

Analisis Komposisi Asam Amino dalam Cangkang Kapsul Gelatin Sapi dan yang Diduga Gelatin Babi Menggunakan Metode Ultrahigh Performance Liquid Chromatography

¹Siti Nadiyahurrahmah Madani, ²Nety Kurniaty, ³Diar Herawati

^{1,2,3}*Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung.*

Jl. Tamansari No. 1 Bandung 40116

e-mail: ¹snadyaturrahmah@yahoo.com, ²netykurniaty@yahoo.com, ³diarmunawar@gmail.com

Abstrak. Telah dilakukan penelitian mengenai analisis komposisi asam amino dalam cangkang kapsul gelatin sapi dan yang diduga gelatin babi menggunakan metode ultrahigh performance liquid chromatography (UPLC). Tahapan penelitian meliputi pengambilan empat buah sampel yang terdiri dari gelatin sapi, gelatin yang diduga babi, cangkang kapsul berlabel halal dan tanpa label halal, kemudian dilakukan hidrolisis asam amino, derivatisasi asam amino, dan analisis profil asam amino. Hasil analisis kadar dari keempat sampel didapatkan asam amino paling tinggi adalah glisin dan prolin, kadar asam amino tertinggi ini sama dengan kadar asam amino pada penelitian sebelumnya Syafiqoh (2014) menggunakan alat KCKT, sedangkan kadar asam amino paling rendah yang didapatkan pada penelitian ini asam amino sistein dan terdapat perbedaan jumlah kadar yang signifikan bila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya.

Kata kunci: UPLC, Analisis komposisi asam amino, Gelatin, Cangkang Kapsul.

A. Pendahuluan

Dalam industri pangan, gelatin ditemukan dalam produk seperti jelly, es krim, yogurt, ataupun marshmallow. Sedangkan pada industri farmasi gelatin digunakan sebagai pembuatan kapsul keras dan lunak. (Nharil, Ismail & Che Man, 2012). Gelatin bersumber dari tulang hewan yang berasal dari babi dan sapi. Gelatin yang berasal dari babi dan sapi mempunyai kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan sumber lainnya seperti ikan (Jamaludin et al, 2011). Gelatin yang diperoleh dari babi juga merupakan gelatin yang sangat luas dipakai dalam kedua industri diatas, mengingat gelatin yang diperoleh dari babi paling murah dibandingkan hewan lainnya. Gelatin merupakan campuran heterogen dan polipeptida yang diperoleh melalui hidrolisis kolagen dari jaringan ikat hewan (GMIA, 2012). Gelatin memiliki sifat yang unik sehingga digunakan secara luas dalam industri makanan dan farmasi. Meskipun demikian, ada masalah lain yang timbul yaitu status kehalalan produk dengan bahan baku gelatin dari babi. Sebagai negeri dengan penduduk bermayoritas muslim sangatlah wajar jika pangan halal menjadi isu dan perbincangan yang cukup menarik untuk dikaji. Hal ini dikarenakan semakin pesatnya perkembangan teknologi kefarmasian terutama industri farmasi yang memproduksi cangkang kapsul dengan berbahan dasar gelatin babi. Perkembangan penggunaan komposisi ini didorong oleh kebutuhan akan komposisi dengan sifat-sifat tertentu yang diinginkan dengan harga yang murah. Masalah yang kemudian timbul adalah banyaknya komposisi baik bahan baku utama maupun bahan aditifnya yang sulit ditentukan kehalalan asal bahan pembuatnya. Padahal, kejelasan suatu informasi suatu produk farmasi sangat penting agar konsumen mengetahui produk yang dikonsumsi tersebut adalah produk yang halal atau tidak jelas ketentuannya.

Disamping itu, dalam Al Quran yang merupakan pedoman utama umat islam, Allah telah memberikan rambu-rambu yang jelas tentang perintah mengkonsumsi suatu barang atau produk, seperti yang telah disebutkan dalam QS Al-Maidah : 88.

