

LAPORAN
WORKSHOP OFFLINE PROTEOMICS AND BIOINFORMATICS
APPROACH

HALAL APPLICATION WITH LIQUID CHROMATOGRAPHY -
HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY (LC-HRMS)

Malang, 24 s/d 25 November 2021

Pusat Pengkajian Halal Lab. Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya

Oleh

SEPRIANTO, S.Pi, M.Si



UNIVERSITAS ESA UNGGUL
PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI

2021

PENDAHULUAN

Makanan halal merupakan suatu hal yang sangat penting untuk diperhatikan oleh masyarakat muslim Indonesia. Makanan halal harus terbebas dari kandungan babi baik sebagai bahan dasar maupun dalam proses pembuatannya. Permasalahan kehalalan timbul ketika terdapat proses pencampuran daging atau lemak babi (adulterasi) pada daging hewan halal untuk tujuan ekonomis. Kadar presentasi campuran daging babi yang kecil juga menyulitkan untuk mendeteksi dengan akurat sehingga perlu analisis yang tepat dan akurat untuk melihat kandungan material babi pada produk pangan, kecantikan maupun produk lainnya seperti gelatin babi, minyak babi, daging babi maupun ingridien lainnya yang berasal dari non halal.

Dalam Islam Halal dan haram diatur dalam surat surat Al Baqarah ayat 172 sampai 176

تَعْبُدُونَ إِلَهًا كُنْتُمْ لِنِّ اللَّهِ وَاشْكُرُوا رَزَقَكُمْ مَا طَيَّبْتُمْ مِنْ كُلِّهَا أَمْثَلُ الَّذِينَ يَأْتِيهَا

Artinya: Wahai orang-orang yang beriman! Makanlah dari rezeki yang baik yang Kami berikan kepada kamu dan bersyukurlah kepada Allah, jika kamu hanya menyembah kepada-Nya (172)

اللَّهُ إِنَّ ۗ عَلَيْهِ إِمْتٌ فَلَا عَادٍ وَلَا بَاغٍ غَيْرَ اضْطُرُّ فَمَنْ ۗ اللَّهُ لَغَيْرِ بِهِ أَهْلًا وَمَا الْخَنزِيرُ وَلَحْمٌ وَالذَّمَّ الْمَيْتَةَ عَلَيْكُمْ حَرَّمَ إِنَّمَا
١٧٣ - رَجِيمٌ غَفُورٌ

Artinya: Sesungguhnya Dia hanya mengharamkan atasmu bangkai, darah, daging babi, dan (daging) hewan yang disembelih dengan (menyebut nama) selain Allah. Tetapi barangsiapa terpaksa (memakannya), bukan karena menginginkannya dan tidak (pula) melampaui batas, maka tidak ada dosa baginya. Sungguh, Allah Maha Pengampun, Maha Penyayang.

Produk berbahan dasar babi tidak hanya menjadi sumber utama daging dalam rantai pasok makanan global tapi bagian lain dari hewan yang tidak dapat dimakan seperti kulit dan tulang juga diproses menjadi bahan kimia yang sangat fleksibel yang disebut gelatin. Gelatin terdiri dari campuran peptida dan protein yang diperoleh dari hidrolisis permanen kolagen, protein utama pada kulit dan tulang hewan. Meskipun dapat berasal dari berbagai produk sampingan hewan, itu terutama bersumber dari daging babi karena alasan ekonomi. Dikenal sebagai salah satu pengubah makanan dan kimia yang paling fleksibel, gelatin bersifat tembus cahaya, tidak berwarna, rapuh, dan tanpa rasa dalam hal sifat fisiknya. Berbagai fungsi gelatin termasuk menstabilkan, mengikat, mengentalkan, mengemulsi, membuat plastik dan berbusa, menghasilkan area aplikasi yang luas termasuk pengolahan makanan, farmasi, kosmetik, fotografi, dan pencetakan. Aplikasi gelatin yang begitu luas terutama dalam berbagai produk makanan dan kosmetik merupakan penyebab keprihatinan besar bagi konsumen Muslim. Kekhawatiran ini menyebabkan perlunya metodologi

pengujian yang efektif untuk mendeteksi gelatin babi dalam berbagai produk. Karena spektrometri massa (MS) dianggap sebagai standar emas dalam penelitian protein, MS juga digunakan sebagai metode untuk mendeteksi protein penanda yang mendukung identifikasi jaringan hewan dan gelatin. Metode baru ini adalah teknik yang akurat untuk menentukan keaslian dan komposisi daging dan gelatin menggunakan Orbitrap™ HRMS resolusi tinggi yang canggih. Karena spektrometri massa (MS) dianggap sebagai standar emas dalam penelitian protein, MS juga digunakan sebagai metode untuk mendeteksi protein penanda yang mendukung identifikasi jaringan hewan dan gelatin. Metode baru ini adalah teknik yang akurat untuk menentukan keaslian dan komposisi daging dan gelatin menggunakan Orbitrap™ HRMS resolusi tinggi yang canggih.

