

VALIDASI METODE AUTENTIKASI PRODUK PANGAN HEWANI DALAM PRODUK OLAHAN SOSIS (SAPI, BABI DAN KAMBING) MELALUI PENDEKATAN ANALISIS DENSITOMETRI

Sandra Hermanto^{1*}, Tarso Rudiana¹, Muhammad Ihda Hamlu Liwaissunati Zein¹

¹Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah Jakarta

Jalan Ir. H. Juanda No 95, Ciputat Tangerang Selatan Banten - 15412, Indonesia

*Corresponding author: hermatokimia@uinjkt.ac.id

ABSTRAK

Upaya pengujian kehalalan produk pangan hewani perlu dilakukan terutama untuk produk pangan yang kritis seperti produk olahan daging (sosis, nugget, maupun kornet). Beberapa produk olahan daging masih ditemukan cemaran babi dalam proses pengolahannya. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan validitas metode analisis cemaran babi pada produk olahan daging (sosis sapi, babi, dan kambing) berdasarkan karakteristik profil protein jaringan otot yang dihasilkan dari masing-masing sampel. Sampel yang digunakan yaitu sosis daging sapi, babi, dan kambing yang dibeli dari supermarket di wilayah Jakarta dan Tangerang Selatan. Preparasi sampel diawali dengan ekstraksi protein jaringan otot dengan penambahan buffer PBS pH 7,2. Selanjutnya dilakukan uji kadar protein terlarut dan hidrolisis enzimatis dengan tripsin 1% (w/v) pada pH 8 selama 30, 60 menit dan 90 menit pada suhu 37 °C. Hidrolisat protein dipisahkan dengan SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) dan dianalisis profil proteinnya dengan analisis densitometri (*Image J*). Validasi metode analisis meliputi uji *presisi* (keterulangan), uji akurasi, *linearitas*, serta uji kekuatan metode dengan memvariasikan pH ekstraksi. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak protein memiliki perbedaan kadar dan komposisi protein pada masing-masing sampel. Hasil hidrolisis tripsin diperoleh kandidat protein biomarker yang muncul di bawah 50 kDa yang kemungkinan merupakan fraksi protein aktin. Hasil validasi metode menunjukkan tingkat presisi analisis dan akurasi yang telah memenuhi standar yang dipersyaratkan, yakni dengan nilai KV < 5% dan nilai persen recovery > 95%. Hasil uji linearitas dan uji ketangguhan metode juga menunjukkan metode uji sudah cukup efektif dalam menguji kehalalan produk pangan hewani khususnya pada produk sosis yang terkontaminasi oleh daging babi.

Kata kunci: analisis densitometri, hidrolisat protein, sosis, tripsin, validasi metode.

ABSTRACT

Efforts to the halalness test of animal food products need to be carried out, especially for critical food products such as processed meat products (sausages, nuggets, and corned beef). Some of the processed products are still found to be contaminated by pork in their processing. This research was conducted to determine the validity of the analysis method of pork contamination in processed meat products based on the comparison of the muscle tissue protein profile produced from each sample. The samples used were beef, pork, and goat sausages purchased from supermarkets in Jakarta and South Tangerang. Sample preparation was preceded by extraction of muscle tissue protein with the addition of PBS buffer pH 7.2. Furthermore, the dissolved protein content test and enzymatic hydrolysis were carried out with trypsin 1% (w/v) at pH 8 for 30, 60 minutes and 90 minutes at 37 °C. Protein hydrolyzate was measured by SDS-PAGE (polyacrylamide sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis) and the protein profile was analyzed by densitometric analysis (Figure J). The validation of the analytical method includes the test of precision

(repeatability), test for accuracy, linearity, and test the strength of the method by varying the extraction pH. The results showed that the protein extract had protein content and composition in each sample. The results of trypsin hydrolysis obtained biomarker protein candidates that appear below 50 kDa which is probably the protein fraction of actin. The results of the method validation show that the level of analysis precision and accuracy has met the required standards, namely with a KV value <5% and a percent recovery value > 95%. The results of the linearity test and the toughness of the method also showed that the test method was quite effective in testing the halalness of animal food products, especially on sausage products contaminated by pork.

Keywords: densitometric analysis, protein hydrolyzate, sausage, trypsin, validation method.

1. Pendahuluan

Kebutuhan akan produk halal telah menjadi isu penting di Indonesia. Indonesia merupakan negara dengan mayoritas penduduk muslim, yakni sebesar 87,18 persen dari total populasi penduduknya beragama Islam (BPS, 2010). Masalah penyediaan pangan halal merupakan hal yang sangat esensial bagi masyarakat Indonesia yang mayoritas muslim. Salah satu produk pangan yang diragukan kehalalannya adalah produk-produk pangan yang berasal dari sumber hewani. Berdasarkan keharamannya terdapat tiga kelompok bahan pangan hewani segar yang haram yaitu bagian yang dapat dimakan (khususnya daging dan lemak) yang berasal dari babi, bangkai, dan hewan yang tidak disembelih menurut syariat Islam. Ketiga kelompok ini, khususnya bangkai dan hewan yang tidak disembelih menurut syariat Islam akan sulit sekali bagi orang awam mengenalinya, apalagi jika bercampur dengan daging yang halal.

Sosis merupakan salah satu contoh produk pangan hewani yang banyak digemari oleh masyarakat Indonesia, terutama kalangan generasi muda. Makanan ini umumnya berbahan dasar daging sapi, ayam, atau babi. Adanya kasus pencampuran atau pemalsuan daging babi terhadap produk olahan daging sapi masih sering terjadi di tengah masyarakat. Hal ini dimungkinkan karena harga daging babi relatif lebih murah dari daging sapi. Disamping itu juga lemahnya pengawasan dari lembaga terkait seperti Badan POM masih memungkinkan pelaku usaha melakukan hal-hal yang tidak diinginkan dengan berlaku tidak jujur. Sebagai contoh, penelitian di Yogyakarta telah menemukan bakso bercampur daging babi (Yuningsih, 2010). Hal yang sama juga terjadi di kota Salatiga yang mana dari 10 sampel kornet sapi yang dianalisis terdapat 1 sampel yang positif mengandung daging babi (Suparman, 2013). Pengoplosan daging sapi oleh daging babi juga bisa terjadi dalam pengolahan produk pangan lainnya dengan alasan biaya produksi yang lebih ekonomis. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan analisis cemaran daging babi pada produk olahan daging seperti sosis sapi dan sosis kambing.