Berdasarkan pemaparan diatas maka ditentukan rumusan masalah, apakah metode UPLC dapat membedakan komposisi asam amino dengan lebih baik dibandingkan metode KCKT diantara produk cangkang kapsul yang diduga gelatin babi dan gelatin sapi serta dari bahan mentahan seperti gelatin yang diduga babi dan bahan mentahan gelatin sapi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi serta membedakan komposisi asam amino dalam cangkang kapsul gelatin sapi dan yang diduga gelatin babi dengan menggunakan metode UPLC yang kemudian dibandingkan dengan penelitian sebelumnya menggunakan metode KCKT. Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi bahwa metode UPLC dapat digunakan dalam analisis komponen asam amino dalam cangkang kapsul gelatin sapi dan yang diduga gelatin babi. Dan diharapkan dapat memberikan informasi komposisi asam amino yang terkandung dalam sampel yang diujikan kepada masyarakat serta kehalalan cangkang kapsul tanpa label halal obat yang beredar dipasaran.

B. Landasan Teori

Gelatin merupakan campuran heterogen polipeptida yang diperoleh melalui hidrolisis parsial kolagen dari jaringan ikat hewan dengan perlakuan asam atau basa (GMIA, 2012). Gelatin adalah istilah umum untuk campuran fraksi protein murni yang dihasilkan baik dengan hidrolisis parsial asam (tipe A gelatin) atau dengan hidrolisis parsial basa (tipe B gelatin) dan kolagen hewan yang diperoleh dari sapi dan tulang babi, kulit sapi (hide), kulit babi, dan kulit ikan (Rowe et al., 2009). Istilah gelatin mulai populer sekitar tahun 1700 dan berasal dari bahasa latin “gelatin” yang berarti kuat atau kokoh. Secara fisik gelatin berbentuk padat, kering, tidak berasa dan transparan. Ada tiga sifat yang paling menonjol pada gelatin yaitu : kemampuan untuk membentuk gel, kekenyalan dan kekuatan lapisan tinggi. Gelatin merupakan polimer tinggi alami yang memiliki berat molekular dari 20.000 sampai 70.000. Gelatin ini dipersiapkan dari bahan yang mengandung kolagen termasuk kulit, tulang dan tendon dengan pemecahan hidrolisis melauai pendidihan dengan air atau dengan menggunakan uap panas yang tinggi. (Perwitasari, 2008). Gelatin sangat kaya akan asam amino glisin (Gly) (hampir sepertiga dari total asam amino), prolin (Pro) dan 4-hidroksiprolin (4Hyd). Struktur gelatin yang umum adalah Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyd-Gly-Pro. Kandungan 4Hyd berpengaruh terhadap kekuatan gel gelatin, semakin tinggi asam amino ini, kekuatan gel juga semakin lebih baik.

Gelatin larut dalam air minimal pada suhu 49°C atau biasanya pada suhu 60°C sampai 70°C (Ward dan Court, 1997). Gelatin tidak larut dalam air dingin, tetapi hanya akan mengembang. Perendaman dalam air dingin menjadikan gelatin lunak dan bercangsur-angsur menyerap air 5 sampai 10 kali bobotnya. Gelatin larut dalam air panas, setelah pendinginan sampai 35-40°C, membentuk gel. Pada suhu 40°C, berbentuk sol (Singh et al., 2002). Gelatin banyak digunakan di berbagai industri pangan, farmasi, dan lain-lain. Dalam industri pangan gelatin sebagai pembentuk gel, agen pembentuk busa, pengental, emulsifier, dan memperbaiki tekstur. Gelatin banyak digunakan dalam produk susu dan roti terutama pada es krim, yogurt, keju, dan kue. Selain itu gelatin juga digunakan dalam industri makanan antara lain seperti coklat, es krim, marsmallow, permen, permen karet, mentega, dan sosis (Sahilah et al., 2012). Gelatin bernilai bagi industri farmasi karena dapat dibuat dalam berbagai formulasi. Gelatin banyak digunakan pada larutan, sirup, tablet, tablet salut gula, inhalansia, vagina, dan topika, dan suntikan. Gelatin digunakan untuk membentuk kapsul gelatin

