 2000, multiplex-PCR digunakan untuk analisis mikrosatelit dan polimorfi satu basa (SNP). Pada bidang kesehatan, multiplex-PCR digunakan unuk mendeteksi beberapa agen penyakit secara bersama-

an, misal pada deteksi *E.coli* dan *S.thypi*. Proses ini mengamplifikasi sampel DNA genom dengan menggunakan beberapa pasang primer untuk menghasil amplicon dengan ukuran berbeda dari target yang berbeda. Semua pasangan didesain dapat bekerja pada suhu penempelan sama. Reaksi multipleks ini dapat dibagi dalam dua macam: (1) Reaksi PCR dengan cetakan tunggal, misalnya DNA genom manusia pada deteksi penyakit thalassemia sebagai target beberapa pasang primer, dan (2) Reaksi PCR dengan beberapa cetakan, misalnya pada deteksi jenis *Plasmodium* penyakit malaria. Tehnik ini juga dapat digunakan dalam reaksi deteksi beberapa mt-DNA dari binatang, misalnya babi, ayam, sapi, domba dan kuda dan menggunakan beberapa pasang primer.

Parameter desain primer untuk multiplex-PCR

Sangat perlu memperhatikan dalam mendesain primer supaya menghasilkan amplicon spesifik dengan hasil baik.

- 1) Panjang primer
Dalam *multiplex*-PCR digunakan beberapa pasang primer, maka diperlukan primer dengan panjang sekitar 18 – 22 basa.
- 2) Suhu leleh
Suhu leleh (T_m) primer antara 55°C – 60°C dengan perbedaan antara 3° – 5°C . Pada primer dengan rasio GC tinggi dapat digunakan suhu leleh lebih tinggi.
- 3) Spesifitas
Perlu diperhatikan spesifitas primer terhadap target karena terjadi kompetisi berbagai target dalam satu pereaksi
- 4) Hindari pembentukan primer dimer
Perlu diperhatikan kemungkinan terjadinya primer dimer terhadap semua primer yang digunakan. Adanya primer dimer dapat menyebabkan amplifikasi tidak spesifik.

Salah satu perangkat lunak untuk mendesain primer dalam *multiplex-PCR* adalah *PrimerPlex*.

Keuntungan multiplex-PCR

1) Kontrol internal

Masalah utama pada PCR konvensional dapat menghasilkan negatif palsu karena kegagalan reaksi atau positif palsu karena kontaminasi. Negatif palsu dapat terungkap pada sistem multiplex karena setiap amplicon ada kontrol internal untuk fragmen lain yang teramplifikasi.

2) Efisiensi

Jumlah pereaksi dan waktu analisis lebih sedikit pada *multiplex-PCR* dari pada *uniplex-PCR* karena menggunakan beberapa tempat reaksi. Reaksi multiplex sangat cocok untuk mengurangi biaya analisis dan juga karena jumlah sampel yang sedikit.

3) Indikasi kualitas DNA

Kualitas DNA target ditetapkan lebih efektif pada reaksi *multiplex-PCR* daripada PCR biasa.

4) Indikasi jumlah DNA

Amplifikasi eksponensial dan standar internal pada *multiplex-PCR* dapat digunakan untuk menghitung jumlah DNA awal. Perhitungan jumlah DNA awal lebih akurat dengan *multiplex-PCR* karena jumlah DNA baku, jumlah siklus reaksi sama, antara baku dan target.

F. Kuantifikasi Metode *Real-Time* PCR

Analisis kuantitatif didasarkan pada tiga parameter penting kurva *real-time* PCR (Gambar 11.8), yakni,

1) *Baseline*

Baseline merupakan tingkat sinyal selama siklus awal PCR dimana hanya terdapat sedikit perubahan yang tidak signifi-

kan pada sinyal fluorosens. *Baseline* umumnya terjadi dari siklus 3 – 15. Sinyal pada *baseline* dapat disamakan dengan *background* atau *noise* reaksi. Penetapan *baseline* harus dilakukan secara cermat untuk menentukan *threshold cycle* (C_t) yang akurat. Penentuan *baseline* harus memperhitungkan nilai siklus yang cukup untuk menghilangkan *noise* yang ditemukan pada siklus awal amplifikasi, tetapi juga tidak mencakup siklus dimana sinyal amplifikasi mulai naik di atas sinyal *noise* [22].

2) *Threshold*

Threshold merupakan tingkat sinyal reaksi PCR yang mencerminkan peningkatan yang signifikan secara statistik terhadap sinyal *baseline*. *Threshold* ditetapkan untuk membedakan sinyal amplifikasi dari sinyal *noise*. *Threshold* ditetapkan pada fase eksponensial dari kurva amplifikasi PCR (Karlen et al, 2007; Life Technologies, 2012).

3) *Threshold cycle* (C_t)

Threshold cycle merupakan angka siklus dimana sinyal fluorosens reaksi melewati *threshold* yang ditetapkan. Parameter ini digunakan untuk menghitung jumlah DNA awal yang terdapat dalam sampel. Lebih lanjut, nilai C_t berbanding terbalik dengan jumlah awal DNA target. Semakin tinggi nilai C_t maka semakin kecil jumlah DNA awal pada sampel

Kuantifikasi hasil *real-time* PCR, dapat menggunakan 2 metode, yakni *absolute quantification* dan *relative quantification*. Metode *absolute quantification* digunakan untuk menentukan jumlah awal DNA target pada sampel yang dianalisis. Metode kuantifikasi ini dilakukan dengan membandingkan nilai C_t dari sampel uji dengan kurva standar, yang mana nantinya hasil analisis metode *absolute quantification* disajikan sebagai jumlah asam nukleat (*copy number*, μg) per jumlah sampel. Kurva standar tersebut, dibuat dengan ber-

dasar pada seri pengenceran dari konsentrasi DNA *template* yang diketahui. Konsentrasi yang dipilih pada kurva baku harus mencakup perkiraan konsentrasi dari target DNA dalam sampel percobaan. Selanjutnya, nilai log dari setiap konsentrasi pada seri kadar disajikan sebagai sumbu x, diplotkan terhadap nilai C_t pada masing-masing konsentrasi terkait sebagai sumbu y. Dari kurva standar tersebut, dapat diketahui pula informasi mengenai jalannya reaksi serta parameter-parameter reaksi, di antaranya *slope*, *y-intercept*, dan koefisien korelasinya [22]. Lebih lanjut, nilai *slope* tersebut dapat digunakan untuk menghitung nilai efisiensi reaksi, yakni dengan rumus:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

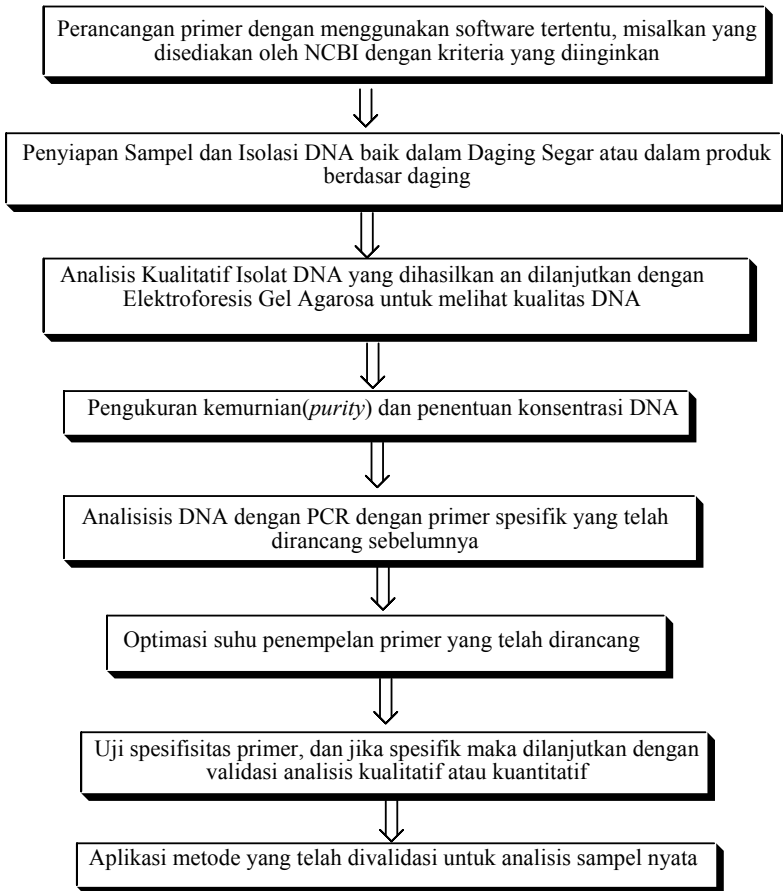
Metode kedua yakni *relative quantification* sebagian besar diaplikasikan pada studi ekspresi gen, yang mana tingkat ekspresi dari gen target pada sampel satu dibandingkan dengan ekspresi gen yang sama dalam sampel lain, atau biasa disebut *calibrator sample*. Metode ini tidak memerlukan penentuan *copy number* secara tepat. Terdapat tiga metode untuk uji *relative quantification*, yakni metode *Livak* atau dikenal sebagai metode $2^{-\Delta\Delta C_t}$, metode ΔC_t , dan metode Pfaffl. Hasil analisis metode *relative quantification* berupa rasio jumlah relatif (*fold difference*) dari asam nukleat target untuk jumlah sampel uji yang setara [25].

G. Aplikasi PCR dan qPCR untuk Analisis Kehalalan Produk

PCR dapat diaplikasikan pada berbagai bidang seperti biologi molekuler, genetika, forensik dan juga teknologi makanan. Saat ini, PCR banyak digunakan untuk identifikasi asal spesies daging dan produk daging untuk analisis kehalalan produk [26]. Hal ini disebabkan karena PCR merupakan metode berbasis DNA yang memiliki spesifisitas dan sensitivitas tinggi. DNA adalah molekul biologis yang

bersifat stabil, dapat bertahan dalam jangka waktu yang lama, dan terdapat pada berbagai jaringan organisme. Oleh karena itu, analisis asal spesies dapat dilakukan meskipun sudah melalui berbagai proses olahan.

PCR merupakan metode pilihan (*method of choice*) untuk identifikasi DNA dalam produk makanan atau dalam bidang lain dengan keunggulan PCR meliputi: (1) metode yang sederhana, mudah dimengerti dan mudah digunakan; (2) spesifisitas dan sensitivitas tinggi; (3) mampu menghasilkan miliaran salinan fragmen DNA target atau gen tertentu, sehingga dapat digunakan untuk identifikasi sekuens gen dengan bantuan metode elektroforesis; dan (4) proses berjalan cepat dan hemat biaya. Penggunaan metode PCR juga memiliki beberapa keterbatasan, yang meliputi: (1) akibat sensitivitas metode yang tinggi, PCR dapat mengamplifikasi adanya kontaminan pada sampel dengan sejumlah kecil jejak DNA yang menghasilkan produk yang tidak tepat; (2) desain primer PCR membutuhkan beberapa data sekuens sebelumnya agar dapat digunakan untuk identifikasi ada tidaknya gen target; (3) primer pada PCR dapat menempel secara tidak spesifik pada sekuens yang mirip dengan DNA target apabila temperatur *annealing* yang digunakan tidak sesuai; dan (4) DNA *polymerase* dapat memasukkan nukleotida yang salah ke dalam urutan PCR. Hal ini dapat memicu terjadinya perubahan sekuens pada fragmen yang dihasilkan dari proses PCR [1]. Pengembangan metode PCR untuk identifikasi spesies daging untuk tujuan autentikasi sebagaimana dalam Gambar 11.16.



Gambar 11.16. Tahapan analisis (identifikasi) spesies daging dalam produk makanan dengan menggunakan *real-time* PCR (Rohman *et al.*, 2017).

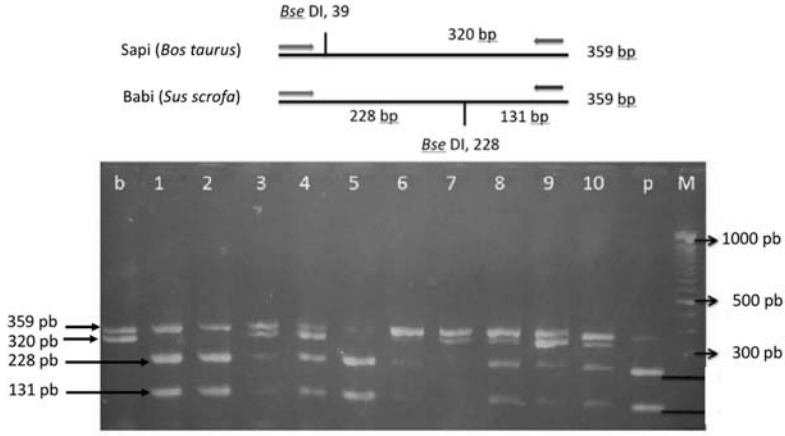
1. Aplikasi PCR konvensional untuk autentikasi halal

Polymerase chain reaction-restriction fragmet length polymorphism (PCR-RFLP) dengan menggunakan enzim restriksi *BseDI* dapat mengidentifikasi daging babi dalam campuran daging sapi pada makanan olahan, dalam hal ini bakso. Gen *cytochrome b* (*cyt b*) pada DNA mitokondria sebagai target, karena pada daerah itu dapat menunjukkan spesies tertentu. Selain gen *cyt b* dapat juga digunakan gen 12S rRNA dan daerah pengatur. Keuntungan penggunaan DNA adalah jumlah mt-DNA ratusan dalam satu sel. Sepasang pri-

mer yang didesain ini (Gambar 17) dapat mengamplifikasi *cyt b* babi maupun sapi dan menghasilkan amplicon yang sama panjangnya, yakni 359 pb. Jika amplicon babi dipotong dengan enzim *BseDI* menghasilkan fragmen dengan ukuran 131 pb dan 228 pb. Sedangkan amplicon sapi dipotong *BseDI* menjadi 39 pb dan 320 pb.