Salah satu cara untuk menganalisis kehalalan produk pangan hewani terutama untuk produk pangan yang telah mengalami pencampuran adalah melalui pendekatan genomik, misalnya dengan bantuan PCR (*polimerisasi chain reaction*). Metode PCR biasanya dilakukan menggunakan primer spesifik yang bisa membedakan keberadaan derivat daging babi dengan daging sapi atau daging hewan lainnya (Rahmawati, et al., 2016) (Rohman, et al. 2017). Prinsip dasar identifikasi molekul daging pada tingkat DNA adalah amplifikasi urutan tertentu untuk genom hewan yang sesuai. Saat ini, kit modern untuk identifikasi DNA daging telah banyak tersedia, tetapi dengan harga yang relative mahal. Amplifikasi DNA daging dapat dilakukan dengan menggunakan primer yang spesifik misalnya pada bagian gen RYR1 yang umumnya ada di mamalia (Popovski *et al.* 2002).

Metode pengujian kehalalan produk hewani selain menggunakan metode PCR adalah melalui pendekatan proteomik, dimana cara ini dilakukan dengan membandingkan komposisi protein pada masing-masing sampel, baik sampel yang murni maupun yang telah mengalami pencampuran. Penelitian yang telah dilakukan oleh Susanto *et al.*, (2005) menyebutkan bahwa identifikasi pencampuran daging sapi dan daging babi dapat dilakukan dengan mengidentifikasi karakteristik fraksi protein pada masing-masing sampel baik dalam keadaan segar maupun setelah perebusan serta karakteristik fraksi protein pada beberapa tingkat pencampuran daging babi ke dalam sampel. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada daging babi segar terdapat protein tak diketahui dengan berat molekul 112,13 KDa yang tidak terdapat pada sampel daging sapi segar. Pemanasan pada suhu 90°C selama 15 menit menyebabkan penurunan pada ketebalan

pita-pita protein pada masing-masing sampel. Perbedaan spesifik pada sampel daging sapi adalah adanya protein troponin T yang terdapat dalam jumlah banyak, sedangkan pada tingkat pencampuran daging babi pada bakso sapi 25 persen, 50 persen, dan 100 persen protein tersebut terdeteksi sedikit.

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Susanti, (2019) menunjukkan bahwa daging kambing, sapi, kerbau, ayam kampung dan ayam potong yang telah diperlakukan dengan perendaman daun pepaya menunjukkan hasil yang berbeda dibandingkan dengan kontrol yaitu pada semua daging terdapat banyak pita protein minor. Sedangkan pita mayor hanya terdapat 6 sampai 9 pita protein saja. Dengan demikian adanya pencampuran daging babi pada sampel daging sapi dapat dilihat dari tingkat ketebalan pita-pita protein yang muncul antara lain troponin T yang semakin menurun dengan kenaikan jumlah daging babi yang ditambahkan. Walaupun demikian metode ini belum cukup efektif untuk menganalisis cemaran daging babi secara kuantitatif, dimana pita-pita protein yang muncul masih relatif bias, sehingga sulit dikuantisasikan terutama untuk sampel yang berjumlah sedikit dan sampel yang telah melalui proses pemanasan. Untuk itu perlu dilakukan validasi metode analisis cemaran babi sehingga pita-pita protein yang muncul bisa dikuantisasikan dengan lebih baik.

Dalam penelitian ini digunakan sosis sapi, babi, dan kambing serta campurannya yang dihidrolisis menggunakan enzim tripsin dengan konsentrasi 1% (b/v) dengan waktu inkubasi 30 menit, pH 6,8 pada suhu 37 °C (Babu, 2013). Tripsin merupakan salah satu enzim protease yang dapat memotong protein pada sisi C-terminal yang mengandung residu lisin dan arginin. Hasil hidrolisat yang diperoleh ini selanjutnya diidentifikasi profil proteinnya dan dilakukan analisis densitometri. Dari hasil ini diharapkan diperoleh kandidat protein biomarker yang spesifik yang selanjutnya akan digunakan untuk keperluan validasi metode analisis. Analisis profil protein dilakukan berdasarkan pita-pita yang muncul dan dikonversi menjadi nilai Rf dan *peak area*. Pita-pita protein dengan nilai Rf yang spesifik, selanjutnya dijadikan sebagai protein biomarker dan dikuantisasikan ketebalan pita-pita dengan bantuan aplikasi *gel image analysis (Image J)*. Penghitungan presisi dilakukan melalui pengujian berulang (*repeatability*) dengan menggunakan konsentrasi sampel yang sama dan nilai akurasi ditentukan melalui metode standar adisi (penambahan kontrol positif). Hasil validasi ini diharapkan dapat memberikan gambaran yang komprehensif tentang presisi dan akurasi metode pengukuran cemaran daging babi dalam produk olahan sosis melalui teknik elektroforesis dan analisis densitometri.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi *Mini-Protean Gel Electrophoresis* (Biorad), power supply (200 Volt), homogenizer (Yooning), pisau *cutter* stainless steel, kamera digital, *microcentrifuge* (Sorvall), tabung eppendorp, *high centrifuge* (Sorvall) SS34, micropipet (1, 10, 100, 1000µL), software *image J* untuk analisis densitometri, dan *dialysis cassette* untuk dialisis sampel.

