



@Hak cipta milik IPB University

PRA-PERLAKUAN HIDROLISIS ENZIMATIK PADA DETEKSI KOLAGEN DENGAN qPCR DAN ATR-FTIR

KHOIROH INDA DINI



**ILMU PANGAN
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2022**



@Hak cipta milik IPBUniversity

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul –Pra-Perlakuan Hidrolisis Enzimatik pada Deteksi Kolagen dengan qPCR dan ATR-FTIR adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2022

Khoiroh Inda Dini
F251180961

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.





RINGKASAN

KHOIROH INDA DINI. Pra-Perlakuan Hidrolisis Enzimatis pada Deteksi Kolagen dengan qPCR dan ATR-FTIR. Dibimbing oleh Dr. Ir. Joko Hermanianto, Prof. Dr. Didah Nur Faridah, S.T.P., M.Si dan Dr. Ir. Mardiah, M.Si

Kolagen memiliki peran penting dalam industri makanan, kosmetik, dan farmasi. Kemungkinan terjadinya kontaminasi dan pencampuran kolagen dari sumber non-halal (seperti kolagen babi) merupakan masalah utama bagi konsumen muslim, sehingga perlu dilakukan pengujian laboratorium. *Quantitative PCR* (qPCR) dapat digunakan sebagai salah satu metode pengujian DNA yang sensitif dan spesifik dalam mendeteksi sumber bahan sampel, tetapi metode ini memiliki kelemahan dalam mendeteksi kolagen karena adanya aktivitas inhibisi yang menghambat proses amplifikasi. Inhibitor tersebut berupa asam amino Gly-Pro-Hyp (glisin-prolin-hidroksiprolin) dengan struktur *triple helix*. Aktivitas inhibisi tersebut dapat dihilangkan, salah satunya dengan hidrolisis enzimatis menggunakan kolagenase dan papain. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi kolagen babi dengan metode qPCR. Tujuan khususnya, yaitu (1) mengevaluasi metode pra-perlakuan dengan hidrolisis enzimatis sehingga hidrolisat kolagen tersebut dapat dianalisis dengan menggunakan qPCR, (2) membandingkan profil gugus fungsional kolagen sebelum dan setelah hidrolisis dengan analisis ATR-FTIR. Secara umum, penelitian ini terdiri dari 3 tahap yaitu (1) hidrolisis dengan enzim sebagai pra-perlakuan (2) identifikasi DNA hidrolisat kolagen dengan metode qPCR secara duplo, (3) deteksi gugus fungsi kolagen sebelum dan setelah hidrolisis menggunakan ATR-FTIR. Terdapat tiga jenis sampel pada penelitian ini, yaitu kolagen babi sebelum hidrolisis, sampel kolagen babi hidrolisis papain dan asam format, serta sampel kolagen babi hidrolisis kolagenase. Tahap hidrolisis sebagai pra-perlakuan dilakukan dengan beberapa konsentrasi enzim, proses hidrolisis papain pada konsentrasi 60 IU dan 100 IU selama 8 jam, sedangkan proses hidrolisis kolagenase pada konsentrasi 50 IU, 100 IU, 300 IU, dan 500 IU selama 18 jam. Sampel kolagen yang berhasil dihidrolisis dan terdeteksi DNA babi, selanjutnya dideteksi menggunakan ATR-FTIR untuk melihat perbedaan gugus fungsi sebelum dan setelah hidrolisis. Analisis data hasil qPCR menggunakan metode deskriptif kuantitatif, sedangkan data hasil FTIR menggunakan metode deskriptif kualitatif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pra-perlakuan hidrolisis kolagenase mulai konsentrasi 300 IU dapat mendeteksi DNA babi pada kolagen dengan nilai Ct FAM (babi) 35,16 dan 34,99 serta IPC sebesar 27,55 dan 27,04. Namun, pra-perlakuan hidrolisis papain pada beberapa konsentrasi belum mampu menghidrolisis kolagen babi dengan baik, sehingga DNA tersebut tidak dapat terdeteksi menggunakan qPCR. Hal ini diduga pada kolagen babi hidrolisis papain masih terdapat inhibitor. Analisis gugus fungsi kolagen babi menggunakan ATR-FTIR menunjukkan bahwa semua sampel (sebelum dan sesudah hidrolisis) mengandung gugus fungsi alkohol, fenol, alkana, dan 1-amina. Daerah serapan Amida A, Amida B, Amida I, Amida II, dan Amida III yang merupakan wilayah khas serapan kolagen, terdeteksi pada sampel sebelum hidrolisis. Sampel kolagen babi setelah hidrolisis papain tidak ditemukan gugus fungsi pada daerah serapan Amida B, sedangkan sampel setelah hidrolisis kolagenase tidak ditemukan gugus

fungsi pada daerah serapan Amida B dan Amida III. Hal tersebut mengindikasikan bahwa inhibitor pada kolagen telah terhidrolisis oleh kolagenase, karena asam amino Gly-Pro-Hyp banyak tersusun dengan adanya atom C-N yang banyak ditemukan pada daerah serapan Amida III.