Metoda ini kemudian digunakan untuk menganalisis 39 sampel bakso yang beredar di Yogyakarta dan Surabaya. Ukuran amplicon sebelum dipotong dengan enzim *BseDI* adalah 359 pb. Munculnya fragmen dengan ukuran 131 pb dan 228 pb menunjukkan bahwa sampel bakso itu mengandung daging babi dan jika muncul fragmen 320 pb berarti mengandung daging sapi. Umumnya fragmen 39 pb sulit dilihat karena ukuran yang kecil sehingga intensitas warna menjadi lemah.

CYT b FW 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3'
 CYT b REV 5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3'

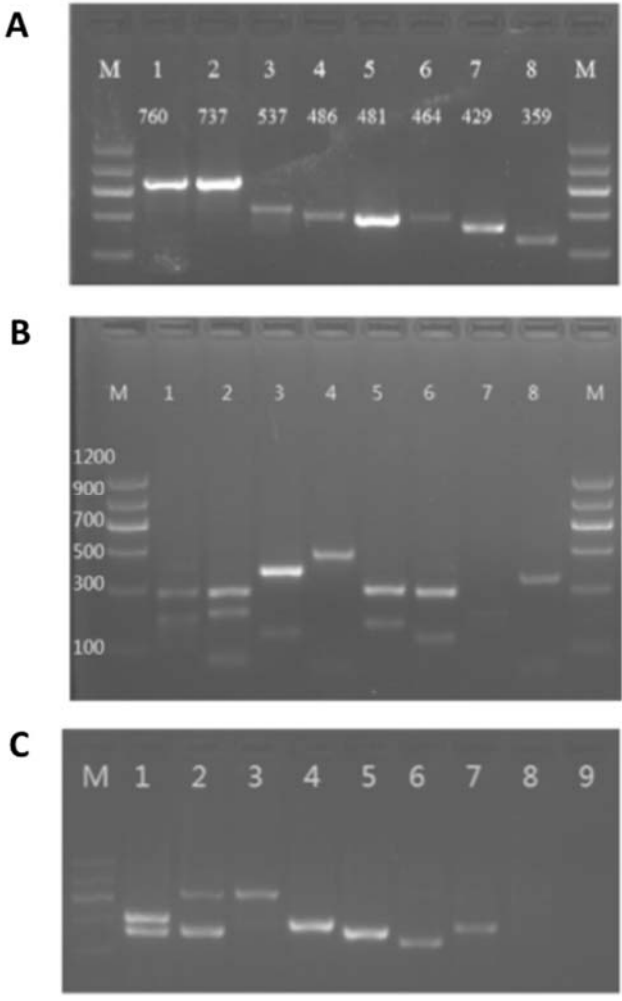


Gambar 11.17. Elektrofogram sampel bakso dari Yogyakarta dan Surabaya. Atas = Sikuen primer yang digunakan. Tengah = Letak pemotongan enzim *BseDI* pada amplicon sapi dan babi dan sapi. C = Elektrofogram pemotongan amplicon. Amplicon berukuran 359 pb, daging babi muncul pita pada 131 dan 228 pb; sapi 320 pb. **b**: sapi; **p**: babi; **M**: marker DNA. Gambar diadaptasi dari [27] [28].

Pada kolom b (sapi) muncul dua pita dengan ukuran 359 pb dan 320 pb yang berarti pemotongan amplikon dengan *BseDI* belum sempurna. Pada kolom p ada pita 359 pb, 228 pb dan 121 pb berturut turut menunjukkan amplikon babi utuh dan fragmen babi. Kolom 1, 2 dan 5 adalah bakso babi, kolom 3, 4, 6, 8, 9 dan 10 merupakan campuran daging sapi dan babi, kolom 7 hanya mengandung sapi.

Metoda PCR-RFLP dapat juga digunakan untuk identifikasi spesies. Sikuen mt-DNA dari kambing, domba, rusa, kerbau, sapi, lembu, babi, dan onta diperoleh dari bank data NCBI disejajarkan dengan perangkat lunak *ClustalW sequence alignment tool* untuk memilih daerah yang mempunyai sikuen sama. Sikuen itu dipilih dan dijadikan sepasang primer, primer sense (5'-CCTCCCTAAGACTCAGGG- AA-3') dan primer antisense (5'-AGCGGGTTGCTGGTTT-CACG-3'). Sepasang primer ini akan menghasilkan amplikon dengan panjang berturut turut 760 pb, 737 pb, 537 pb, 486 pb, 481 pb, 464 pb, 429 pb, dan 359 pb untuk kambing, domba, rusa, kerbau, sapi, lembu, babi, dan onta. Sepasang primer ini tidak mengamplifikasi binatang lain dan juga ikan. Batas deteksinya bervariasi dari 0,01 ng sampai 0,05 ng DNA genom. Untuk lebih membedakan antara spesies yang dianalisis, sikuen amplikon dilihat pola pemotongan enzim restriksi dengan program Mapdraw dari DNASTAR. Enzim yang dipilih yang hanya mempunyai 1-2 lokus pemotongan atau bahkan tidak memotong sama sekali, dan dipilih enzim *SspI* untuk memotong masing masing amplikon. Gambar 18.A menunjukkan bahwa setiap spesies menghasilkan amplikon dengan ukuran berbeda dengan spesies lain, dengan panjang berturut turut 760 pb, 737 pb, 537 pb, 486 pb, 481 pb, 464 pb, 429 pb, dan 359 pb untuk kambing, domba, rusa, kerbau, sapi, lembu, babi, dan onta. Gambar 18.B merupakan analisis lebih lanjut pemotongan masing masing amplikon dengan enzim *SspI*. Metoda diuji coba dengan daging yang terdapat dipasar dan berhasil menunjukkan spesies daging, bahkan

dapat menunjukkan pada kolom 1 dan 2 yang berlabel rusa dan domba ternyata mengandung daging babi (Gambar 18.C).



Gambar 11.18. Elektrogram analisis PCR-RFLP dari delapan spesies binatang. **A.** Amplikon sebelum dipotong. Kolom M merupakan marker DNA; kolom 1-8 berturut-turut adalah amplikon dari kambing, domba, rusa, kerbau, sapi, lembu, babi, dan onta. **B.** Hasil PCR-RFLP dari delapan binatang target. **C.** Identifikasi daging di pasar. Kolom 1-7 berlabel rusa, domba, domba, sapi, babi, onta dan lembu. Kolom 8 DNA kedelai, dan kolom 9 adalah control negatif. Sampel pada kolom 1 dan 2 mengandung babi. Diadaptasi dari Guan et al. [29].

Metoda PCR konvensional ini relatif sederhana dan cepat untuk menguji spesies daging dan dapat dilakukan pada kebanyakan laboratorium. Metoda ini dapat digunakan untuk analisis rutin untuk menetapkan kecurangan dan atau tidak menyertakan tambahan daging lain pada produk daging olahan. Metoda PCR konvensional seperti di atas merupakan metoda analisis yang sederhana dan berguna tetapi memiliki kekurangan seperti tidak dapat untuk analisis kuantitatif, kurang kepekaan, dan kecepatan analisis. Dengan menggunakan metoda *real-time* PCR, masalah yang ditemui dengan PCR konvensional tersebut diatasi.

2. Aplikasi *real-time* PCR untuk autentikasi halal

Aina *et al.* [30] telah menggunakan *real-time* PCR menggunakan primer spesifik yang telah dirancang dengan bantuan *software* yang disediakan oleh NCBI (*National Center for Biotechnological Information*) secara *in silico*. Desain ini bertujuan mendapatkan primer yang spesifik untuk mengidentifikasi celeng. Desain primer dimulai dengan memilih *template* DNA yang diinginkan. *Template* diambil dari GenBank yang telah tersedia pada website NCBI. Setelah itu tahapan selanjutnya adalah memasukkan parameter yang diinginkan pada *software* dari PrimerQuest secara *online*. Tujuan desain primer ini adalah untuk mendapatkan pasangan primer yang spesifik terhadap DNA celeng. Parameter yang dimasukkan disesuaikan dengan kriteria primer ideal yang dipersyaratkan yaitu dengan mempertimbangkan panjang sekuen primer, *melting temperature*, *product size*, persentase GC, dan GC *clamp* yang optimum secara teoritis. Hasil desain primer secara *in silico* dengan target gen sitokrom-b mtDNA celeng didapatkan 5 buah primer dalam Tabel 11.4.

Tabel 11.4. Susunan primer Hasil desain primer secara *in silico* dengan target gen sitokrom-b mtDNA celeng [30].

Primer	Sekuen	Tm (°C)	GC (%)	Panjang ampikon
Primer 1	<i>Forward</i> GGAGCTACGGTCATCACAAA	62	50	143
	<i>Reverse</i> ATGACGAAGGGCAGGATAAAG			
Primer 2	<i>Forward</i> CGGTTCCCTCTTAGGCATTT	62	50	191
	<i>Reverse</i> GGATGAACAGGCAGATGAAGA			
Primer 3	<i>Forward</i> AGGCCGGGGCCTATATTA	62	55,6	192
	<i>Reverse</i> TCTACGAGGTCTGTTCCGAT			
Primer 4	<i>Forward</i> TCTTCATCTGCCTGTTTCATCC	62	47,6	165
	<i>Reverse</i> CCGTAGCTCCTCAGAATGATATTT			
Primer 5	<i>Forward</i> CGGATGACTTATTCGCTACCTAC	62	47,8	166
	<i>Reverse</i> GCCTATGAAGGCTGTTGCTATAA			

Kandidat primer selanjutnya dilakukan prosedur BLAST terhadap DNA dari organisme pembanding yaitu sapi, babi ternak, kambing, anjing, ayam, dan kelinci. Penggunaan DNA babi sebagai pembanding dikarenakan pada kasus pengoplosan bakso sapi yang banyak digunakan adalah daging celeng, bukan babi ternak. Secara genetik celeng dan celeng memiliki tingkat homologi yang sangat tinggi namun penampilan fisik keduanya sangat berbeda. Daging celeng memiliki tekstur dan warna yang sangat mirip dengan daging sapi. Berbeda dengan daging babi yang dapat dengan mudah dipisahkan dengan daging sapi. Hal ini lah yang menyebabkan celeng lebih disukai untuk digunakan dibandingkan babi ternak. Dari kelima primer di atas, akhirnya dipilih primer CYTBWB2-wb (primer 2) karena spesifik terhadap daging celeng.

Forward: CGG TTC CCT CTT AGG CAT TT;

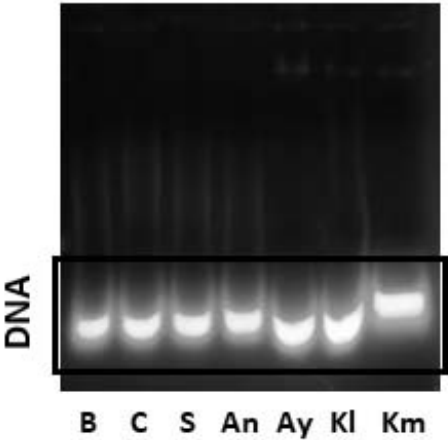
Reverse: GGA TGA ACA GGC AGA TGA AGA

Primer ini selanjutnya digunakan untuk amplifikasi DNA *template* yang diisolasi dari daging segar dan dari bakso yang mengandung campuran daging sapi dan daging celeng.

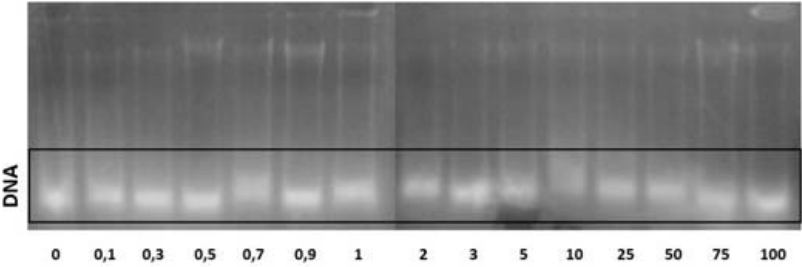
Isolasi DNA dimaksudkan untuk memisahkan DNA dari matriks (daging dan bakso). Jenis daging yang digunakan adalah daging celeng, babi, kelinci, ayam, kambing, sapi, dan anjing. Pemilihan jenis daging berdasarkan pertimbangan, utamanya daging tersebut sering digunakan ataupun memiliki kemungkinan untuk dijadikan sebagai bahan baku atau campuran bakso. Daging yang digunakan sebelumnya telah dihilangkan lemaknya untuk mempermudah proses isolasi DNA. Metode isolasi yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraksi DNA secara manual dengan metode *Phenol-chloroform-isoamyl alcohol* (PCIA). Proses isolasi dengan metode ini terdiri dari 3 tahap, yaitu lisis sel, pemurnian DNA dari komponen pengganggu, dan pengendapan DNA. Setelah didapatkan DNA kemudian dilakukan pengujian secara kualitatif menggunakan elektroforesis agarosa serta pengujian secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer untuk menentukan *yield* (konsentrasi) dan kemurnian.