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel sosis daging sapi dan kambing diperoleh dari supermarket dan pasar lokal di wilayah Jakarta; sosis babi diperoleh dari supermarket di kawasan BSD (Tangerang), buffer PBS (*phosfat buffer saline*); akrilamid dan bis- akrilamid; SDS (*sodium duodecyl sulphate*); ammonium persulfat (APS); TEMED (*N,N,N',N'-tetra methyl etilen diamin*); natrium klorida 0,5 M; buffer tris hidrogen klorida 1,5 M pH 8,8; buffer tris hidrogen klorida 0,1 M pH 6,8; *coomasie brilliant blue R250*; asam asetat glasial; metanol; dan enzim tripsin (Himedia).

Prosedur Penelitian

Sampling

Teknik sampling yang dilakukan adalah dengan teknik probability sampling dimana setiap sampel yang diambil dari populasi memiliki peluang yang sama untuk dijadikan sebagai sampel uji. Sampel sosis yang dijadikan sebagai bahan utama penelitian terdiri dari sosis sapi, babi, dan kambing. Sosis sapi dan kambing dibeli dari supermarket dan pasar lokal di wilayah Jakarta Selatan. Sedangkan sosis babi diperoleh dari supermarket di kawasan BSD Tangerang. Sebelum dilakukan pengujian, sampel disimpan di suhu -20°C untuk menghindari kerusakan sampel.

Ekstraksi dan pemurnian protein jaringan otot (Hsieh et al., 2003)

Sampel sosis sapi, babi, dan kambing sebanyak 10 g dipisahkan dari selongsongnya dan diiris kecil-kecil. Sampel ditambahkan 50 mL buffer PBS (*phosfat buffer saline*) 0,01 M yang mengandung NaCl 0,5 M dengan pH 7,2. Berikutnya sampel diblender selama ± 5 menit pada suhu 4°C. Sampel dihomogenkan dengan *homogenizer* selama 2 menit pada kecepatan 11.000 rpm/menit. Sampel disimpan pada suhu 4°C selama 2 jam, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan yang telah terpisah disaring dengan kertas saring Wathman No. 1 (diameter 125 mm), aliquot dimasukkan ke dalam *dyialysis casste* 5 mL MWCO <1 kDa. Aliquot didialisis selama 1 x 24 jam dengan menggunakan akuades sampai aliquot bebas dari ion-ion garamnya. Kadar protein masing-masing sampel ditentukan dengan metode Bradford.

Pengukuran kadar protein (Smith, et al. 1985)

Penentuan kadar protein dilakukan menurut metode BCA (*Bicinchoninate Assay*). Larutan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*) digunakan sebagai standar. Preparasi sampel dan larutan standar dilakukan dengan menggunakan reagen BCA yang terdiri dari Reagent A: sodium bicinchoninate (0.1 g), Na₂CO₃ · H₂O (2.0 g), sodium tartrate (dihydrate) (0.16 g), NaOH (0.4 g), NaHCO₃ (0.95 g), dilarutkan dalam aquades 100 mL dan diatur pH menjadi 11.25 dengan penambahan NaHCO₃ atau NaOH. Reagent B: CuSO₄ · 5H₂O (0.4 g) dalam 10 mL aquades. Larutan kerja dibuat campuran antara reagen A dan B dengan perbandingan (100:2) yang akan membentuk kompleks senyawa kompleks berwarna hijau yang dapat dibaca pada panjang gelombang 562 nm.

Hidrolisis Protein Sosis Sapi, Babi, dan Kambing (Adler-Nissen, 1986)

Sosis sapi, babi, dan kambing dilakukan hidrolisis dengan menggunakan enzim proteolitik tripsin yang diperoleh dari HiMedia Laboratories Ltd. Hidrolisis dilakukan pada kondisi pH 8 dengan suhu 37 °C selama 30 menit dalam larutan buffer posfat 0,02 M dengan konsentrasi enzim tripsin . Campuran hidrolisat diinaktivasi dengan ditambahkan tris-hidrogen klorida 0,5 M pH 8 dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 10 menit. Sebanyak 1 mL hidrolisat diambil dan dianalisis profil proteinnya menggunakan SDS-PAGE

Analisis profil protein hidrolisat dengan SDS-PAGE

Hidrolisat protein dipisahkan profil proteinnya menggunakan elektroforesis SDS-PAGE dengan metode Laemli, 1970. larutan *resolving gel* 10% dan *stacking gel* 4% dibuat dalam larutan buffer tris HCl 1.5 M, pH 8,45. Sampel didenaturasi dengan menggunakan sample buffer (*commasie brilliant blue* 1%, gliserol 25%, tris-HCl 1M pH 6,8, SDS 20% dan β-merkaptotanol) dengan perbandingan buffer dan protein 1:2. Selanjutnya dididihkan pada suhu 90 °C selama 10 menit dan disentrifugasi selama 5 menit. Alat elektroforesis disiapkan dengan *resolving buffer* (tris-HCl 1,5M pH 8,8), *stacking buffer* (tris-HCl 0,5M pH 6,8), larutan bisakrilamid (1,5 %), dan akrilamid (48%). Elektroforesis dilakukan selama 60 menit pada tegangan 150 volt dengan protein marker sebagai pembanding (*Range* 1.06-26.6 kDa). *Staining* protein menggunakan larutan *Coomasie brilliant blue* 0.1% (b/v). Hasil dari *staining* dicuci dengan menggunakan larutan *destaining* (asam asetat 7.5% dan metanol 40%). Protein yang telah *didestaining* difoto dengan kamera digital. Profil protein hasil elektroforesis SDS-PAGE dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui nilai Rf masing-masing pita protein dengan analisis densitometri menggunakan software *Image J*, lalu dianalisis secara kuantitatif dengan menentukan ketebalan pita (intensitas) protein, volume, dan waktu retensinya. Hasil analisis dibandingkan untuk setiap jenis sampel melalui aplikasi software *Image J* 7.0.