Kata kunci: ATR-FTIR, hidrolisis kolagen, kolagen babi, kolagenase, qPCR

@Hak cipta milik IPBUniversity

IPBUniversity



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



SUMMARY

KHOIROH INDA DINI. Pre-Treatment of Enzymatic Hydrolysis on Collagen Detection by qPCR and ATR-FTIR. Supervised by JOKO HERMANIANTO, DIDAH NUR FARIDAH, and MARDIAH.

Collagen has a critical role in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. The possible contamination and adulteration of non-halal collagen (such as porcine collagen) is a major issue for Muslim consumers, which could be examined by laboratory testing. Currently, Quantitative PCR (qPCR) can be used as a DNA testing method that is sensitive and specific in detecting the source of the sample material, but this method has a weakness in detecting collagen because it has inhibitory properties, which can inhibit the amplification process. An inhibitor is the Gly-Pro-Hyp (glycine-proline-hydroxyproline) amino acids with a triple helix structure. This inhibitory activity can be removed by enzymatic hydrolysis using papain and collagenase. This study aims to detect the porcine collagen by qPCR method. The specific objectives were (1) to evaluate the pre-treatment method with enzymatic hydrolysis so that the collagen hydrolyzate could be analyzed using qPCR, and (2) to compare the profile of the collagen functional groups before and after hydrolysis using ATR-FTIR analysis. In general, this research consisted of three stages, namely (1) hydrolysis with papain or collagenase as pre-treatment, (2) identification of the DNA hydrolyzate collagen by qPCR method, and (3) detection of collagen functional groups before and after hydrolysis using ATR-FTIR. This experiment used three types of samples: porcine collagen before hydrolysis, porcine collagen hydrolyzed by papain, and porcine collagen hydrolyzed by collagenase. The hydrolysis as pre-treatment was carried out with several concentrations of enzymes, the papain hydrolysis process was carried out at a concentration of 60 IU and 100 IU for 8 hours, while the collagenase hydrolysis process at a concentration of 50 IU, 100 IU, 300 IU and 500 IU for 18 hours. Collagen samples that were successfully hydrolyzed and detected the porcine DNA were then detected using ATR-FTIR to see differences in functional groups before and after hydrolysis. Data analysis of qPCR results used quantitative descriptive methods, while FTIR result used qualitative descriptive methods.

The result showed that pre-treatment of collagenase hydrolysis starting at a concentration of 300 IU could detect porcine DNA in collagen with a Ct FAM (porcine) values of 35,16 and 34,99, and IPC of 27,55 and 27,04 respectively. However, pre-treatment of papain hydrolysis at several concentrations has not been able to hydrolyze porcine collagen, so the DNA could not be detected using qPCR. It is suspected that there are inhibitors in collagen hydrolyzed papain. Analysis of porcine collagen functional groups using ATR-FTIR showed that all samples (before and after hydrolysis) contained alcohols, phenols, alkanes, and 1-amine functional groups. The absorption regions of Amide A, Amide B, Amide I, Amide II, and Amide III which are typical regions of collagen, were found in porcine collagen before hydrolysis. Porcine collagen samples after hydrolysis of papain found no functional groups in the absorption region of Amide B, while samples after hydrolysis of collagenase remove Amide B and Amide III absorption region. This indicates that the inhibitor of collagen in the form of a

triple helix structure has been hydrolyzed and decomposed by collagenase, because the amino acids of Gly-Pro-Hyp are mostly composed of C-N atoms which are found in absorption region of Amide III.

Keywords: ATR-FTIR, Collagenase, Hydrolysis, Porcine collagen, qPCR

@Hak cipta milik IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.





- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2022
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.



@Hak cipta milik IPBUniversity

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



PRA-PERLAKUAN HIDROLISIS ENZIMATIK PADA DETEKSI KOLAGEN DENGAN qPCR DAN ATR-FTIR

KHOIROH INDA DINI

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Ilmu Pangan

**ILMU PANGAN
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2022**



@Hak cipta milik IPBUniversity

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Penguji pada Ujian Tesis: Dr. Dias Indrasti, S.T.P., M.Sc.