Pengujian secara kualitatif bertujuan untuk melihat keberadaan DNA dalam isolat serta mengetahui kualitas DNA yang didapat. Molekul DNA akan bergerak dalam matriks berupa gel agarosa karena adanya arus listrik dari kutub negatif ke arah kutub positif. Hal ini dikarenakan molekul DNA memiliki muatan negatif pada gugus fosfat sehingga ketika terdapat arus listrik maka molekul DNA tersebut akan ikut bermigrasi ke arah kutub positif. Pada pengujian dengan elektroforesis ini digunakan *florosafe* sebagai pewarna florensensi. *Florosafe* tidak bersifat toksik sehingga aman bagi peneliti. Pewarna ini akan berinterkalasi dengan *double helix* DNA sehingga DNA akan nampak kuning kehijauan terang jika dilihat di bawah sinar UV. Hasil isolasi yang baik akan memberikan hasil elektroforesis yang hanya memunculkan satu pita yaitu DNA murni tanpa

adanya *smear*. Jika DNA tercampur dengan RNA maka akan muncul pita RNA pada bagian bawah dikarenakan RNA berukuran lebih kecil dibandingkan DNA. Sedangkan keberadaan *smear* menunjukkan bahwa DNA mengalami degradasi pada saat proses isolasi. Hasil elektroforesis agarosa dapat dilihat pada gambar 11.19 dan 11.20.



Gambar 11.19. Hasil elektroforesis agarosa DNA dari sampel daging segar babi (B), celeng (C), sapi (S), anjing (An), ayam (Ay), kelinci (Kl), dan kambing (Km) (Sumber: Aina et al. [30]).



Gambar 11.20. Hasil elektroforesis agarosa DNA dari sampel bakso referensi celeng: sapi dengan variasi komposisi (%) (Sumber: Aina et al. [30]).

Isolasi DNA berhasil dilakukan dengan cukup baik dan minim degradasi sehingga hanya tampak sedikit *smear*. DNA yang didapat tidak terkontaminasi dengan RNA sehingga hanya muncul satu pita

DNA saja. Pita DNA juga terlihat jelas menandakan DNA yang terisolasi cukup banyak. DNA hasil isolasi selanjutnya dikenai prosedur pengujian secara kuantitatif menggunakan NanoQuant. Penggunaan alat ini lebih efektif dibanding spektrofotometer UV karena jumlah sampel yang dibutuhkan sangat sedikit yaitu 2 μL dan dapat mengukur hingga 16 sampel secara bersamaan sehingga menghemat waktu. *Software* pada alat tersebut juga secara otomatis akan menampilkan data rasio A260/A280 yang digunakan untuk mengetahui kemurnian DNA. DNA dalam keadaan murni jika nilai absorbansi yang diperoleh dari rasio panjang gelombang 260/280 nm sebesar 1,8-2,0. Nilai rasio di bawah 1,8 menandakan hasil isolasi terkontaminasi protein dan di atas 2,0 menandakan adanya kontaminasi RNA. Kemurnian DNA ini penting karena jumlah DNA yang menjadi *template* pada replikasi pada *real-time* PCR akan mempengaruhi proses amplifikasi. Terdapat batasan minimal DNA untuk bisa terjadi proses amplifikasi pada alat tersebut. Hasil pengujian kemurnian DNA hasil isolasi sebagaimana pada Tabel 11.5.

Tabel 11.5. Hasil pengukuran kemurnian DNA hasil isolasi dari daging segar [30].

Daging	260 (nm)	280 (nm)	Konsentrasi (ng/ μL)	Rasio 260/280
Babi	1,9527	0,9746	1952,68	2,00
Celeng	3,1502	1,5661	3150,23	1,87
Sapi	0,1060	0,0707	105,98	1,50
Anjing	2,7870	1,5295	2787,02	1,82
Ayam	3,6008	2,0049	3600,84	1,80
Kelinci	0,1552	0,0885	155,21	1,75
Kambing	0,2751	0,1526	275,13	1,80

Hasil pengukuran secara kuantitatif dari isolasi DNA daging segar menunjukkan bahwa sebagian besar DNA memiliki kemurnian tinggi (Tabel 11.5). Terlihat bahwa nilai rasio A260/A280 yang diperoleh berada pada rentang 1,8-2,0 kecuali pada sapi dan kelinci yang

mana nilainya kurang dari 1,8 menandakan adanya kontaminasi protein. Hal ini mungkin dikarenakan proses penghilangan dengan *proteinase* berjalan kurang sempurna. Hasil isolasi DNA dari bakso referensi (bakso yang dibuat dengan konsentrasi daging celeng dan daging sapi yang diketahui) dalam Tabel 11.6. sebagian memiliki nilai rasio A260/A280 antara 1,8-2,0 dan sebagian lainnya memiliki nilai yang bervariasi namun mendekati rentang yang dipersyaratkan. Konsentrasi yang didapat juga cukup besar sehingga sangat mencukupi untuk analisis *real-time* PCR. Secara umum DNA yang didapat dari hasil isolasi memiliki kemurnian yang cukup tinggi. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode PCIA cocok untuk mengisolasi DNA baik dari daging maupun dari produk bakso.

Tabel 11.6. Hasil pengukuran kemurnian DNA hasil isolasi dari bakso referensi [30].

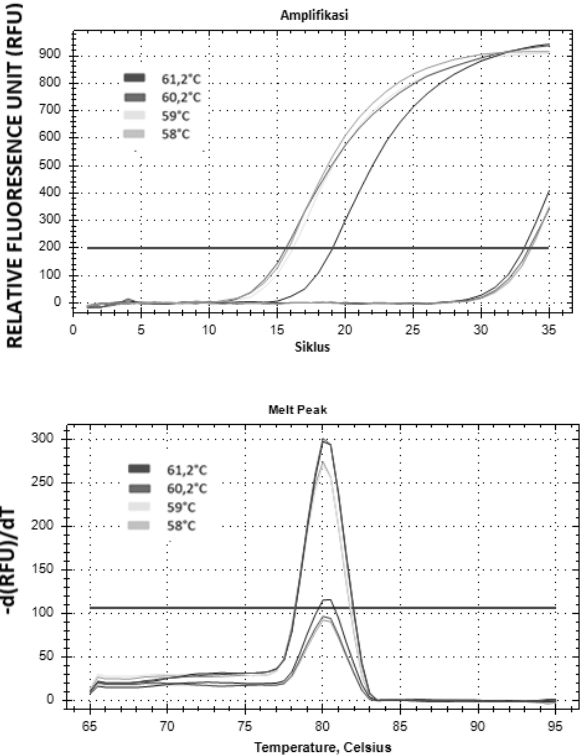
Sampel*	260 (nm)	280 (nm)	Konsentrasi (ng/μL)	Rasio 260/280
Celeng 0%	2,9201	1,4503	2920,11	2,01
Celeng 0,1%	2,6595	1,3208	2659,50	2,01
Celeng 0,3%	2,6642	1,3250	2664,20	2,01
Celeng 0,5%	2,6389	1,3337	2638,90	1,98
Celeng 0,7%	3,0448	1,5932	3044,79	1,91
Celeng 0,9%	2,6045	1,2970	2604,48	2,01
Celeng 1%	3,1253	1,6798	3125,26	1,86
Celeng 2%	2,9994	1,5028	2999,36	2,00
Celeng 3%	2,2853	1,1244	2285,32	2,03
Celeng 5%	2,2820	1,1253	2282,01	2,03
Celeng 10%	1,7706	0,9356	1770,61	1,89
Celeng 25%	3,4918	2,0149	3491,79	1,73
Celeng 50%	3,3489	1,8802	3348,94	1,78
Celeng 75%	2,6195	1,3323	2619,46	1,97
Celeng 100%	3,1281	1,7212	3128,08	1,82

*Celeng 0% maknanya, komposisi daging celeng 0% dan konsentrasi daging sapi 100%; Celeng 5% maknanya, komposisi daging celeng 5% dan konsentrasi daging sapi 95%.

Primer yang dipilih selanjutnya dilakukan analisis PCR dengan menggunakan suhu *annealing* yang optimum. Suhu penempelan (*annealing*) yang dipilih mempertimbangkan nilai *relative fluorescence unit* (RFU) dan jarak siklus amplifikasi DNA celeng dan babi untuk mendapatkan suhu optimum dengan nilai *Ct/Cq* (*cycle threshold/cycle quantification*) paling rendah dan produk non spesifiknya paling minimal. Penambahan parameter jarak siklus dikarenakan DNA babi dan celeng memiliki tingkat homologi organisme yang sangat tinggi sehingga DNA babi kemungkinan besar juga teramplifikasi dengan *melting temperature* yang hampir sama dengan DNA celeng. Optimasi awal menggunakan perkiraan suhu *annealing* berdasarkan *melting temperature* yaitu $\pm 5^{\circ}\text{C}$ dari yang tertera pada kemasan primer. Akan tetapi optimasi yang dilakukan memberikan hasil yang kurang baik yang mana hampir seluruh DNA hewan perbandingan dapat teramplifikasi sehingga primer menjadi tidak spesifik. Oleh karena itu dilakukan optimasi kembali dengan suhu yang lebih tinggi untuk meningkatkan spesifitas dari primer. Pada optimasi awal ini DNA yang digunakan hanya dari DNA yang diisolasi dari daging celeng dan daging babi yang kemiripannya sangat tinggi.

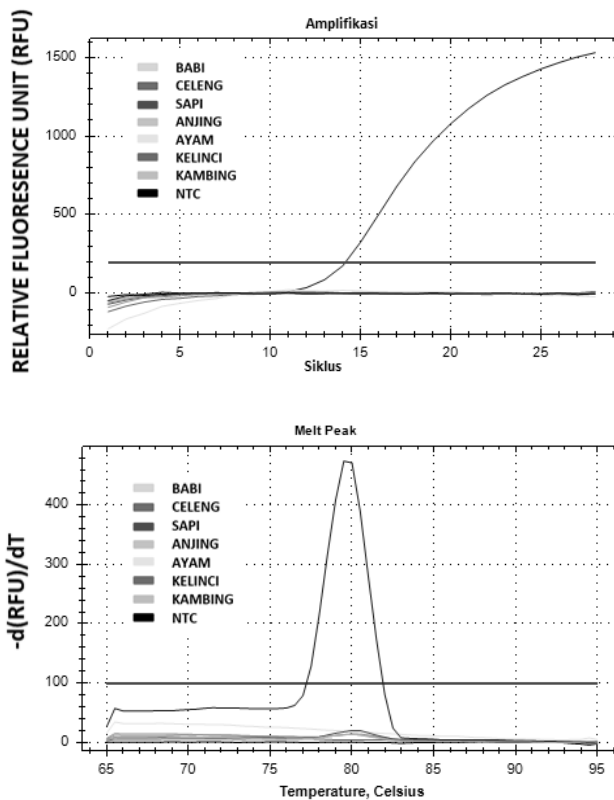
Suhu *annealing* yang digunakan pada optimasi tersebut adalah 61,4; 59,0; dan 55,7°C dengan jumlah siklus sebanyak 35. Dari hasil optimasi ini diperoleh data bahwa primer CYTBWB2 menghasilkan jarak siklus amplifikasi antara celeng dan babi melebihi 30 siklus. Hasil ini menguntungkan untuk pengujian di mana siklus dapat diminimalkan sehingga proses *running* PCR menjadi lebih singkat. Suhu optimum *annealing* yang diperkirakan adalah 59°C dengan pertimbangan RFU yang dihasilkan primer CYTBWB2 terhadap DNA celeng pada suhu tersebut cukup tinggi sedangkan RFU amplifikasi DNA babi rendah serta jarak siklus amplifikasi antara celeng dan babi paling jauh. Berdasarkan hasil tersebut maka primer CYTBWB2 yang dipilih untuk kemudian dioptimasi lanjutan dengan

rentang variasi suhu yang lebih pendek mendekati 59°C untuk mendapatkan suhu optimum *annealing*. Optimasi selanjutnya menggunakan kondisi *running* real-time PCR yang sama dengan variasi suhu yang digunakan yaitu 58,0; 59,0; 60,2; dan 61,2°C. Hasil amplifikasi dan *melting curve analysis* pada berbagai suhu *annealing* terlihat pada Gambar 11.21. Dari optimasi ini diperoleh suhu optimum 59°C yang mana pada suhu ini, primer CYTBWB2 menghasilkan RFU celeng yang cukup tinggi yaitu 911 dan RFU babi yang rendah yaitu 355 serta jarak siklus amplifikasi celeng dan babi yang jauh yaitu 16,13 dan 33,67. Selain itu suhu ini dipilih karena masih dalam rentang suhu *annealing* yang ideal yaitu antara 50-60°C.