Validasi Metode (Uji Presisi, Akurasi, Linearitas, dan Uji Kekuatan Metode (Harmita, 2004)

Uji Presisi

Uji presisi dilakukan dengan pengukuran secara berulang (*repeatability*) menggunakan sampel sosis babi yang sama dengan profil proteinnya telah dianalisis terlebih dahulu dan ditentukan protein biomarkernya yang akan dijadikan sebagai target dalam perhitungan uji presisi. Pita protein biomarker

dikuantisasikan menggunakan analisis densitometri dengan menghitung nilai Rf dan *peak* areanya kemudian dihitung standar deviasinya masing-masing dengan menggunakan persamaan :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$KV(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan :

SD = simpangan baku hasil pengukuran

KV = simpangan baku relatif

Uji Akurasi (Persen Recovery)

Penghitungan persen *recovery* dilakukan dengan metode standar adisi dimana sampel hidrolisat protein sosis babi yang mengandung protein biomarker diuji secara terpisah dalam keadaan murni dan diuji kembali setelah dicampurkan ke dalam sampel hidrolisat sosis sapi dan kambing. Kemudian pita-pita protein biomarker yang dihasilkan dihitung luas areanya masing-masing dan dimasukkan ke dalam persamaan :

$$\% Recovery = \frac{\text{Luas area PB murni}}{\text{Luas area PB campuran}} \times 100\%$$

Keterangan :

PB = Protein biomarker

Uji Linearitas (Blending)

Sampel hidrolisat masing-masing dilakukan pencampuran dengan variasi konsentrasi hidrolisat yang berbeda. Pencampuran dilakukan pada perbandingan konsentrasi protein sosis : Sapi 50% : Babi 50%, Sapi 60% : Babi 40%, Sapi 70% : Babi 30%, Sapi 80% : Babi 20%, Sapi 90% : Babi 10%. Selanjutnya masing-masing campuran hidrolisat diuji kembali pita proteinnya dengan SDS- PAGE yang dilanjutkan dengan analisis densitometri. Pita-pita protein yang spesifik dihitung secara kuantitatif dan dibandingkan untuk semua perlakuan. Selanjutnya linearitas hasil pengukuran dihitung dengan persamaan regresi linier ($y = mx \pm b$) dengan memplotkan nilai konsentrasi (x) terhadap nilai *peak* area protein target (y).

Uji Kekuatan Metode (Robustnes)

Validasi kekuatan metode dilakukan dengan uji perubahan kondisi hidrolisis sampel dengan memvariasikan pH ekstraksi menggunakan buffer posfat pH 6,5 dan pH 8. Hasil ekstraksi pada masing-masing pH dibandingkan dengan hasil ekstraksi pada pH awal 7,2 diamati pita-pita protein yang muncul setelah dipisahkan dengan SDS-PAGE. Pita-pita protein spesifik yang dihasilkan selanjutnya dibandingkan nilai Rf dan luas areanya secara kuantitatif dengan memperhatikan terjadinya perubahan yang signifikan.

3. Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi Protein dari Sampel Sosis

Ekstraksi protein dilakukan menggunakan metode homogenisasi yang dilakukan pada suhu rendah. Hal ini bertujuan agar protein yang dihasilkan tidak terdegradasi oleh aktivitas enzim protease atau teroksidasi karena suhu yang terlalu tinggi. Ekstraksi dilakukan pada kondisi pH netral (7.4) dengan menggunakan buffer fosfat 0.05 M. Protein jaringan otot biasanya dapat diekstrak pada pH yang lebih tinggi, karena dimungkinkan pengaruh pH dapat meningkatkan proses gelatinisasi protein myofibril seperti aktin dan miosin.

Hasil ekstraksi protein selanjutnya diukur kadar proteinnya dengan menggunakan metode BCA (Smith, et al. 1985), dimana larutan ekstrak protein direaksikan dengan reagen BCA (*Bichinconinic acid* dalam suasana basa) sehingga akan menghasilkan kompleks senyawa berwarna hijau yang dapat diukur pada daerah λ 562 nm. Kadar protein masing-masing sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar protein masing-masing sampel sosis

No	ID	OD 1	OD 2	OD rata2	Kons. Sample ($\mu\text{g/mL}$)
1	sapi 1	1.257	1.264	1.261	2115,61
2	sapi 2	1.440	1.440	1.440	2446,19
3	kambing 1	0.472	0.427	0.450	617,875
4	kambing 2	0.523	0.523	0.523	752,69
5	babi B1	0.921	0.921	0.921	1487,71
6	babi B2	0.950	0.950	0.950	1541,27
7	babi A1	1.125	1.125	1.125	1864,45
8	Babi A2	1.140	1.140	1.140	1892,15
9	babi K1	0.968	0.961	0.965	1568,97
10	babi K2	1.042	1.052	1.047	1720,4

Berdasarkan hasil pengukuran kadar protein pada masing-masing sampel sosis diperoleh rentang konsentrasi antara 617.875 – 2446.19 $\mu\text{g/ml}$. Kadar protein terbesar diperoleh pada sampel sosis sapi sedangkan kadar protein terendah diperoleh pada sampel sosis kambing. Perbedaan kadar protein dimungkinkan terjadi karena perbedaan jenis daging dan perlakuan pada masing-masing sampel. Selain itu, kelarutan masing-masing protein berbeda dan sangat dipengaruhi oleh komposisi protein myofibril yang dimiliki oleh masing-masing sampel. Hal ini sangat mempengaruhi proses gelatinisasi yang menyebabkan protein sukar larut dan akan membentuk agregat yang lebih mudah mengendap.