keras dan lunak sebagai pembentuk lapisan film (Singh et al., 2002). Penggunaan gelatin dalam farmasi karena membantu untuk melindungi obat-obatan terhadap pengaruh berbahaya, seperti cahaya dan oksigen. Kapsul lunak misalnya terutama digunakan untuk bahan cairan, sedangkan kapsul keras yang digunakan untuk bahan serbuk (Sahilah et al., 2012).

Kapsul berasal dari bahasa latin “capsula” yang artinya wadah kecil. Dalam ilmu farmasi, kapsul merupakan wadah kecil untuk melindungi obat. Kapsul termasuk bentuk sediaan padat yang dapat diisi obat atau zat kimia yang berbentuk serbuk, granul, pasta, atau cair. Bahan utama yang digunakan dalam pembuatan cangkang kapsul keras dan cangkang kapsul lunak pada umumnya sama, yaitu gelatin, air, dan pewarna. Namun yang membedakannya adalah bahan tambahan lainnya dan cara pembuatannya. Selain terbuat dari gelatin, kapsul dapat terbuat dari HPMC, PVA, dan Starch.

C. Metodologi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Saraswanti Indo Genetech – Bogor dan meliputi beberapa tahapan yaitu pengambilan 4 buah sampel dari pasaran, hidrolisis asam amino menggunakan HCl, derivatisasi asam amino, dan analisis profil asam amino menggunakan alat UPLC dengan kondisi pengujian Kolom ACCQ-Tag Ultra C18, Temperature kolom 49°C, Fase Gerak : Sistem Komposisi gradient, Laju alir fasa gerak : 0,7 mL/menit, Detektor: PDA, panjang gelombang 260nm, volume Injeksi 1µL.

D. Hasil Penelitian

Pengambilan sampel dari pasaran diambil dengan cara mengamati seberapa banyak masyarakat di daerah yang telah ditentukan. Dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 1. Kategori Sampel

No	Sampel	Kategori
1	I	Gelatin tanpa label halal
2	II	Gelatin sapi berlabel halal
3	III	Cangkang kapsul tanpa label halal
4	IV	Cangkang kapsul berlabel halal

Hidrolisis asam amino dilakukan dengan cara menimbang 0,1 gram masing-masing dari keempat sampel dan ditambahkan 5 mL HCl 6N di vortex. Proses hidrolisis dilakukan pada suhu 110°C selama 22 jam. Proses hidrolisis ini menggunakan HCl karena bersifat sebagai oksidator kuat yang dapat memecah ikatan peptida secara sempurna. Setelah di hidrolisis, campuran didinginkan pada suhu ruangan dipindahkan ke labu ukur 50 mL dan di ad aquabides sampai tanda batas. Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan filter 0,45 µm. Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan asam amino - asam amino yang terdapat dalam gelatin, yaitu dengan cara pemotongan ikatan peptida asam amino penyusun gelatin. selama proses hidrolisis ini, hubungan anatara ikatan rantai polipeptida dari kolagen dengan ikatan rantai polipeptida yang lain akan menjadi terpisah. Hal ini disebabkan karena rusaknya struktur fibrosa dari kolagen (Seen. et al., 2010). Selanjutnya dipipet sebanyak 500 µL filtrat dan ditambahkan 40 µm larutan standar internal AABA, ditambahkan 460 µL

aquabides. Penambahan larutan standar internal yaitu sebagai faktor koreksi kesalahan volumetrik selama persiapan sampel.