Gambar 11.21. Kurva amplifikasi (atas) dan *melt curve analysis* (bawah) primer CYTBWB2 terhadap celeng pada berbagai suhu *annealing* [30].

Primer CYTBWB2 dikenai uji spesifitas pada suhu optimum *annealing* (59°C) dengan jumlah siklus diperpendek menjadi 28 siklus. Gambar 11.22 menunjukkan hasil uji spesifisitas primer CYTBWB2 dan menunjukkan bahwa primer bersifat spesifik, yang mana hanya DNA celeng yang memberikan sinyal positif sementara DNA yang diekstraksi dari spesies hewan pembanding dan *no template control* (NTC) tidak teramplifikasi.

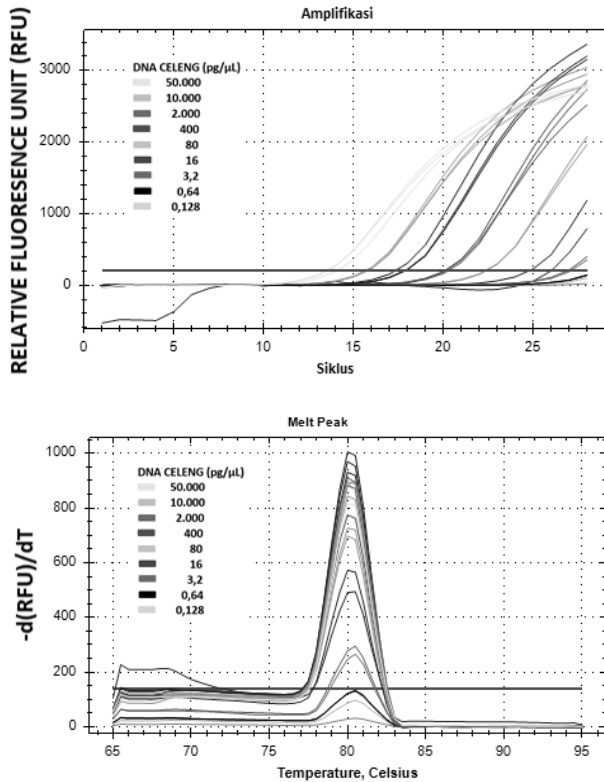


Gambar 11.22. Kurva amplifikasi (atas) dan *melt curve analysis* (bawah) dari primer CYTBWB2 terhadap celeng dan beberapa spesies pembanding [30].

Uji sensitivitas dilakukan untuk mencari batas deteksi (*limit of detection*, LoD). Pengujian sensitivitas ini penting untuk mengetahui berapa konsentrasi terkecil analit (DNA celeng) dalam suatu

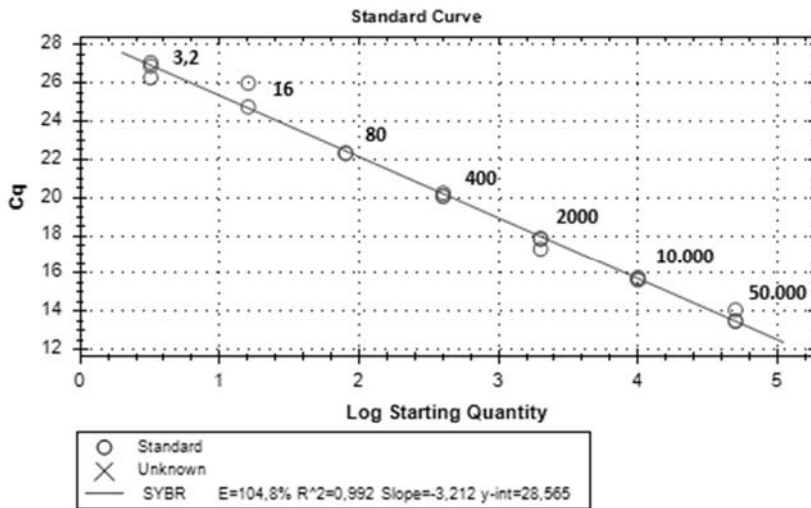
sampel yang masih dapat diamplifikasi menggunakan primer CYTBWB2. Uji sensitivitas pada bakso celeng 100% dilakukan terhadap 9 seri pengenceran DNA bakso celeng 100% (50000, 10000, 2000, 400, 80, 16, 3,2, 0,64, dan 0,128 pg/ μ L). Metode *real-time* PCR dengan primer CYTBWB2 masih dapat mengamplifikasi DNA celeng hingga konsentrasi 3,2 pg/ μ L, hal ini dibuktikan dengan terbentuknya kurva amplifikasi pada konsentrasi 3,2 pg/ μ L. Sedangkan pada konsentrasi di bawahnya yaitu 0,64 pg/ μ L terbentuknya kurva amplifikasi sudah tidak konsisten yang mana hanya terbentuk 1 amplifikasi dari 3 kali replikasi (Gambar 11.23). Pada konsentrasi 0,128 pg/ μ L sudah tidak terbentuk kurva amplifikasi. Hal ini dikarenakan jumlah DNA awal yang terlalu sedikit sehingga membutuhkan jumlah siklus yang lebih banyak agar dapat teramplifikasi. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa batas deteksi metode ini adalah 3,2 pg/ μ L.

Uji sensitivitas melalui penentuan nilai LoD juga dilakukan terhadap DNA yang diekstraksi dari bakso celeng: sapi 0,1%, dan menunjukkan bahwa DNA pada bakso dengan konsentrasi daging Celeng 0,1% masih dapat diamplifikasi menggunakan primer CYTBWB2. Dilihat dari nilai Cq yang dihasilkan kemungkinan konsentrasi DNA celeng yang lebih kecil masih dapat teramplifikasi mengingat batas deteksi pada pengujian sebelumnya mencapai 3,2 pg/ μ L.



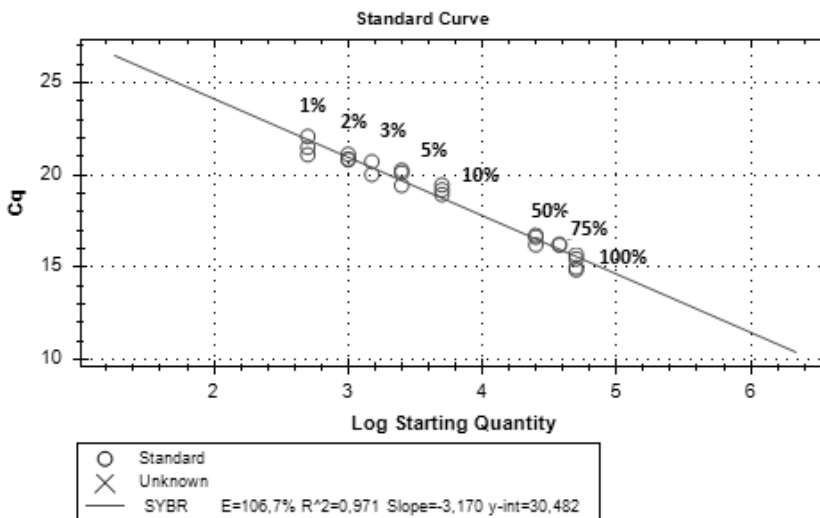
Gambar 11.23. Kurva amplifikasi (atas) dan *melt curve analysis* (bawah) seri pengenceran DNA bakso celeng 100% dengan primer CYTBWB2 [30].

Uji linearitas dilakukan dengan membuat kurva baku berdasarkan hasil amplifikasi seri pengenceran bakso celeng 100% dan bakso referensi celeng: sapi dengan berbagai komposisi. Kurva baku menggambarkan hubungan linearitas antara \log^{10} seri konsentrasi DNA celeng dengan nilai C_q (*quantification cycles*). Kurva baku dari hasil amplifikasi seri pengenceran bakso celeng 100% menggunakan 7 titik pada 50000, 10000, 2000, 400, 80, 16, dan 3,2 $\text{pg}/\mu\text{L}$ dengan 3 kali replikasi. Pembuatan kurva baku ini juga sekaligus menghitung nilai efisiensi proses amplifikasi PCR (Gambar 11.24).



[A]

[B]



Gambar 11.24. Kurva baku hasil amplifikasi seri pengenceran DNA bakso celeng 100% dengan primer CYTBWB2 [A] dan DNA bakso celeng:sapi dengan variasi komposisi [B]. Diambil dari [30].

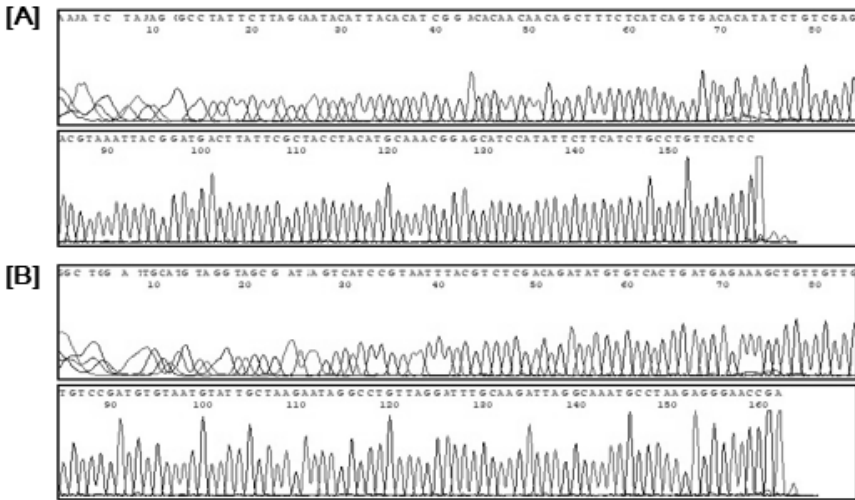
Kurva regresi linier pada Gambar 11.24. [A] menghasilkan nilai R² sebesar 0,992, *slope* = -3,212, dan y-intersep = 28,565 dan

menunjukkan linearitas yang baik. Nilai R^2 tersebut memenuhi kriteria pengujian kualitatif dan kuantitatif dari metode q-PCR yaitu 0,980. Nilai *slope* yang dihasilkan memenuhi persyaratan reaksi yang baik yaitu berada pada rentang -3,58 sampai -3,10. Sedangkan nilai efisiensi yang diperoleh yaitu 104,8% dan memenuhi syarat keberterimaan pada rentang 90-110%. Hasil uji linearitas yang dilakukan pada bakso celeng:sapi dengan berbagai komposisi juga memberikan hasil yang baik. Uji linearitas yang dilakukan pada DNA bakso celeng:sapi dengan komposisi 100, 75, 50, 10, 5, 3, 2, dan 1% menghasilkan kurva regresi linier dengan nilai R^2 0,971, *slope* = -3,170, dan *y-intersep* = 30,482 (Gambar 11.24.[B]). Nilai *slope* tersebut memenuhi syarat keberterimaan pada rentang -3,58 sampai -3,10. Nilai efisiensi yang diperoleh yaitu 106,7% juga memenuhi syarat keberterimaan pada rentang 90-110%. Nilai R^2 yang didapat hampir mendekati nilai minimal yang dipersyaratkan namun belum memenuhi kriteria pengujian kualitatif dan kuantitatif dari metode q-PCR yaitu $R^2 = 0,980$ [22].

Uji keterulangan (*repeatability*) yang dimaksudkan untuk mengukur keterulangan hasil amplifikasi dari DNA 100% daging celeng (konsentrasi DNA 50000 pg) serta bakso celeng 100% yang dibeli dari pedagang dengan menghitung nilai standar deviasi (SD) dan koefisien variasi (CV) rata-rata. Keterulangan menyatakan kedekatan hasil antara seri pengukuran yang diperoleh dari beberapa sampel yang homogen di bawah kondisi yang telah ditentukan dalam waktu yang singkat. Nilai CV rata-rata yang dihasilkan dari pengujian terhadap bakso referensi sebesar 8,7669 sedangkan dari bakso pasaran sebesar 9,3984. Nilai ini memenuhi persyaratan CV maksimal untuk ketepatan analisis q-PCR yang ditetapkan dalam *Codex Alimentarius Committee* (CAC 2010) yaitu maksimal 25% [31]. Dengan demikian metode ini cukup presisi dan tepat untuk analisis DNA celeng.

Untuk melihat produk amplifikasi DNA daging celeng dengan primer CYTBWB2 dilakukan sekuensing. Terdapat 3 metode yang dapat digunakan untuk memverifikasi kebenaran produk PCR, yaitu analisis restriksi menggunakan enzim restriksi endonuklease, hibridisasi *probe*, dan sekuensing DNA. Di antara ketiganya, sekuensing DNA menjadi pilihan utama karena memberikan hasil urutan basa yang dapat diandalkan. Namun, ia memiliki beberapa kelemahan seperti waktu pemrosesan yang lama, peralatan laboratorium yang mahal, dan kurang cocok untuk analisis rutin.