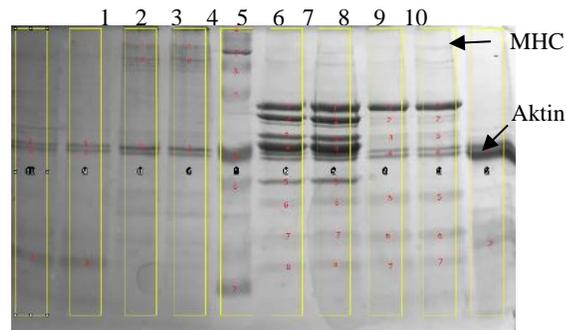
Berdasarkan kedua protein myofibril, miosin dan aktin berkontribusi paling besar pada pembentukan karakteristik gel yang diinginkan dalam produk daging olahan. Gelasi miosin yang diinduksi oleh panas menghasilkan pembentukan struktur jaringan 3 dimensi yang menahan air di tempat yang kurang bergerak. Penelitian Listrat, et al. (2016) telah mengemukakan bahwa reologi dan sifat fisik gel protein globular lebih banyak tergantung pada ukuran molekul dan sedikit dipengaruhi oleh komposisi asam amino dan distribusinya, dan ini mungkin juga berlaku pada protein fibrillar. Selama pembentukan jaringan, retensi lemak dan air ditingkatkan dan ini akan mempengaruhi tekstur dan kohesi produk akhir serta menentukan kapasitas pembentuk gel protein myofibril (Smith et al. 2001).

Konsentrasi protein pada sampel sosis sapi lebih besar dibandingkan dengan sosis babi dan sosis kambing, namun demikian perbedaan konsentrasi protein total antara sapi dengan babi tidak berbeda signifikan. Adanya perbedaan pada konsentrasi tersebut diduga karena berbedanya jaringan otot yang diambil saat pembuatan sosis. Jaringan otot pada sapi yang diambil adalah bagian paha belakang dan pada babi yang diambil adalah bagian punggung. Selain itu diduga pula karena perlakuan pada saat ekstraksi protein belum optimal. Santoni et al (2000), mengatakan bahwa penghancuran daging bertujuan untuk memecah dinding sel serabut otot sehingga protein dapat terekstraksi dengan larutan garam. Gesekan dengan alat penghalus dapat mengakibatkan terhambatnya ekstraksi protein sehingga terjadi koagulasi protein. Dengan demikian perlakuan pemanasan dan pengurangan dapat mengakibatkan denaturasi protein sehingga konsentrasi protein total terlarut menjadi lebih rendah (Wahniyati & Ali, 2005).

Elektroforesis SDS-PAGE

Elektroforesis SDS-PAGE dilakukan untuk memisahkan komponen protein yang terdapat pada masing-masing ekstrak dan mengidentifikasi kemungkinan adanya protein biomarker. Protein biomarker adalah protein spesifik yang hanya terdapat pada sampel sosis babi yang tidak terdapat pada sosis sapi maupun kambing. Protein biomarker inilah yang nanti akan digunakan dalam keperluan validasi metode analisis cemaran daging babi melalui analisis densitometri. Elektroforesis SDS-PAGE dilakukan dalam

konsentrasi gel 14% dalam resolving bufer pH 8.5. Hasil elektroforesis menghasilkan pita-pita proteins seperti terlihat pada gambar 1.



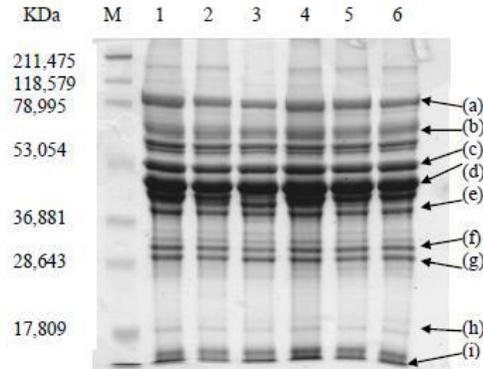
Gambar 1. Profil protein jaringan otot pada sampel sosis hasil ekstraksi dalam buffer fosfat pH 7.4. (1-2 : sosis, 3-4 : sosis kambing, 5 : marker protein, 6-7 : sosis babi A, 8-9 : sosis babi B, 10 : sosis babi control).

Berdasarkan hasil pemisahan pita-pita protein terlihat bahwa pada semua sampel sosis muncul 2 pita protein yang sama pada kisaran 50 kDa yang diduga merupakan fraksi protein aktin dan 2 pita protein lainnya di kisaran 220 kDa dan 150 kDa yang diduga merupakan protein rantai berat myosin (*Myosin heavychain/ MHC*). Komposisi dan intensitas protein pada masing-masing sampel sangat dipengaruhi oleh jenis daging dan perlakuan selama proses pengolahan sosis.

Protein larut-air terdiri atas mioglobin dan enzim yang berperan dalam proses metabolisme sel otot. Protein ini mudah dipisahkan dengan cara ekstraksi dengan larutan garam lemah (kekuatan ion $< 0,1$). Miosin merupakan protein otot dengan jumlah yang paling besar dan merupakan molekul asimetrik dengan bobot molekul sekitar 500 kDa, dengan kandungan α -helik sebesar 60-70%. Miosin dapat dipisahkan dengan ultrasentrifugasi menjadi dua sub unit, meromiosin berat (220 kDa) dan meromiosin ringan (20 kDa). Protein fibril lainnya, aktin terdapat dalam dua bentuk, yang pertama berupa monomer disebut aktin-G dengan bobot molekul 47 kDa dan aktin-F (fibrous) dengan bobot molekul yang lebih tinggi. Unit aktin bergabung membentuk heliks ganda dengan panjang yang tidak tentu. Aktomiosin merupakan kompleks aktin-F dengan miosin dan bertanggungjawab atas proses kontraksi dan relaksasi otot. Mikrofilamen yang lain yang terdapat pada zona H yaitu tropomiosin dan troponin yang terdiri dari tiga jenis molekul, troponin I, C dan T. Keberadaan tropomiosin dan troponin dalam sel otot berperan dalam proses pengikatan miosin (Listrat et al, 2016).