@Hak cipta milik IPBUniversity

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Judul Tesis : Pra-Perlakuan Hidrolisis Enzimatik pada Deteksi Kolagen dengan qPCR dan ATR-FTIR
Nama : Khoiroh Inda Dini
NIM : F251180961

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Dr. Ir. Joko Hermanianto



Pembimbing 2:
Prof. Dr. Didah Nur Faridah, S.T.P., M.Si



Pembimbing 3:
Dr. Ir. Mardiah, M.Si



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Ir. Harsi D. Kusumaningrum
NIP 196405021993032004



Dekan Fakultas Teknologi Pertanian:
Prof. Dr. Ir. Slamet Budijanto, M.Agr.
NIP 196607021993021001



Tanggal Ujian:
14 Juli 2022

Tanggal Lulus:

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema penelitian ini adalah pendeteksian kolagen babi, dengan judul -Pra-Perlakuan Hidrolisis Enzimatik pada Deteksi Kolagen dengan qPCR dan ATR-FTIR.

Ungkapan terima kasih disampaikan kepada Ayah (Alm. Choirul Anam), Ibu (Lathifah), serta seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya. Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Dr. Ir. Joko Hermianto, Prof. Dr. Didah Nur Faridah, S.T.P., M.Si dan Dr. Ir. Mardiah, M.Si yang telah membimbing serta banyak memberi saran dan arahan. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. Ir. Made Astawan, MS selaku moderator seminar, Dr. Dias Indrasti, S.T.P., M.Sc selaku penguji luar komisi pembimbing, dan Dr. Nancy Dewi Yuliana, S.T.P., M.Sc selaku perwakilan program studi Ilmu Pangan yang memberikan masukan berharga pada hasil penelitian serta penyusunan tesis ini. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada LPPOM MUI yang telah mendanai penelitian ini. Terima kasih penulis juga disampaikan kepada Raafqi Ranasasmita, S.Si, M.Biomed, Heryani, S.Si, M.TP dan Muhammad Zulkifly beserta staf Laboratorium Halal LPPOM MUI yang telah memberi izin penelitian, membantu proses penelitian ini, serta memberi saran dan semangat. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada teman-teman, kakak-kakak dan civitas akademika program studi Ilmu Pangan serta saudara di kosan pinky yang telah memberi semangat selama pelaksanaan pengerjaan tesis.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2022

Khoiroh Inda Dini



DAFTAR ISI

RINGKASAN	ii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
1.5 Hipotesis	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kolagen	4
2.2 Sumber Kolagen	5
2.3 Hidrolisis Kolagen	6
2.4 Peptida Kolagen dan Gelatin	7
2.5 Status Kehalalan Kolagen	9
2.6 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	10
2.7 FTIR (<i>Fourier Transform Infrared</i>)	10
III METODE	12
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	12
3.2 Alat dan Bahan	12
3.3 Prosedur Kerja	12
3.4 Analisis data	14
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Deteksi Kolagen dan Hidrolisat Kolagen Menggunakan qPCR	15
4.2 Analisis Gugus Fungsi Kolagen dan Hidrolisat Kolagen Menggunakan ATR-FTIR	18
V SIMPULAN DAN SARAN	24
5.1 Simpulan	24
5.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	30
RIWAYAT HIDUP	33



DAFTAR TABEL

1	Beberapa penelitian hidrolisis menggunakan enzim	6
2	Perbedaan gelatin dan kolagen (Liu <i>et al.</i> 2015; Gelatin Manufacturers Institute of America 2019)	9
3	Beberapa penelitian daerah bilangan gelombang daging dan turunannya	11
4	Hasil Pengujian DNA Sampel Kolagen Babi	16
5	Rangkuman Puncak Serapan Kolagen Babi Sebelum dan Setelah Hidrolisis Kolagenase	21
6	Rangkuman Puncak Serapan Kolagen Babi Setelah Hidrolisis Papain	22

DAFTAR GAMBAR

7	Struktur kolagen (a) struktur primer; (b) struktur sekunder dan tersier; (c) struktur kuartener (Hashim <i>et al.</i> 2015)	4
8	Struktur kolagen (Shayegan <i>et al.</i> 2013)	7
9	Kurva Amplifikasi Hasil qPCR (a) Sebelum Hidrolisis; (b) Setelah Hidrolisis Papain 100 IU; (c) Setelah Hidrolisis Kolagenase 300 IU	17
10	Perbandingan Kolagen Babi Sebelum dan Setelah Hidrolisis Kolagenase (a) Sebelum Hidrolisis; (b) Hidrolisis Kolagenase 60 IU; (c) Hidrolisis Kolagenase 100 IU; (d) Hidrolisis Kolagenase 200 IU; (e) Hidrolisis Kolagenase 300 IU	19
11	Perbandingan Spektrum FTIR Kolagen Babi (a) Sebelum Hidrolisis; (b) Setelah Hidrolisis Kolagenase 300 IU	20
12	Spektrum FTIR Kolagen Babi Setelah Hidrolisis Papain 200 IU	22

DAFTAR LAMPIRAN

13	Lampiran 1 Keterangan Produk Kolagenase	31
14	Lampiran 2 Bahan dan Alat yang digunakan	32

Hak Cipta Ditindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.