Tahap awal proses sekuensing adalah penentuan panjang amplicon, yang mana DNA celeng diamplicasi dengan primer CYTBWB2-wb menggunakan PCR konvensional kemudian hasilnya divisualisasikan menggunakan elektroforesis agarosa. Satu pita terbentuk paralel dengan marker pada kisaran 200 bp. Ini menunjukkan bahwa CYTBWB2-wb primer dapat memperkuat DNA celeng secara spesifik. Ukuran amplicon yang terbentuk juga sesuai dengan desain awal dimana amplicon *in-silico* diperkirakan 191 bp. Pita tunggal dan jelas menunjukkan bahwa kondisi PCR yang digunakan sudah cocok sehingga dapat dilanjutkan ke tahapan selanjutnya yaitu sekuensing. Setiap fragmen disekuensing sebanyak dua kali masing-masing menggunakan primer *forward* dan *reverse*, sehingga urutan DNA yang diperoleh lebih akurat karena pembacaan dilakukan dari arah depan dan belakang fragmen. Sekuensing urutan basa produk amplifikasi menggunakan primer *forward* menghasilkan amplicon sepanjang 159 bp, sedangkan primer *reverse* menghasilkan amplicon sepanjang 162 bp dalam urutan berikut (Gambar 11.25).



Gambar 11.25. Hasil sekuensing DNA celeng menggunakan primer (a) *forward* dan (b) *reverse* CYTBWB2 sebelum dilakukan *alignment*. Diambil dari [32].

Data yang didapat disejajarkan menggunakan perangkat lunak GeneStudio untuk mendapatkan data urutan ampikon lengkap. Sebelum analisis pensejajaran, salah satu urutan basa di atas harus dibalik dan dilengkapi oleh pasangan nukleotida yang sesuai sehingga dua urutan dasar berada di posisi yang sama. Pada dasarnya, urutan primer *forward* berada di posisi 5' → 3', sedangkan urutan primer *reverse* berkebalikan yaitu dari posisi 3' → 5', sebagaimana ditunjukkan dalam Gambar 11.26.

Contig Map of PCR Amplification Product



10 20 30 40 50

PRODUCT_ TCGGTTCCCT CTTAGGCATT TGCCTAATCT TGCAAAATCC
TAACAGGGCC

REV 2WB_ C...C...-

FWD 2WB_ -----A...-...-G....

60 70 80 90 100

PRODUCT_ TATTCTTAGC AATACATTAC ACATCGGACA CAACAACAGC TTTCTCATCA

REV 2WB_ -.....

FWD 2WB_ -.....

110 120 130 140 150

PRODUCT_ GTGACACATA TCTGTGCGAGA CGTAAATTAC GGATGACTTA
TTCGCTACCT

REV 2WB_ -.....

FWD 2WB_ T.....

160 170 180 190

PRODUCT_ ACATGCAAWC GSAGCATCCA TATTCTTCAT CTGCCTGTTC ATCC 186

REV 2WB_T. -C...-...-..... 169

FWD 2WB_A. GG...AT... 162

Gambar 11.26. Urutan basa dari fragmen Cyt-B mtDNA setelah dilakukan pensejajaran menggunakan software GeneStudio. Tanda titik (.) menunjukkan hasil yang identik dan tanda strip (-) menunjukkan basa yang tidak teridentifikasi. Diambil dari [32].

Urutan basa yang sama menunjukkan bahwa primer *forward* dan *reverse* mengamplifikasi area yang sama pada DNA target yang diisolasi dari daging celeng. Panjang amplicon yang terbentuk adalah 194 bp. Namun, hanya 186 basa yang dapat dibaca sementara yang lain (8 basa) tidak dapat dibaca selama proses sekuensing. Ini dapat

disebabkan oleh adanya ketidakcocokan (dNTP yang tidak kompatibel dengan DNA polimerase) yang dapat terjadi secara alami. Enzim DNA polimerase tidak memiliki aktivitas *proofreading exonuclease* 3' sampai 5' sehingga dapat menyebabkan kesalahan instalasi basa sekitar 1 dalam 9000 nukleotida. Jumlah ini sedikit berbeda dari hasil desain *in silico* di mana ukuran amplicon adalah 191 bp. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa primer *forward* dan *reverse* dapat menempel dengan sempurna ke DNA target. Seluruh basa primer dapat teridentifikasi menunjukkan bahwa proses *annealing* berjalan dengan baik sehingga DNA juga dapat teramplifikasi dengan baik.

Hasil urutan basa dari amplicon yang terbentuk dianalisis dengan BLAST menggunakan *software* yang disediakan oleh NCBI. Urutan basa yang diperoleh dibandingkan dengan urutan basa celeng dari GenBank yang telah disediakan pada *software* tersebut. Skor pensejajaran mendapat nilai tinggi (≥ 200). Berdasarkan hasil BLAST, dapat dinyatakan bahwa urutan 194 bp fragmen dari hasil amplifikasi telah memenuhi area yang sesuai dengan estimasi area amplifikasi. Jumlah skor total dan skor maksimum yang didapatkan sama yaitu sebesar 329 dengan *query cover* 100%, menunjukkan adanya kesesuaian tunggal. Sebagian besar primer menempel sempurna pada urutan DNA *template* dengan nilai kesesuaian yang tinggi (≥ 200) yang berarti bahwa dari akhir 5' hingga akhir 3' primer menempel pada urutan DNA *template*. Produk amplifikasi primer CYTBWB2-wb memiliki kemiripan yang sangat tinggi dengan beberapa spesies celeng yang hidup di Indonesia, yaitu 98% dengan gen Cyt-B mtDNA dari *Sus barbatus* yang hidup di Semenanjung Melayu, Sumatra, Kalimantan, dan Kepulauan Sulu, 98% dengan gen Cyt-B mtDNA dari *Sus verrucosus* yang endemik di pulau Jawa, Bawean, dan Madura, 94% dengan gen Cyt-B mtDNA dari *Sus scrofa* yang banyak ditemukan di Kalimantan Utara, 94% dengan Cyt-B gen mtDNA dari *Sus celebensis* endemik di Sulawesi. Selain itu, produk

amplifikasi juga memiliki kemiripan yang cukup tinggi dengan gen Cyt-B dari beberapa spesies celeng dari luar negeri seperti *Sus scrofa riukiuanus* dari Jepang, *Sus scrofa cristatus* dari Myanmar dan Thailand, dan *Sus cebifron* dari Filipina sebesar 93% (Tabel 11.7).

Tabel 11.7. Hasil *percent identities* dan *gaps* pada analisis BLAST nukleotida antara fragmen sitokrom-B mtDNA (194 bp) dengan gen celeng dari NCBI *genbank* [32].

Organisme	Sequence ID	Identities (%)	Gaps (%)
<i>Sus verrucosus</i>	GQ338963.1	98	1
<i>Sus barbatus</i>	AM492661.1	98	1
<i>Sus celebensis</i>	AY534298.1	94	1
<i>Sus scrofa</i>	EU531834.1	94	1
<i>Sus scrofa riukiuanus</i>	LC133269.1	93	1
<i>Sus cebifrons</i>	KF952600.1	93	1
<i>Sus scrofa cristatus</i>	MG725631.1	93	1

Kemiripan antara ampikon dengan gen Cyt-B mtDNA celeng sebesar 93-98% menunjukkan bahwa primer CYTBWB2-wb menempel secara spesifik pada gen target yaitu Cyt-B mtDNA. Hasil ini memiliki banyak keuntungan dalam penggunaan primer CYTBWB2-wb untuk analisis kontaminasi celeng. Kemiripan yang tinggi dengan banyak jenis celeng menyebabkan primer ini dapat digunakan untuk analisis celeng di banyak daerah baik di Indonesia maupun di luar negeri di mana setiap wilayah memiliki spesies celeng yang berbeda. Informasi ini sangat bermanfaat yang mana pada negara tersebut juga banyak terdapat komunitas Muslim yang juga membutuhkan autentikasi halal khususnya mengenai cemaran daging celeng.

Real-time PCR dengan menggunakan primer gen mitochondrial displacement Loop (D-Loop) 686 *cytochrome b* (cytb) digunakan untuk identifikasi daging babi dalam abon dan dendeng. Hasilnya menunjukkan bahwa metode *real-time* PCR dengan primer tersebut mampu mengidentifikasi secara spesifik keberadaan DNA babi dalam abon dan dendeng dengan batas deteksi 5 pg/ μ L DNA babi [33] [34]. Berbagai daging non-halal lainnya yang telah diidentifikasi

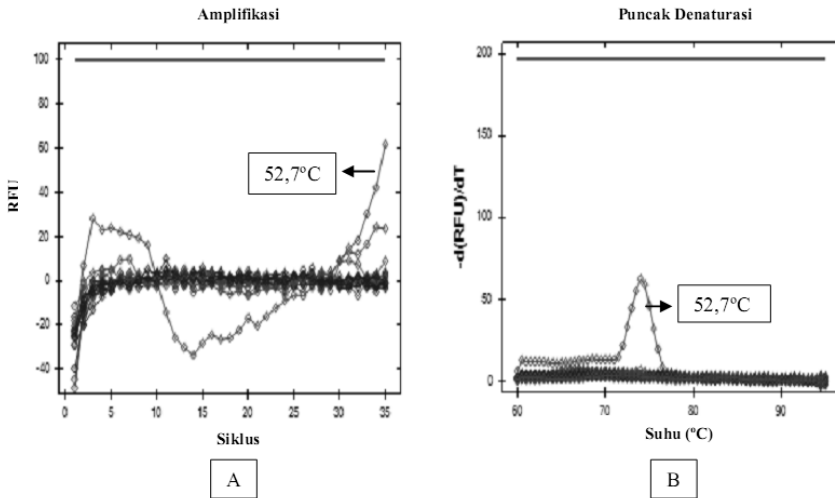
dengan metode PCR konvensional dan real-time PCR oleh kelompok peneliti Halal Universitas Gadjah Mada adalah daging anjing [35][36] [37], daging celeng [38] [39], dan daging daging tikus [2].

Selain untuk analisis daging non-halal, metode real-time PCR juga telah digunakan untuk analisis gelatin babi dalam cangkang kapsul. Primer yang digunakan sebagaimana dalam Tabel 11.8 [40]. Tabel 11.8. Primer yang dirancang untuk analisis DNA babi pada gelatin babi dengan target mitokondria D-loop [40].

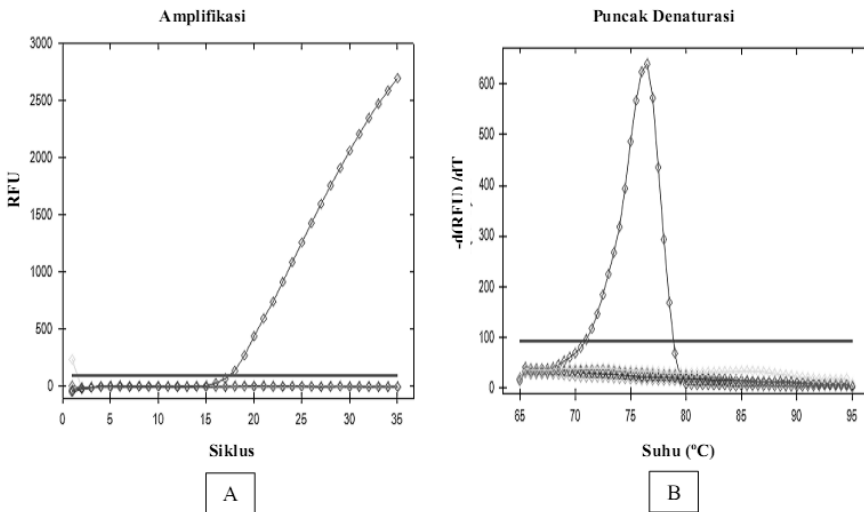
Target fragmen	Primer	Sekuen	Product Length
Mitokondria D-Loop	D-Loop 112	F: 5'-TGCAAACCAAAACGCCAAGT-3' R: 5'-TGCACGACGTACATAGGGT-3'	150
	D-Loop 108	F: 5'-CGTATGCAAACCAAAACGCCA-3' R: 5'-GCTTATATGCATGGGGACTAGC-3'	182

Dari dua kandidat primer dari daerah D-Loop mitokondria yang telah dirancang secara spesifik, hanya primer D-Loop 108 yang mampu mengidentifikasi adanya DNA babi pada jaringan segar (babi, sapi, ayam, kambing dan tikus) dan gelatin (babi, sapi dan ikan lele) dengan metode *real time* PCR pada suhu penempelan optimum 58,4°C. Primer D-Loop 108 tersebut secara spesifik mampu mengidentifikasi adanya DNA babi hingga konsentrasi 5 pg baik pada gelatin babi maupun cangkang kapsul berbahan campuran gelatin babi-sapi menggunakan *real time* PCR (Gambar 11.27).