Validasi Metode

Adapun hasil optimasi proses elektroforersis SDS-PAGE dapat dilihat pada gambar 2. Dari gambar tersebut, terlihat bahwa dengan memvariasikan waktu hidrolisis pada sampel jaringan otot daging babi diperoleh beberapa pita dengan bobot molekul tertentu. Dari sekian banyak pita protein yang dihasilkan selanjutnya ditentukan satu pita protein yang akan dijadikan sebagai protein biomarker. Selanjutnya pita protein yang diperoleh dari hasil SDS-PAGE dihitung nilai R_f nya. Perhitungan R_f dilakukan dengan mengukur jarak pergerakan sampel kemudian dibandingkan dengan jarak *tracking dye*. Pengukuran nilai R_f dilakukan dengan menggunakan software ImageJ 1.46 sebagai nilai x yang kemudian dimasukkan pada persamaan regresi linear, sehingga lebih mudah dan cepat.



Gambar 2. Hasil Pemisahan Elektroforesis Jaringan Otot Daging Babi (M : marker standar protein, 1-3 : hasil hidrolisis tripsin 30 menit, 60 menit dan 90 menit, 4-6 : hasil ekstraksi pH 6.5, pH 7.4 dan pH 8.5)

Berdasarkan gambar 2, terlihat bahwa protein jaringan otot daging babi secara keseluruhan menghasilkan pita-pita dengan intensitas yang relatif beragam, dimana pada ekstrak protein hasil hidrolisis menunjukkan adanya 4 pita protein spesifik yang muncul pada daerah sekitar 50 kDa (2 pita) dan dibawah 36 kDa (2 pita). Sedangkan pada ekstrak protein hasil ekstraksi pada berbagai pH menghasilkan pita-pita protein yang sama tetapi dengan intensitas yang berbeda, terutama pada pita protein yang muncul pada kisaran ~28kDa dan 36kDa.. Kedua protein spesifik tersebut muncul dengan intensitas yang relatif tebal jika dibandingkan dengan pita protein sebelum hidrolisis. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh tingkat ekspresi protein yang relatif berbeda dimana perlakuan hidrolisis dengan waktu hidrolisis yang lebih lama akan menghasilkan pita-pita protein yang muncul dengan konsentrasi yang lebih rendah.

Hasil SDS-PAGE pada gel, dilakukan penentuan berat molekul tiap-tiap pita protein dengan menggunakan persamaan garis lurus yang diperoleh dari kurva standar berat molekul pembanding (marker protein) dari Bio-Rad.

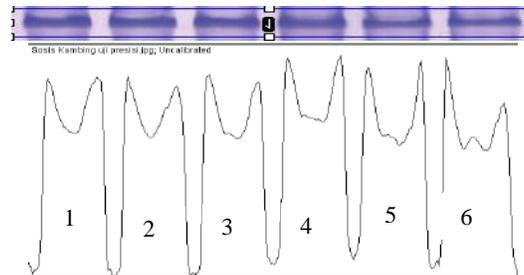
Tabel 2. Nilai Rf dan BM marker protein

4.	Rf	5.	Bm	6.	Log bm
7.	54	8.	211.475	9.	2.325259034
10.	139	11.	118.579	12.	2.074007784
13.	211	14.	78.995	15.	1.897599603
16.	430	17.	53.045	18.	1.724644454
19.	626	20.	36.881	21.	1.566802688
22.	772	23.	28.643	24.	1.457018503
25.	1031	26.	17.809	27.	1.250639534

Gel hasil SDS-PAGE memperlihatkan adanya 25 pita (*band*) protein. Diantara 25 pita protein yang terbentuk, pita-pita tersebut ada yang terlihat lebih tebal jika dibandingkan dengan pita protein yang lain yang terlihat lebih tipis. Hal ini dijelaskan oleh Pasila (2008) dimana tebal tipisnya pita protein yang tercatat merupakan gambaran banyaknya protein yang terkandung dalam profil protein. Semakin tinggi konsentrasi sampel semakin tebal pita yang terbentuk. Oleh sebab itu, pada penelitian ini setiap sampel yang dimasukkan kedalam sumur gel elektroforesis dibuat sama dalam jumlah volumenya tergantung dari jumlah kadar protein yang dimiliki sampel. Selain itu dilakukan analisis lebih lanjut seperti melalui blotting dengan software ImageJ 1.46 untuk mengetahui intensitas tebal tipisnya pita protein yang terbentuk.

Hasil Uji Presisi

Uji presisi dilakukan dengan pengukuran secara berulang (*repeatability*) menggunakan sampel sosis babi dengan konsentrasi yang sama dan ditentukan protein biomarkernya yang akan dijadikan sebagai target dalam perhitungan uji presisi. Pita protein biomarker dikuantisasikan menggunakan analisis densitometri dengan menghitung nilai *peak* areanya. Hasil uji presisi dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Peak elektroforegram protein biomarker uji presisi (imageJ)

Dari gambar 3 selanjutnya dilakukan pengukuran luas area dengan menggunakan aplikasi imageJ dan dsiperoleh nilai area seperti tercantum pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji presisi

<i>Peak</i>	<i>Area</i>
1	20341.832
2	20372.711
3	18922.418
4	20613.054
5	18807.489
6	19513.439
SD	788.826667
Rata-rata	19761.82383
KV	3.99166936

Dari hasil perhitungan nilai standar deviasi diperoleh simpangan baku relatif sebesar 3.99 % ($KV > 2\%$). Hal ini menunjukkan bahwa hasil uji presisi melewati nilai ambang batas yang dipersyaratkan. Namun demikian untuk hasil uji secara kulitatif nilai simpangan baku relatif (%RSD yang diperoleh kurang dari 5%. Nilai presisi sangat bergantung pada faktor ketelitian dalam melakukan preparasi sampel dan memipet sampel ke dalam sumur gel yang menyebabkan reproducibilitas hasil pengukuran menjadi berbeda satu sama lain.