10 µL dari larutan diatas dan menambahkan 70 µL AccQ-Flour Borate kemudian ditambahkan pula 20 µL reagent flour A, divortex dan didiamkan selama 1 menit. Diinkubasi selama 10 menit pada konidisi suhu 55°C. Setelah itu filtrat diambil sebanyak 1µL untuk siap disuntikan kedalam UPLC. Tujuan dari derivatisasi adalah untuk meningkatkan deteksi, merubah matrix sehingga diperoleh pemisahan yang lebih baik, menstabilkan analit yang sensitif, dan mengubah struktur asam amino yang tidak memiliki gugus kromofor menjadi memiliki gugus kromofor dengan adanya proses derivatisasi. Agen penderivat yang digunakan adalah AQC (aminokuinolit Nhidroxy succinimidil carbamate). AQC ini merupakan agen penderivat yang paling stabil dibandingkan dengan yang lainnya, karena AQC dapat bereaksi dengan asam amino primer dan sekunder. Kelebihan dari agen penderivat ini adalah dapat bereaksi dengan air dan membentuk 6-Aminokuinolin (AMQ), N-hidroksi suksinimidi (NHS), Karbondioksida (CO₂). Kemudian dilakukan perhitungan kadar :

Contoh penetapan kadar L-histidine dilakukan dengan perhitungan sebagai berikut :

1. Rasio standar L-histidine terhadap AABA :

$$\frac{\text{Luas area L-histidine dalam standar}}{\text{Luas area AABA dalam standar}} = \frac{46337,44}{101558,46} = 0,46$$

2. Rasio sampel L-histidine terhadap AABA :

$$\frac{\text{Luas area L-histidine terhadap AABA}}{\text{Luas area L-histidine dalam sampel}} = \frac{9617,62}{30867,09} = 0,31$$

3. Kadar L-histidine dalam sampel (mg/kg) :

$$\frac{\text{Rasio L-histidine sampel} \times \left(C \cdot \frac{\text{Standar}}{1000000000} \right) \times \text{BM} \times \text{fp} \times 1000}{\frac{\text{Rasio L-histidine standar} \times \text{bobot sampel}}{0,31 \times \left(\frac{100}{1000000000} \right) \times 155,16 \times 100000 \times 1000}} = \frac{10439,26 \text{ mg/kg}}{0,046 \times 0,1015}$$

Tabel 2. Hasil Kadar Asam Amino Dari Empat Sampel

Asam Amino	Gelatin Tanpa Label Halal	Gelatin Berlabel Halal	Cangkang Kapsul Tanpa label Halal	Cangkang Kapsul Berlabel Halal
L-Histidine	10439,26	12818,93	5197,86	5200,72
L-Serine	40494,39	4665,58	30293,34	30816,74
L-Arginine	98796,86	124836,4	63195,35	64801,71
Glycine	292642,5	351257,22	209833,95	215088,32
L-Aspartic Acid	64580,42	58382,38	38424,23	39326,02
L-Glutamic Acid	124801,75	116944,01	79735,54	81921,13
L-Threonin	22413,31	25636,39	18350,45	18809,17
L-Alanine	99949,28	100152,05	69243,27	70885,82
L-Proline	152507,68	167852,48	98509,57	100899,76
L-Cystine	104,46	0	151,16	153,67
L-Lysin HCl	50773,99	44115,62	35123,05	35979,27
L-Tyrosine	8099,12	10911,07	2587,64	2664,54
L-Methionine	11502,7	12961,22	720,07	7467,65
L-Valine	25704	27818,83	18463,63	18881,41
L-Isoleucine	18168,69	20016,06	11224,25	11152,67
L-Leucine	35894,88	39334,27	25821,91	26244,51
L-Phenylalanine	27824,09	38741,48	19095,82	19588,75