Suhu *annealing* (58,4°C) yang diperoleh dari hasil optimasi digunakan untuk menguji spesifitas primer D-Loop 108 pada isolat DNA dari sumber gelatin maupun isolat DNA jaringan segar. Uji spesifitas primer terhadap isolat DNA babi, DNA sapi, DNA ayam, DNA kambing, dan DNA tikus ditunjukkan pada Gambar 11.28. DNA babi sudah mampu teramplifikasi pada Cq 17,46, sedangkan DNA sapi, DNA ayam, DNA tikus, dan DNA kambing sampai pada siklus ke 35 tidak menunjukkan adanya amplifikasi.

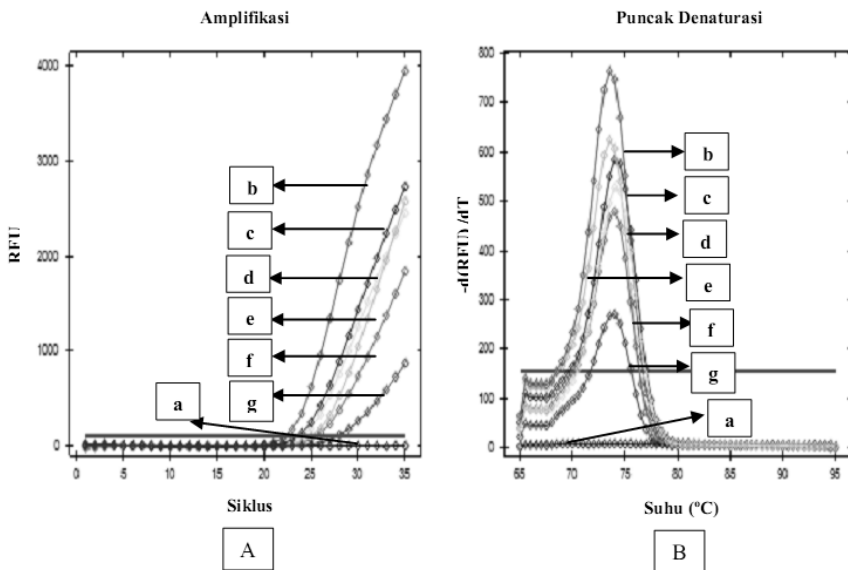


Gambar 11.27. Kurva amplifikasi (A) dan puncak denaturasi (B) dengan menggunakan primer D-Loop 112 pada berbagai suhu *annealing* 52,0; 52,7; 54,0; 55,9; 58,4; 60,3; 61,4; 62,0°C. Garis merah: respon dari isolat DNA babi, garis biru: respon dari isolat DNA sapi [40].



Gambar 11.28. Kurva amplifikasi (A) dan puncak denaturasi (B) spesifitas primer D-Loop 108 terhadap amplifikasi isolat DNA pada jaringan segar. Garis merah: babi, garis biru: sapi, garis kuning: ayam, garis merah muda: tikus, garis oranye: kambing [40].

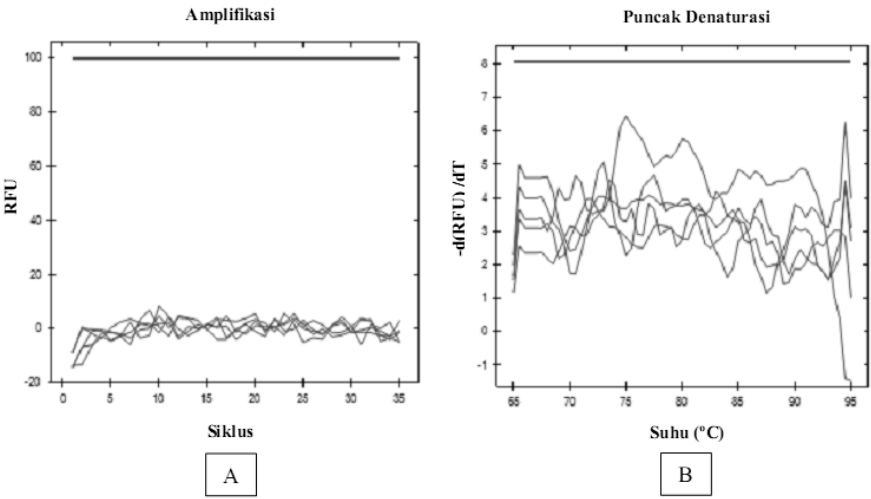
Hasil isolat DNA pada cangkang kapsul buatan dianalisis dengan primer D-Loop 108 yang spesifik pada suhu *annealing* 58,4°C. Hasil analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada menunjukkan tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi yang rendah. Hal ini dapat mempengaruhi kualitas dan jumlah amplifikasi DNA. Hasil amplifikasi isolat DNA pada cangkang kapsul buatan ditunjukkan oleh Gambar 11.29.



Gambar 11.29. Kurva amplifikasi (A) dan puncak denaturasi (B) spesifitas primer D-Loop 108 terhadap cangkang kapsul buatan. (a) sapi 100%, (b) babi 100%, (c) babi: sapi 50%, (d) babi: sapi 40%, (e) babi: sapi 30%, (f) babi: sapi 20%, (g) babi: sapi 10% [40].

Metode *real time* PCR kemudian diaplikasikan pada analisis cangkang kapsul yang beredar di pasaran yang meliputi cangkang kapsul kosong dari beberapa produsen maupun sediaan cangkang kapsul lunak bersertifikat halal. Isolat DNA kemudian diamplifikasi dengan menggunakan primer D-Loop 108 dengan suhu penempelan 58,4°C secara *real time* PCR. Hasil amplifikasi ditunjukkan oleh Gambar 11.30. Tidak ada amplifikasi yang terjadi pada cangkang

kapsul komersial. Hal ini menunjukkan bahwa 5 sampel cangkang kapsul komersial tersebut tidak mengandung DNA babi.



Gambar 11.30. Kurva amplifikasi (A) dan puncak denaturasi (B) cangkang kapsul komersial menggunakan primer D-Loop 108. Tidak ada isolat DNA yang teramplifikasi [40].

Saat ini telah tersedia suatu metode berbasis PCR yang deteksinya dengan model strip sehingga sesuai untuk analisis di lapangan (*point of care*). Yin et al. telah mengembangkan metode Pig-PCR-Strip (strip yang spesifik untuk DNA babi). Uji ini didasarkan pada amplifikasi PCR, hibridisasi produk PCR dengan probe diikuti dengan deteksi system strip. Dengan format ini, produk PCR dapat diamati secara langsung dengan mata dalam 3 menit. Metode ini dapat mendeteksi komponen-komponen babi dengan batas deteksi 0,01% daging babi dalam daging lainnya [41].

Tabel 11.8 meringkas aplikasi PCR konvensional dan real-time PCR dengan berbagai variasinya untuk analisis autentikasi halal.

Tabel 11.8. Berbagai penggunaan teknik PCR (baik PCR konvensional maupun *real-time* PCR) untuk analisis komponen non-halal.

Tujuan analisis	Teknik PCR	Primer yang digunakan (target gena)	Isolasi DNA	Batas deteksi	Pustaka
Analisis daging babi dalam berbagai produk berbasis daging	TaqMan [®] real-time PCR	D-loop F: AGCTGGACTTCATGGAACCTC D-loop-R: GCACGTTATGTCCTGTAAACC Probe: FAM-GATCCGGCACGACAAATCCAA-TAMRA	Dengan DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)	LoD sebesar 0,1 pg DNA yang bersesuaian dengan 0,1% (b/b) daging babi.	[42]
Analisis daging babi dan daging lainnya	Multiplex real-time PCR	D-loop F: AGCTGGACTTCATGGAACCTC D-loop-R: GCACGTTATGTCCTGTAAACC Probe: FAM-GATCCGGCACGACAAATCCAA-TAMRA	Dengan DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)	0,1 pg DNA yang bersesuaian dengan 0,5% (b/b) daging babi dengan campuran daging lain	[43]
Analisis daging babi dengan berbagai daging lainnya	Real-time PCR spesies-spesifik	Cyt F: ACGTAAATTACGGATGAGTATTTCGC Cyt R: GCTGTTGCTATAACGGTAAATAGTAGGAC Cyt Probe: FAM-GCCTATTTCACCGTAGG-MGB-NFQd	Dengan kits DNeasy Blood and Tissue Kit, Purification (Qiagen)	Daging babi dengan konsentrasi 0,01% dalam campuran daging lain dapat dideteksi	[44][45]
Analisis daging babi dalam sosis, roti dan biskuit	Spesifik-spesifik PCR	12SRNA; FW (5'—CCA CCT AGA GGA GCC TGT TCT ATA AT—3') 12SRNA; R (5'—GTT ACG ACT TGT CTC TTC GTG CA—3')	DNeasy [®] Tissue Kit and DNeasy [®] Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)	Tidak dilaporkan	[46]
Analisis daging babi dalam campuran yang lain	Evagreen real-time PCR	Prk-F: CTG CCC TGA GGA CAA ATA TCA TTC Prk-R: AAG CCC CCT CAG ATT CAT TCT ACG	Dengan menggunakan isopropanol	Metode valid (spesifik dan sensitive) dengan batas deteksi 0,01% daging babi dalam daging yang lain	[47][48]
Daging babi dalam berbagai campuran daging (sapi, ayam, kambing dan lainnya)	PCR spesifik-spesifik	Dirancang dari ClustalW software Sus-loopFWD: 5'-CACACCTATAACCGCTTGC-3' Sus-loopRVS: 5'-GATTGGCGTAAAAAATCTAGGG-3')	DNeasy [®] Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Konsentrasi DNA dianalisis dengan spektrofotometer UV	0,001 ng/ μ L DNA babi	[49]
Pamalsuan daging babi dalam daging	PCR spesifik-spesifik	Didesain dengan Primer-Select (Lasergene software; DNASStar, Inc.) Forward VPH-PF: 5'-AAT	Wizard [®] Genome DNA purification kit	1 pg	[50]

lainnya	dengan target D-loop	TTT TGG GGA TGC TTA GAC T-3' Reverse VPB-PR: 5'-TAT TTT GGG AGG TTA TTG TGT TGT A-3' CYTb1 (5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TCA AA-3') dan CYTb2 (5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3')	(Promega, Madison, USA). Qiagen DNeasy – Tissue Kits	Tidak dilaporkan	[51]
DNA dalam daging da lemak babi	PCR-RFLP	CYT b Fw: 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3' Cyt b Rev: 5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3'	Dengan metode fenol-kloroform-isoamil alkohol	Adanya kontaminasi daging babi 0,1% dapat dideteksi	[28]
DNA babi dalam sampel bakso	PCR-RFLP	CYTb1 (5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGAAA-3') CYTb2 (5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3')	Dengan High Pure PCR Template Kit (Roche, Germany)	Adanya kontaminasi daging babi 1% dapat dideteksi	[27]
Analisis DNA babi dalam sosis	PCR-RFLP	CYT b FW 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3', CYTb REV 5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3'.	Dengan High Pure PCR Template Kit (Roche, Germany)	Adanya kontaminasi daging babi 1% dapat dideteksi	[52]
DNA babi dalam sampel bakso	PCR-RFLP	CYT b1: 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3' CCT b2: 5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA Pork FW: 5'-AAC CCT ATG TAC GTC GTG CAT-3' Pork R: 5'-ACC ATT GAC TGA ATA GCA CCT-3' 12SL FW: 5'-AAA CTG GGA TTA GAT ACC CCA CTA-3' 12SH: 5'-GAG GGT GAC GGG CGG TGT GT-3'	Dengan kits pengeksrakasi (SureFood® Animal ID, Congen Biotechnology GmbH, German)	Tidak dilaporkan	[53]
Analisis daging babi dan daging celeng	PCR-southern hybridization pada chip dan PCR konvensional	Target sitokrom b: SimP-F: 5'-GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA-3' SimP-R: 5'-GCT GAT AGT AGA TTT GTG ATG ACC GTA-3' Target Cytochrome oxidase II: Pork 1:5'-GCC TAA ATC TCC CCT CAA TGG TA-3' Pork 2:5'-ATG AAA GAG GCA AAT AGA TTT TCG-3' Target ATP6: PPA6 F: 5'-CTA CCT ATT GTC ACC TTA GTT-3' PPA6 R: 5'-GAG ATT GTG CCG ITA TTA ATG-3'	QIAGEN DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, USA)	0,25 ng (cyt b), 0,1 ng (cytochrome oxidase II), dan 0,001 ng (Olipro™ Chip)	[54]