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identic yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal (Harmita, 2004).

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat

pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang.

bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Ditemukan bahwa koefisien variasi meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit. Pada kadar 1% atau lebih, standar deviasi relatif antara laboratorium adalah sekitar 2,5% ada pada satu per seribu adalah 5%. Pada kadar satu per sejuta (ppm) RSDnya adalah 16%, dan pada kadar part per bilion (ppb) adalah 32% (Harmita, 2004).

Hasil Uji akurasi

Penghitungan persen *recovery* dilakukan dengan metode standar adisi dimana sampel hidrolisat protein sosis babi yang mengandung protein biomarker diuji secara terpisah dalam keadaan murni dan diuji kembali setelah dicampurkan ke dalam sampel hidrolisat sosis sapi dan kambing. Hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengujian persen *recovery*

No	Peak area PB murni	Peak area PB campuran	Persen <i>recovery</i> (%)
1	18281.26	18765.53	97.4194
2	19145.12	19871.89	96.3427

Dari hasil perhitungan % *recovery* di atas, terlihat bahwa hasil pengujian akurasi menunjukkan nilai persen *recovery* di atas 95%. Hal ini menunjukkan bahwa metode analisis ini cukup akurat dalam pengukuran cemaran daging babi dalam sampel sosis sapi maupun kambing. Namun demikian untuk memastikan hal tersebut masih perlu dilakukan pengujian kembali dan memastikan reliabilitas dari metode ini secara lebih akurat. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematik di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematik tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur

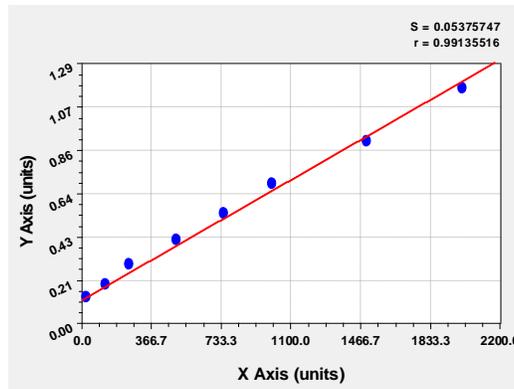
Uji Linearitas (Blending)

Sampel hidrolisat masing-masing dilakukan pencampuran dengan variasi konsentrasi hidrolisat yang berbeda. Pencampuran dilakukan pada perbandingan konsentrasi protein sosis : sapi 50% : babi 50%, sapi 60% : babi 40%, sapi 70% : babi 30%, sapi 80% : babi 20%, sapi 90% : babi 10%. Selanjutnya masing-masing campuran hidrolisat diuji kembali pita proteinnya dengan SDS- PAGE yang dilanjutkan dengan analisis densitometri. Pita-pita protein yang spesifik dihitung secara kuantitatif dan dibandingkan untuk semua perlakuan. Hasil uji linearitas dapat dilihat pada table 5.

Tabel 5. Uji lineritas pencampuran ekstrak protein babi ke dalam ekstrak protein sapi

No.	Kons. protein	OD Standard 1	OD Standard 2	OD Stand. rata2
1	90 : 10	1.169	1.169	1.169
2	80 : 20	0.935	0.880	0.908
3	70 : 30	0.700	0.693	0.697
4	60 : 40	0.553	0.542	0.548
5	50 : 50	0.415	0.415	0.415

Dari hasil perhitungan nilai OD rata-rata selanjutnya dibuat kurva regresi untuk menentukan nilai linearitasnya. Kurva regresi linier dapat dilihat pada gambar 5.



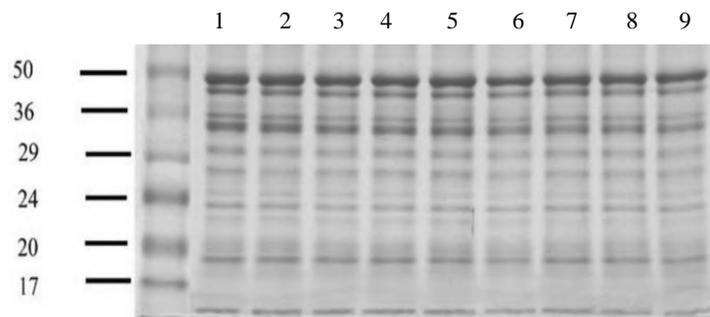
Gambar 5. Hasil perhitungan linearitas (*blending*)

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit

Berdasarkan hasil linearitas terlihat bahwa, metode ini memberikan respon yang cukup baik dengan ditunjukkan nilai koefisien korelasi ($r = 0.99135516$) yang menunjukkan repon sinyal yang dihasilkan cukup proporsional dengan kenaikan konsentrasi sampel. Dari berbagai variable uji verifikasi metode diperoleh nilai linearitas yang memenuhi standar dengan kata lain metode ini sudah cukup baik dalam mendeteksi cemaran daging babi dalam produk pangan olahan seperti pada produk sosis sapi yang telah diuji.

Uji Kekuatan Metode

Uji kekuatan metode dilakukan dengan uji perubahan kondisi hidrolisis sampel dengan memvariasikan pH ekstraksi menggunakan buffer posfat pH 6,5 dan pH 8. Hasil ekstraksi pada masing-masing pH dibandingkan dengan hasil ekstraksi pada pH awal 7,2 diamati pita-pita protein yang muncul setelah dipisahkan dengan SDS-PAGE. Pita-pita protein spesifik yang dihasilkan selanjutnya dibandingkan nilai R_f dan luas areanya secara kuantitatif dengan memperhatikan terjadinya perubahan yang signifikan. Hasil uji kekuatan metode dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Hasil uji kekuatan metode pada hidrolisat protein dengan rentang pH 6.5 (1-3), 7.2 (4-6) dan 8.5 (7-9)

Berdasarkan hasil uji *robustness*, terlihat bahwa perbedaan pH ekstraksi tidak teralu berpengaruh terhadap nilai Rf dan ketebalan pita-pita protein yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa metode ini tidak terpengaruh oleh perubahan kecil, seperti variasi pH yang sengaja dibuat dalam parameter metode analisis. Uji kekuatan dapat memberikan indikasi kehandalannya dalam penggunaan secara normal. Stabilitas dari nilai yang diamati dapat diuji dengan mengubah beberapa kondisi analisis seperti pH larutan, suhu reaksi, waktu reaksi atau penambahan reagen. Ketika nilai yang diamati tidak stabil, prosedur analisis harus diperbaiki. Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk memastikan suatu sistem berjalan dengan baik dan benar serta memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakan harus mampu memberikan data yang dapat diterima.