Berdasarkan tabel di atas menunjukkan bahwa kadar asam amino paling tinggi yang didapatkan dari sampel 1 sampai dengan sampel 4 adalah asam amino glisin dan prolin yang lebih tinggi. Sedangkan asam amino sistin pada sampel 1 memiliki kadar yang berlebih sebanyak 104,46 mg/kg dibandingkan dengan sampel 2 yang kadarnya tidak ada, dan perbedaan kadar yang didapatkan tersebut kemungkinan bisa dijadikan penanda untuk membedakan antara gelatin sapi dan gelatin babi untuk pengujian lebih lanjut. Pada pengujian asam amino hampir menghasilkan semua jenis asam amino esensial dan nonesensial kecuali asam amino triptofan dan sistein yang tidak dapat

ditentukan. Karena triptofan bersifat tidak stabil dalam kondisi asam dan mengakibatkan rusak pada saat hidrolisis asam, sedangkan pada hidrolisis asam ini juga asparagin dan glutamin dihidrolisis menjadi asam aspartat dan asam glutamat, serin dan treonin dapat dihidrolisis tetapi masih rusak sekitar 10% dan 5% berturut-turut (Fountoulakis, M, & Lahm, H.W, 1998).

Sedangkan pada sampel 3 dan 4 yang masih terdeteksi hasil dari asam amino sistin dan perhitungan kadar yang didapatkan tidak jauh berbeda antara sampel 3 dan 4 yaitu 151,16 mg/kg dan 153,67 mg/kg. Bila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya Fathmah (2014) yang menggunakan metode HPLC dengan sampel 1 yaitu standar gelatin babi, sampel 2 standar gelatin sapi, sampel 3 sampel lembaran cangkang kapsul keras dari standar gelatin babi dan sampel 4 lembaran cangkang kapsul keras dari standar gelatin sapi dan mendapatkan kadar paling tinggi yang sama yaitu asam amino glisin dan prolin dengan masing-masing sebanyak sampel 1 21,944 sampel 2 20,493 sampel 3 7,442 dan sampel 4 7,936. Sedangkan kadar paling tinggi dari asam amino prolin sebanyak sampel 1 10,274 sampel 2 9,542 sampel 3 2,980 dan sampel 4 2,491. Pada penelitian Fathmah (2014) ini juga mendapatkan kadar asam amino sistin sebanyak sampel 1 0,461 sampel 2 0,201 sampel 3 dan sampel 4 hasilnya 0. Perbedaan tersebut kemungkinan bisa disebabkan karena penggunaan sampel 3 dan 4 yang digunakan dari Fathmah (2014) adalah lembaran cangkang kapsul keras dari standar gelatin yang dibuat sendiri sedangkan pada penelitian ini sampel 3 dan 4 adalah cangkang kapsul yang berasal dari produk obat dari pasaran serta asam amino sistin yang sulit dapat ditentukan dan alat yang digunakan berbeda.

E. Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

1. Analisis yang dilakukan dengan metode UPLC baru bisa membedakan komposisi asam amino yang terdapat dalam cangkang kapsul keras dan gelatin yang didapatkan dari pasaran.
2. Analisis yang dilakukan baru bisa membedakan perbedaan komposisi asam amino sistin pada sampel 1 dan 2, tetapi untuk mendeteksi perbedaan antara gelatin sapi dan babi diperlukan penelitian lebih lanjut.
3. Metode yang digunakan jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan metode HPLC hasilnya tidak jauh berbeda meskipun UPLC merupakan pengembangan metode dari HPLC

Saran

1. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut yaitu dengan optimasi preparasi sampel pada metode UPLC karena bisa jadi masih terdapat pengotor yang ikut terbawa dalam sampel.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap cara membedakan gelatin sapi dan gelatin babi pada produk kapsul keras dan gelatin yang diperoleh dari pasaran dengan metode UPLC serta dilakukan dengan variasi sampel lebih banyak.

Daftar Pustaka

- Ansel, H. C. (1989). *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi IV, terjemahan Ibrahim, F., Penerbit Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Bailey, P.D. 1990. *An Introduction to peptide Chemistry*. Wiley Interscience. New York.