Analisis daging babi dalam berbagai produk, yakni sosis, barbeku, hamburger	Real-time PCR dengan SYBR Green	Cyt b F: 5'-AAACATTTGGAGTAGTCCT ACTATTTACC-3' Cyt b R: 5'-CTACGAGGCTGTT CCGATATAAGG-3' 18S rRNA F: 5'- TCTGCCCTCAACTTCGATGG-3' 18S rRNA R: 5'- TAATTTGGCGCCTGCTG-3'	1 x IQ™SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)	Adanya kontaminasi daging babi 0,1% dalam produk sosis, barbeku, hamburger dapat dideteksi.	[47]
Analisis daging babi segar dan dalam produk serta analisis daging yang telah dimasak	Real-time PCR dengan fluorofor FAM (6-karboksi-fluorescein) dan VIC	Berada dalam satu kits SureFood® Animal ID Pork SENS Plus V kit or SureFood® Animal ID Beef or SureFood® Animal ID (Chicken or SureFood® Animal ID Turkey)	Untuk daging dengan SureFood® Prep Animal kit dan daging yang dimasak dengan Sure Food® Prep Animal X kit, CONGEN	0,1% daging	[55]
Analisis gelatin babi dalam produk makanan	Real-time PCR, primer spesifik, fluorofor VIC dan FAM	Diekstraksi dengan Sure Food® Prep Animal X kit (CONGEN, R-Biopharm, Germany)	Primer terdapat dalam satu kesatuan dalam kits	1% gelatin babi	[56]
Analisis gelatin dalam cangkang kapsul	Real-time PCR, primer spesifik	FW: 5'-AATT TCC ATC CCA CAG CCC-3' RF: 5'-AAC AGA TGC TGA CTC ACA GAC-3' Probe: 5'-CCC AAC CCC CAA ACT GTC TCC T-3'	MasterPure™ DNA purification kit (EpiCentre, Madison, WI).	1 pg/mL	[57]
Analisis daging babi da nasal daging ternak	Real-time PCR multiplexs, dengan pewarna Evagreen	FW: 5' GCCTAAATCTCCCC TCAATGGTA 3' RV: 5' ATGAAAGAGGCAA ATAGATTTTCG 3'	Dengan kits Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel).	0,003 % daging babi	[58]
Analisis daging babi dalam sampel sosis daging kuda	PCR-dupleks	SIM 5'-GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA-3', PIG 5'-GCT GAT AGT AGA TTT GTG ATG ACC GTA-3' dan HOR 5'-CTC AGA TTC ACT CGA CGA GGG TAG TA-3'.	Tissue mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany).	Tidak dilaporkan	[59]
Analisis daging babi dengan daging lainnya	Real-time PCR tetrapleks	SUS 1 FW: 5'- CGA GAG GCT GCC GTA AAG G-3' SUS 1 RV: 5'- TGC AAG GAA CAC GGC TAA GTG-3' SUS 1 TMP: 5'- TCT GAC GTG ACT CCC CGA CCT GG-3'	Dengan kits Wizard Plus Miniprep DNA purification system (Promega, Madison, USA).	0,3% daging dapat dikuantifikasi, batas deteksi 0,1% daging.	[60]

Analisis pemalsuan daging babi dalam daging ternak lainnya	PCR spesifik- dupleks	Pork-F: 5'-ATG AAA CAT TGG AGT AGT CCT ACT ATT TAC C-3' Pork-R: 5'- CTA CGA GGT CTG TTC CGA TAT AAG G-3' (target pada sitokrom b)	Metode Wizard dengan menggunakan buffer TNE (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS), 100 µL larutan 5 M guanidine hydrochloride dan 40 µL larutan proteinase K (20 mg/ml).	0,25 ng DNA	[47]
Analisis daging babi dan daging sapi	Real-time PCR-Tripleks	Sus I-F_pork: 5'-CGAGAGGCTGCCGTAAGG-3' Sus I-R_pork: 5'-TGCAAGGAACACCGCTAAGTG-3' Sus I_TMP (HEX): 5'-TCTGACGTGACTCCCGACCTGG-3' (sebagai probe)	DNA extraction kit (Surefood Animal X Kit, Congen Biotechnology, Germany)	20 ekuivalen genom	[61]
Analisis daging babi dan daging-daging hewan lain yang dilarang dimakan oleh agama islam	Real-time PCR-multipleks	[Forward: (50-CCATCCCAATTA TAATATCCAACCTC-30) and reverse (50-TGATTATTTCTTGGCCCTGTGT GT-30)]; (Primer spesifik ini bertarget di gen mitokondra)	Yeastern Genomic DNA Mini Kit (Yeastern Biotech Co., Ltd., Taipei, Taiwan)	0,02 ng DNA babi	[62]
Analisis daging babi dalam campuran daging yang lain	PCR-TaqMan	12STAQMNFWM: 5'-AAAGGACTTGGCGGTGCTT-3'; 12STAQMANS: 5'-GTACGACTTGTCTCTTCGTG CA-3'; 12SPROBE: 50- TAGAGGAGCCTGTCTTATAATC GATAAACCCCG-30 (sebagai probe)	Wizard_ DNA Cleanup system (Promega, Madison, WI, USA),	0,01 ng DNA yang disesuaikan dengan daging 0,1%	[63]
Analisis daging babi dalam bakso	PCR-TaqMan	Sweyrb F=TCC TGC CCT GAG GAC AAA TA dan SweyrbR=AAG CCC CCT CAG ATT CAT TC) TaqMan probe (SweyrbTqM=6-FAM/AGC TAC GGT/ZEN/CAT CAC AAA TCT ACT ATC AGC T/3IABkFQ) (sebagai probe)	MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicenter Biotechnologies, Madison, USA). Annealing suhu 61°C	0,01% (b/b) Daging babi dengan nilai cycle threshold Ct < 30	[64]

Referensi

- [1] Y. Erwanto, A. Rohman, L. Arsyanti, and Y. Pranoto, "Identification of pig DNA in food products using polymerase chain reaction (PCR) for halal authentication-a review," *Int. Food Res. J.*, vol. 25, no. 4, 2018.
- [2] Y. I. Widyasari, Sudjadi, and A. Rohman, "Detection of rat meat adulteration in meat ball formulations employing real time PCR," *Asian J. Anim. Sci.*, vol. 9, no. 6, pp. 460–465, 2015, doi: 10.3923/ajas.2015.460.465.
- [3] P. Markoulatos, N. Siafakas, and M. Moncany, "Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach," *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 16, no. 1, pp. 47–51, 2002, doi: 10.1002/jcla.2058.
- [4] M. A. A. Valones, R. L. Guimarães, L. A. C. Brandão, P. R. E. De Souza, A. De Albuquerque Tavares Carvalho, and S. Crovela, "Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–11, 2009, doi: 10.1590/S1517-83822009000100001.
- [5] M. Baptista, J. T. Cunha, and L. Domingues, "DNA-based approaches for dairy products authentication: A review and perspectives," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 109, no. October 2020, pp. 386–397, 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.01.043.
- [6] H. I. Abdullah Amqizal, H. A. Al-Kahtani, E. A. Ismail, K. Hayat, and I. Jaswir, "Identification and verification of porcine DNA in commercial gelatin and gelatin containing processed foods," *Food Control*, vol. 78, pp. 297–303, 2017, doi: 10.1016/j.foodcont.2017.02.024.
- [7] I. M. Artika, Y. P. Dewi, I. M. Nainggolan, J. E. Siregar, and U. Antonjaya, "Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis," *Genes (Basel)*, vol. 13, no. 12, 2022, doi: 10.3390/genes13122387.
- [8] M. Yu, Y. Cao, and Y. Ji, "The principle and application of new PCR Technologies," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 100, no. 1, 2017, doi: 10.1088/1755-1315/100/1/012065.
- [9] M. T. Rahman, M. S. Uddin, R. Sultana, A. Moue, and M. Setu, "Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review," *Anwer Khan Mod. Med. Coll. J.*, vol. 4, no. 1, pp. 30–36,

2013, doi: 10.3329/akmmcj.v4i1.13682.

- [10] K. Böhme, P. Calo-Mata, J. Barros-Velázquez, and I. Ortea, "Review of Recent DNA-Based Methods for Main Food-Authentication Topics," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 67, no. 14, pp. 3854–3864, 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.8b07016.
- [11] M. Kubista *et al.*, "The real-time polymerase chain reaction," *Mol. Aspects Med.*, vol. 27, no. 2–3, pp. 95–125, 2006, doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
- [12] Bernard R. Glick, J. J. Pasternak, and C. L. Patten, *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, Fourth Edi. Washington, DC: ASM Press, 2010.
- [13] M. Sharma, "Basic Concepts of Primer Designing: a Mini Review," *Int. J. Latest Trends Eng. Technol.*, vol. 17, no. 4, pp. 10–12, 2021, doi: 10.21172/1.174.03.
- [14] D. Beyene, "Review Paper The State of Knowledge in Designing Primer of interest for successful Polymerase Chain Reaction : A review," vol. 2, no. 001, pp. 1–12, 2014.
- [15] A. Apte and S. Daniel, "PCR primer design," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 4, no. 3, pp. 9–11, 2009, doi: 10.1101/pdb.ip65.
- [16] E. Navarro, G. Serrano-Heras, M. J. Castaño, and J. Solera, "Real-time PCR detection chemistry," *Clin. Chim. Acta*, vol. 439, pp. 231–250, 2015, doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017.
- [17] I. Martín *et al.*, "SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs," *Meat Sci.*, vol. 82, no. 2, pp. 252–259, 2009, doi: 10.1016/j.meatsci.2009.01.023.
- [18] P. T. Monis, S. Giglio, and C. P. Saint, "Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis," *Anal. Biochem.*, vol. 340, no. 1, pp. 24–34, 2005, doi: 10.1016/j.ab.2005.01.046.
- [19] T. Ferreira, A. Farah, T. C. Oliveira, I. S. Lima, F. Vitório, and E. M. M. Oliveira, "Using Real-Time PCR as a tool for monitoring the authenticity of commercial coffees," *Food Chem.*, vol. 199, pp. 433–438, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.045.
- [20] D. Pratiwi *et al.*, "Identification of pig DNA in food products using polymerase chain reaction (PCR) for halal

- authentication-a review,” *Int. Food Res. J.*, vol. 25, no. 4, pp. 1515–1519, 2018.
- [21] Z. Suadi, L. M. Bilung, K. Apun, and A. A. Azmi, “Efficiency of traditional DNA extraction method in PCR detection of porcine DNA in meat mixtures,” *J. Teknol.*, vol. 82, no. 5, pp. 85–90, 2020, doi: 10.11113/jt.v82.14636.
- [22] BioRad, “Real-Time PCR Applications Guide,” *Methods*, pp. 2–4, 2006.
- [23] K. S. I. Kurniasih, N. Hikmah, Y. Erwanto, and A. Rohman, “Qualitative and quantitative analysis of canine (*canis lupus familiaris*) meat in meatballs for halal authentication study using real-time polymerase chain reaction,” *Int. J. Agric. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 103–108, 2020, doi: 10.17957/IJAB/15.1264.
- [24] M. Di Domenico, M. Di Giuseppe, J. D. Wicochea Rodriguez, and C. Cammà, “Validation of a fast real-time PCR method to detect fraud and mislabeling in milk and dairy products,” *J. Dairy Sci.*, vol. 100, no. 1, pp. 106–112, 2017, doi: 10.3168/jds.2016-11695.
- [25] T. F. Scientific, “Realtime PCR handbook,” *Realt. PCR Handb.*, pp. 1–68, 2015, [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019861-Update-qPCR-Handbook-branding-Americas-FLR.pdf%0Ahttp://www.nature.com/doi/10.1038/tp.2014.12%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=405504>.
- [26] S. Orbayinah, H. Widada, A. Hermawan, S. Sudjadi, and A. Rohman, “Application of real-time polymerase chain reaction using species specific primer targeting on mitochondrial cytochrome-b gene for analysis of pork in meatball products,” *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 260–265, 2019, doi: 10.5455/javar.2019.f342.
- [27] Y. Erwanto, M. Z. Abidin, A. Rohman, and S. Sismindari, “PCR-RFLP Using BseDI Enzyme for Pork Authentication in Sausage and Nugget Products,” *Media Peternak.*, vol. 34, no. 1, pp. 14–18, 2011, doi: 10.5398/medpet.2011.34.1.14.
- [28] Y. Erwanto, M. Z. Abidin, E. Yasin, P. Muslim, and A. Rohman, “Identification of Pork Contamination in Meatballs of Indonesia Local Market Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Analysis,” *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, vol. 27, no. 10, pp.

1487–1492, 2014, doi: [org/10.5713/ajas.2014.14014](https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14014).