Secara keseluruhan dapat disimpulkan bahwa hasil validasi metode analisis kehalalan produk pangan hewani berdasarkan perbedaan profil protein jaringan otot telah menghasilkan data yang cukup valid dan dapat diterima berdasarkan parameter-parameter hasil uji yang cukup memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan. Namun demikian untuk memastikan metode uji ini cukup reliabel masih perlu dilakukan uji lebih lanjut dengan melakukan uji kesesuaian sistem pada kondisi yang berbeda.

4. Simpulan

Hasil validasi metode menunjukkan tingkat presisi analisis dan akurasi yang telah memenuhi standar yang dipersyaratkan, yakni dengan nilai KV < 5% dan nilai persen recovery > 95%. Hasil uji linearitas dan uji ketangguhan metode juga menunjukkan metode uji yang digunakan sudah cukup efektif dalam menguji kehalalan produk pangan hewani khususnya pada produk sosis yang terkontaminasi oleh daging babi.

Terdapat 2 perbedaan yang signifikan antara profil protein yang dihasilkan dari masing masing sampel (sapi, babi, dan kambing) dimana pada sampel daging babi muncul pita protein yang spesifik di daerah 150 kDa dan 112 kDa yang menunjukkan keberadaan protein myosin rantai berat dengan nilai bobot molekul yang relatif berbeda. Setelah dilakukan hidrolisis enzimatik dengan menggunakan enzim tripsin diperoleh kandidat protein biomarker yang muncul di bawah 50 kDa yang kemungkinan merupakan fraksi dari protein aktin.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti Mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah Jakarta yang telah mendanai penelitian ini, Kepala Pusat Laboratorium Terpadu FST UIN Syarif Hidayatullah Jakarta dan Laboratorium Bioteknologi PSSP IPB Bogor yang telah memfasilitasi kegiatan penelitian ini

Daftar Pustaka

- Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymic Hydrolysis of Food Protein*. Inggris: Elsevier Applied Science.
- Babu, K. M. 2013. *Silk Processing, Properties and Applications*. India: Woodhead Publishing Limited.
- BPS, 2010. Penduduk Indonesia Menurut Wilayah dan Agama yang Dianut. <https://sp2010.bps.go.id/index.php/site/tabel?tid=321>
- Harmita, 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. I, No.3, Desember 2004, 117 - 135
- Hsieh, S. L., Liu, R. W., Wu, C. H., Cheng, W. T., & Kuo, C. 2003. cDNA Nucleotide Sequence Coding for Stearoyl-CoA Desaturase and Its Expression in the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo. *Molecular Reproduction and Development*.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*.

- Listrat A, Lebret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, Picard B, and Bugeon J. 2016. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality The Scientific World Journal Volume, 14 pp 1-14. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3182746>
- Popovski, ZT, Tanaskovska B, Porchu K, Vukovic V, Andornov S, Palasevski. 2002. New Approach in The Detection of Porcine Stress Syndrome. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28(5-6), pp 73-80.
- Rahmawati, Sisimindari, Raharjo, T.J., Sudjadi, & Rohman, A. 2016. Analysis of Pork Contamination in *Abon* using Mitochondrial D-Loop 22 primer Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Method, *International Food Research Journal*, vol. 23, pp. 370-374.
- Rohman, A., Himawati, A., Triyana, K., Sisimindari, & Fatimah, S. 2017. 'Identification of Pork in Beef Meatballs using Fourier Transform Infrared Spectrophotometry and Real-time Polymerase Chain Reaction, *International Journal of Food Properties*, vol. 20, pp. 654-661.
- Santoni, V., Molloy, M., & Rabilloud, T. (2000). Membrane proteins and proteomics: un amour impossible. *Electrophoresis*, 21(6), 1054–1070.
- Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T, Mallia A K, Gartner F H, Provenzano M D, Fujimoto E K, Goetze N M, Olson B J, Klenk D C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* Oct;150(1):76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Smith, D.M. 2001. Functional properties of muscle proteins in processed poultry products. Dalam: A.R. Sams (Editor). *Poultry Meat Processing*. CRC Press, Washington.
- Suparman. 2013. *Analisis Kandungan Babi Pada Kornek Daging Sapi Di Wilayah Purwokerto Dengan Metode Real Time PCR*. Purwokerto: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto.
- Susanti, A. M., Darmawati, S., & Maharani, E. T. W. 2019. Five Types of Profile Meat Protein with Papaya Soaked Leaves Based SDS-PAGE. *Gorontalo Journal of Public Health*, 2, 132–138.
- Susanto, E. 2005. *Identifikasi Pencampuran Daging Dalam Baso*. Diakses pada <https://republika.co.id/berita/dunia-islam/info-halal/08/12/17/20904-identifikasi-pencampuran-daging-dalam-baso>.
- Wahniyathi, H dan Ali HM. 2005. Karakteristik protein daging dengan penambahan NaCl pada berbagai waktu aging post mortem dan hubungannya dengan mutu sensori sosis. *Tesis*: Fakultas Peternakan Universitas Hasanudin. Makasar.
- Yuningsih, R. 2010. Perlindungan Konsumen dari Dampak Buruk Makanan Tidak Halal bagi Kesehatan. *Aspirasi*