- Berg, J.M., John L. Tymoczko, Lubert Stryer. 0-7167-4422-8. Biochemistry fifth edition, U.S.A: W. H. Freeman and Company and Sumanas, Inc.
- Fischer, G., Cao, X, Cox, N., & Francis, M. (2005). The FTIR spectra of glycine and glycyglycine zwitterions isolated in alkali halide matrices. *Journal of Chemical Physics*, 313, 39-49.
- Syafiqoh, Fathmah. 2014. *Analisis Gelatin Sapi dan Gelatin Babi pada Produk Cangkang Kapsul Keras Obat dan Vitamiin Menggunakan FTIR dan KCKT <Skripsi>*
- Fountoulakis, M., & Lahm, H.W. 1998. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 826 (1998) 109-134
- GMIA, 2012 *Gelatin Handbook*, USA: Gelatin Manufacturers Institute of America.
- Hafidz, R.M, Yakooob, R.N, Amin L, C.M, dan Noorfaizan, A. 2011. Chemical and Functional Properties of Bovine and Porcine Skin Gelatin. *International Food Research Journal* 18; 813-817 (2011).
- Kabelova, I., Dvorakova, M., Cizkova, H., Dostalek, P., dan Melzoch, K. 2009. *Determination of free amino acids in cheeses from the Czech market. Czech J. Food Sci.* Vol. 27, 2009, No. 3; 143-150.
- Kealey, D and Haines, P.J, 2002, Instant Notes: *Analytical Chemistry*, BIOS Scientific Publishers Limited, New York
- Lehninger, A. L., 1982. Principles of Biochemistry, diterjemahkan oleh Maggy Thenawidjaya, Jakarta: penerbit Erlangga.
- Miller, J. C., Miller, J. N. 2005 Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry Fifth Edition. Pearson Education Limited. Great Britain.
- R., Ismail, A., dan Che Man, Y.B. 2012. Analytical Methods for Gelatin Differentiation from Bovine and Porcine Origins and Food Products. *Journal of Food Science* Vol. 71, Nr.1 2012.
- Perwitasari,D.S. 2008. Hidrolisis tulang sapi menggunakan HCl untuk pembuatan gelatin. Makalah seminar nasional soebardjo brotohardjono. ISSN 1978-0427.
- Poedjiadji, A. 2009. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.
- Rodwell, Victor W., Kennelly, Peter J., 2000. Proteins:Determination of Primary Structure, dalam Robert K. Murray, Daryl K. Granner, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell, Harper's Illustrated Biochemistry twenty-sixth edition, Amerika Serikat: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., dan Quinn, M. E. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipient Sixth Edition*. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2009.
- Sahilah, A.M., Mohd. Fadly, L., Norrakiah, A.S., Aminah, A., Wan Aida, W.M., Ma'aruf, A.G dan Mohd, Khan, A. 2012. Halal Market Surveillance of Soft and Hard Gel Capsules in Pharmaceutical Products Using PCR and Southern-Hybridation on the Biochip Analysis. *International Food and Research Journal* 19 (1): 371-375 (2012).
- Singht, S., Rao, K.VR., Venugopal, K., Manikandan, R. 2002. *Alteration in Dissolution Characteristics of Gelatin-Containing Formulations; A Review of the Problem. Test Methods, and Solutions*. Pharmaceutical Thecnology April 2002 tersedia online pada www.pharmatech.com.
- Ward,A.G. dan Courts.(1977). "*The Science and Technology of Gelatin*" Academic

Press, New York.

Winarno, F.G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta. PT. Gramedia Pustaka Utama.

Winarno, F.G. 2004. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta. PT. Gramedia Pustaka Utama.

Widyaninggar, A., Triwahyudi., Triyana, K, dan Ab.Rohman. 2012. Differentiation between porcine and bovine gelatin in commercial capsule shell based on amino acid profiles and principal component analysis. *Indonesian J.Pharm* Vol.23 No 2:96-101 ISSN-p : 0126-1037