- [29] F. Guan, Y. T. Jin, J. Zhao, A. C. Xu, and Y. Y. Luo, “A PCR Method That Can Be Further Developed into PCR-RFLP Assay for Eight Animal Species Identification,” *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2018, 2018, doi: [10.1155/2018/5890140](https://doi.org/10.1155/2018/5890140).
- [30] G. Q. Aina, Y. Erwanto, M. Hossain, M. R. Johan, M. E. Ali, and A. Rohman, “The employment of q-PCR using specific primer targeting on mitochondrial cytochrome-b gene for identification of wild boar meat in meatball samples,” *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 300–307, 2019, doi: [10.5455/javar.2019.f348](https://doi.org/10.5455/javar.2019.f348).
- [31] “CAC/GL 74-2010 Page 1 of 22,” pp. 1–22, 2010, doi: [10.1080/07924259.2001.9652500](https://doi.org/10.1080/07924259.2001.9652500).
- [32] G. Q. Aina, A. Rohman, and Y. Erwanto, “Wild boar-specific PCR assay and sequence analysis based on mitochondrial cytochrome-B gene for Halal authentication studies,” *Indones. J. Chem.*, vol. 20, no. 2, pp. 483–492, 2020, doi: [10.22146/ijc.42552](https://doi.org/10.22146/ijc.42552).
- [33] S. Maryam, S. Sismindari, T. J. Raharjo, Sudjadi, and A. Rohman, “Determination of Porcine Contamination in Laboratory Prepared dendeng Using Mitochondrial D-Loop686 and cyt b Gene Primers by Real Time Polymerase Chain Reaction,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 19, no. 1, 2016, doi: [10.1080/10942912.2015.1020434](https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1020434).
- [34] Rahmawati, Sismindari, T. J. Raharjo, Sudjadi, and A. Rohman, “Analysis of pork contamination in Abon using mitochondrial D-Loop22 primers using real time polymerase chain reaction method,” *Int. Food Res. J.*, vol. 23, no. 1, 2016.
- [35] A. Rohman *et al.*, “Real-time polymerase chain reaction for identification of dog meat in adulterated beef meatball using specific primer targeting on cytochrome-b for halal authentication,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 23, no. 1, pp. 2231–2241, 2020, doi: [10.1080/10942912.2020.1844748](https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1844748).
- [36] H. Y. Manalu, Sismindari, and A. Rohman, “The use of primer-specific targeting on mitochondrial cytochrome b combined with real-time polymerase chain reaction for the analysis of dog meat in meatballs,” *Trop. Life Sci. Res.*, vol. 30, no. 3, 2019, doi: [10.21315/tlsr2019.30.3.1](https://doi.org/10.21315/tlsr2019.30.3.1).
- [37] A. Rohman, W. S. Rahayu, S. Sudjadi, and S. Martono, “The Use of Real-Time Polymerase Chain Reaction Combined with

- Specific-Species Primer for Analysis of Dog Meat DNA in Meatball,” *Indones. J. Chem.*, vol. 21, no. 1, pp. 225–233, 2021, doi: 10.22146/ijc.48930.
- [38] S. Orbayinah, A. Hermawan, Sismindari, and A. Rohman, “Detection of pork in meatballs using probe taqman real-time polymerase chain reaction,” *Food Res.*, vol. 4, no. 5, pp. 1563–1568, 2020, doi: 10.26656/fr.2017.4(5).227.
- [39] A. Guntarti, S. Martono, A. Yuswanto, and A. Rohman, “Analysis of beef meatball adulteration with wild boar meat using real-time polymerase chain reaction,” *Int. Food Res. J.*, vol. 24, no. 6, 2017.
- [40] Sudjadi, H. S. Wardani, T. Sepminarti, and A. Rohman, “Analysis of Porcine Gelatin DNA in a Commercial Capsule Shell Using Real-Time Polymerase Chain Reaction for Halal Authentication,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 19, no. 9, pp. 2127–2134, 2016, doi: 10.1080/10942912.2015.1110164.
- [41] R. Yin, Y. Sun, K. Wang, N. Feng, H. Zhang, and M. Xiao, “Development of a PCR-based lateral flow strip assay for the simple, rapid, and accurate detection of pork in meat and meat products,” *Food Chem.*, vol. 318, no. August 2019, p. 126541, 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126541.
- [42] M. Kim, I. Yoo, S. Y. Lee, Y. Hong, and H. Y. Kim, “Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan® real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region,” *Food Chem.*, vol. 210, pp. 102–106, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.084.
- [43] M. J. Kim and H. Y. Kim, “A fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of pork, chicken, and beef in commercial processed meat products,” *Lwt*, vol. 114, no. June, p. 108390, 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108390.
- [44] C. Cammà, M. Di Domenico, and F. Monaco, “Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures,” *Food Control*, vol. 23, no. 2, pp. 400–404, 2012, doi: 10.1016/j.foodcont.2011.08.007.
- [45] Perestam, K. K. Fujisaki, O. Nava, and R. S. Hellberg, “Comparison of real-time PCR and ELISA-based methods for the detection of beef and pork in processed meat products,” *Food Control*, vol. 71, pp. 346–352, 2017, doi: 10.1016/j.foodcont.2016.07.017.
- [46] A. A. Aida, Y. B. C. Man, A. R. Raha, and R. Son, “Detection of pig derivatives in food products for halal authentication by

polymerase chain reaction –restriction fragment length polymorphism,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 87, no. 4, pp. 569–572, Mar. 2007, doi: 10.1002/JSFA.2699.

- [47] S. Soares, J. S. Amaral, M. B. P. P. Oliveira, and I. Mafra, “A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products,” *Meat Sci.*, vol. 94, no. 1, pp. 115–120, 2013, doi: 10.1016/j.meatsci.2012.12.012.
- [48] J. S. Amaral, G. Santos, M. B. P. P. Oliveira, and I. Mafra, “Quantitative detection of pork meat by EvaGreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products,” *Food Control*, vol. 72, pp. 53–61, 2017, doi: 10.1016/j.foodcont.2016.07.029.
- [49] M. E. Ali *et al.*, “Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction,” *Meat Sci.*, vol. 91, no. 4, pp. 454–459, 2012, doi: 10.1016/j.meatsci.2012.02.031.
- [50] N. S. Karabasanavar, S. P. Singh, D. Kumar, and S. N. Shebannavar, “Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop,” *Food Chem.*, vol. 145, pp. 530–534, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.084.
- [51] A. A. Aida, Y. B. C. Man, C. M. V. L. Wong, A. R. Raha, and R. Son, “Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication,” *Meat Sci.*, vol. 69, no. 1, pp. 47–52, 2005, doi: 10.1016/j.meatsci.2004.06.020.
- [52] Y. Erwanto, M. Z. Abidin, X. Sismindari, and A. Rohman, “Pig species identification in meatballs using polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism for Halal authentication,” *Int. Food Res. J.*, vol. 19, no. 3, 2012.
- [53] S. A. Mutalib *et al.*, “Comparison between pork and wild boar meat (*Sus scrofa*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP),” *Sains Malaysiana*, vol. 41, no. 2, pp. 199–204, 2012, doi: 10.1146/annurev.pa.15.040175.000303.
- [54] S. A. Mutalib *et al.*, “Sensitivity of polymerase chain reaction (PCR)-southern hybridization and conventional PCR analysis for Halal authentication of gelatin capsules,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 63, no. 1, pp. 714–719, 2015, doi: 10.1016/j.lwt.2015.03.006.

- [55] P. Ulca, H. Balta, I. Çağın, and H. Z. Senyuva, "Meat species identification and halal authentication using pcr analysis of raw and cooked traditional turkish foods," *Meat Sci.*, vol. 94, no. 3, pp. 280–284, 2013, doi: 10.1016/j.meatsci.2013.03.008.
- [56] Y. Demirhan, P. Ulca, and H. Z. Senyuva, "Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products-Halal/Kosher authentication," *Meat Sci.*, vol. 90, no. 3, pp. 686–689, 2012, doi: 10.1016/j.meatsci.2011.10.014.
- [57] H. Cai, X. Gu, M. S. Scanlan, D. H. Ramatlapeng, and C. R. Lively, "Real-time PCR assays for detection and quantitation of porcine and bovine DNA in gelatin mixtures and gelatin capsules," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 25, no. 1, pp. 83–87, 2012, doi: 10.1016/j.jfca.2011.06.008.
- [58] M. Safdar and M. F. Abasiyanik, "Simultaneous identification of pork and poultry origins in pet foods by a quick multiplex real-time PCR assay using evagreen florescence dye," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 171, no. 7, pp. 1855–1864, 2013, doi: 10.1007/s12010-013-0485-7.
- [59] A. Di Pinto *et al.*, "DNA-based approach for species identification of goat-milk products," *Food Chem.*, vol. 229, pp. 93–97, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.067.
- [60] R. Köppel, J. Ruf, F. Zimmerli, and A. Breitenmoser, "Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 227, no. 4, pp. 1199–1203, 2008, doi: 10.1007/s00217-008-0837-7.
- [61] A. Iwobi *et al.*, "A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat," *Food Chem.*, vol. 169, pp. 305–313, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.139.
- [62] M. E. Ali *et al.*, "Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods," *Food Chem.*, vol. 177, pp. 214–224, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.098.
- [63] H. He *et al.*, "Application of Quadruple Multiplex PCR Detection for Beef, Duck, Mutton and Pork in Mixed Meat," *J. Food Nutr. Res.*, vol. 3, no. 6, pp. 392–398, 2015, doi: 10.12691/jfnr-3-6-6.
- [64] M. E. Ali, U. Hashim, M. Kashif, S. Mustafa, Y. B. Che Man, and S. B. Abd Hamid, "Development of swine-specific DNA

markers for biosensor-based halal authentication,” *Genet. Mol. Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 1762–1772, 2012, doi: 10.4238/2012.June.29.9.

Biografi



Dr. Lily Arsanti Lestari, STP., MP., menyelesaikan S-1 dari Program Studi Teknologi Hasil Pertanian dan S-2 di Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, UGM pada tahun 1999 dan 2003. Sementara S-3 diselesaikan di Program Studi Ilmu Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran UGM pada tahun 2014. Penulis merupakan staf pengajar pada Departemen Gizi Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan, UGM sejak tahun 2004. Saat ini, Lily Arsanti Lestari menjabat sebagai Sekretaris Pusat Unggulan Iptek Perguruan Tinggi *Institute for Halal Industry & System* serta Sekretaris Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM.

Fokus penelitiannya adalah pangan fungsional, keamanan pangan termasuk kehalalan produk pangan. Beberapa hibah dana penelitian telah diperoleh dari Kemdikbud Ristek Dikti dan sponsor industri seperti Danone dan Nestle. Hasil penelitian telah dipublikasikan di jurnal terindeks Scopus, sampai saat ini sebanyak 26 artikel, dengan *h-index* di Scopus = 7.



Prof. Ir. Yuny Erwanto, S.Pt., MP., PhD, IPM., menyelesaikan S-1 tahun 1995 dan S-2 tahun 1998 pada Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada dengan fokus penelitian pada pengolahan daging dan keamanan olahan daging. Pada tahun 1999 mendapat kesempatan studi lanjut di Jepang yang diawali dengan belajar bahasa Jepang selama 6 bulan dan sebagai *research student* selama 6 bulan, pada tahun 2000 resmi diterima sebagai mahasiswa United Graduated School Kagoshima University Jepang, dan program doktornya diselesaikan pada tahun 2003 kurang dari 3 tahun. Pada tahun 2005 sampai 2006 sebagai *post doctoral fellowship* di Seoul National University Korea dan banyak melakukan riset di bidang keamanan daging khususnya kontaminasi jaringan syaraf pusat yang dihubungkan dengan penyakit sapi gila pada daging yang beredar di pasaran Korea Selatan. Sejak tahun 2007 sudah mulai melakukan penelitian yang terkait dengan pemalsuan daging dan

produk daging dengan berbagai metode dan lebih khusus pada metode yang mendasarkan pada teknologi DNA. Pada tahun 2018-2019 yang bersangkutan adalah Ketua Institute for Halal Industry & System, sebuah Pusat Unggulan Iptek di Universitas Gadjah Mada. Pernah menjadi Sekretaris Prodi Doktor Agama dan Lintas Budaya di Sekolah Pascasarjana UGM pada tahun 2018-2020 yang sekarang menjadi prodi Perekonomian Islam dan Industri Halal. Pada Fakultas Peternakan UGM yang bersangkutan saat ini menjabat sebagai Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian dan Kerjasama. Yuny Erwanto juga aktif dalam membina masyarakat peternak khususnya peternakan ayam kampung di berbagai kelompok ternak di Yogyakarta dan sekitarnya. *Super Farm* adalah payung usaha bersama dalam bentuk *social entrepreneurship* bersama masyarakat yang telah mendekatkan antara *end user* rumah makan, dan konsumen lain dengan peternak. Sampai saat ini sudah mempublikasikan lebih dari 70 karya ilmiah pada berbagai media ilmiah nasional dan internasional. Sejumlah lebih dari 60 judul *paper* telah dipublikasikan pada jurnal yang terindex scopus dan mempunyai H Index 13.



Prof. Dr. Abdul Rohman, M.Si., Apt., menyelesaikan program S-1, Apoteker dan S-2 di Fakultas Farmasi UGM pada tahun 2002, 2003 dan 2006. Sementara S-3 diselesaikan di Institut Penyelidikan Produk Halal, Universiti Putra Malaysia, Malaysia dalam bidang *Halal Food Analysis* pada tahun 2011. Saat ini, Abdul Rohman menjabat sebagai Ketua Senat Fakultas Farmasi UGM.

Fokus penelitiannya adalah analisis kehalalan produk dan penjaminan kualitas sediaan Farmasi. Beberapa penelitiannya telah dipublikasikan di jurnal terindeks Scopus, sampai saat ini sebanyak 315 artikel, dengan *h-index* di Scopus = 31. Saat ini, Abdul Rohman tercatat sebagai *Editor in Chief* di *Indonesian Journal of Pharmacy* (jurnal terindeks Scopus Q3).

Beberapa penghargaan yang diperoleh adalah *Young Scientist Scopus Award* 2014 dan penerima Anugerah Kekayaan Intelektual Luar Biasa dalam Bidang Publikasi Internasional dari Kemenristek Dikti tahun 2014.