Hasil pengkajian menunjukkan bahwa metode deteksi lain yang dapat digunakan yaitu metode analisis PDK (Pork Detection Kit) dan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) untuk mendeteksi protein babi. Metode RTPCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) dan duplex droplet digital PCR untuk mendeteksi DNA babi. Metode gas chromatography (GC), spektroskopi UV-Vis serta spektroskopi Fourier-transform infrared (spektroskopi FTIR) untuk analisis lemak babi. Metode duplex droplet digital PCR (dddPCR) memiliki kemampuan yang sangat spesifik untuk mendeteksi kandungan babi dalam produk pangan olahan dibandingkan dengan metode yang lain. Sistem deteksi dan kuantifikasi dddPCR cocok digunakan untuk kontrol kualitas dan analisis rutin produk daging. Hal ini dapat dijadikan pertimbangan untuk pengembangan metode penelitian untuk mendeteksi kandungan babi pada produk olahan pangan yang lebih efektif dan efisien di masa yang akan datang. Namun Metode analisis halal Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and westernblot analysis PCR dan Real-Time PCR Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) memiliki beberapa kekurangan, Sebagian besar kualitatif dan Tidak bisa digunakan (PCR untuk gelatin?) Data tidak dapat dieksplorasi lagi untuk data mining. Sehingga dengan menggunakan *LC-Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)* akan memberikan hasil yang akurat.

TUJUAN

1. Workshop ini bertujuan untuk memudahkan dalam deteksi kandungan babi pada suatu produk makanan, kosmetik dan produk komersil lainnya secara akurat
2. Peserta dapat Hands On (Langsung praktek) dalam preparasi sampel, injeksi ke instrument LC-HRMS
3. Peserta dapat melakukan analisis proteomics dengan pendekatan bioinformatika

PELAKSANAAN

Waktu dan tempat

Workshop dilaksanakan pada:

- Hari dan tanggal : Rabu – Kamis, 24 – 25 November 2021
- Waktu : 08.00 WIB – selesai
- Lokasi : Lab. Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya
- Jl. Mayjen Haryono 169, Lowokwaru, Malang 65145, Jawa Timur - Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur

Peserta Workshop

Peneliti dan Teknisi Pusat Pengkajian Halal Universitas, Badan POM, LIPI, Labkesda serta Dosen dan peneliti dalam bidang Keamanan Pangan dan Bioteknologi.

Rincian kegiatan

Kegiatan 1. Procine Gelatine and Meat Detection Using LC-Orbitrap HRMS for Halal Application

Materi ini berkaitan studi pengenalan instrument yang bekerja dengan prinsip cromatography seperti *LC-Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)* aplikasi dalam deteksi halal. Karakteristik produk non halal dan turunannya seperti gelatin, analisis data proteomics, serta Metode deteksi Halal lainnya seperti menggunakan metode RT-PCR, FTIR, SDS PAGE.

Narasumber: Hendy Dwi Warmiko, S.Si., (Sales Support Supervisor at PT. Genecraft labs)

Kegiatan 2. Basic Theory of Proteomics MS

Materi ini mencakup tentang Proteomics yang meliputi kajian secara molekular terhadap keseluruhan protein yang dihasilkan dari ekspresi gen di dalam sel, terutama mengenai struktur dan fungsinya. Beberapa jenis metode yang dikembangkan untuk mempelajari protein, Metode analisis proteomic dengan Kromatografi cair berperforma tinggi (HPLC) juga dapat digunakan di mana sampel yang digunakan diinjeksikan ke dalam kolom bertekanan tinggi dan protein yang terkandung di dalamnya akan berikatan dengan matriks yang ada.

Narasumber: Prof Widodo S.Si, M.Si, Ph.D.Med.Sc. (Dekan Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya)

Kegiatan 3.Hands On Lab

Praktek secara langsung dengan beberapa tipe sampel diantaranya daging babi, gelatin babi, gelatin sapi dan vitamin dari soft gel) merk LN. pemakain berbagai jenis sampel ini bertujuan untuk menaargetkan protein spesifik dari masing masing sampel dengan kandungan kadar terkecil seklaipun. Teknik preparasi sampel mulai dari ekstraksi, homogenasi, sonifikasi, sentrifugasi, suspensi, presifitasi dan ijeksi ke alat LC-HRMS.

Rundown Acara

Pelaksanaan, Hari pertama, 24 November 2021

NO	WAKTU	KEGIATAN	PEMATERI
1	08.30 – 09.00	Registrasi & Pengkondisian peserta memasuki ruangan	Panitia
2	09.00 – 09.15	Pembukaan	Dr. Ir. Osfar Sjofjan, M.Sc., IPU., ASEAN Eng. (Kepala Deputi Lingkungan, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya)
3	09.00 – 10.00	Basic Theory of Proteomics MS	Prof Widodo S.Si, M.Si, Ph.D.Med.Sc. (Dekan Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya)
4	10.00 – 10.15	Diskusi	-
5	10.15 – 11.45	Procine Gelatine and Meat Detection Using LC-Orbitrap HRMS for Halal Application	Hendy Dwi Warmiko, S.Si., (Sales Support Supervisor at PT. Genecraft labs)
6	11.45 – 12.00	Briefing Hands-on Practice	Panitia
7	12.00 – 13.00	Ishoma & Lunch	-
8	13.00 – 14.00	Hands-on Practice (Deteksi Gelatin Babi pada Bahan Pangan)	Hendy Dwi Warmiko, S.Si., (Sales Support Supervisor at PT. Genecraft labs)

9	14.00 – 14.30	Coffee Break	Panitia
10.	14.30 - 16.00	Melanjutkan Hands-on Practice (Deteksi Gelatin Babi pada Bahan Pangan)	Hendy Dwi Warmiko, S.Si. , (Sales Support Supervisor at PT. Genecraft labs)

Hari kedua, 25 November 2021

NO	WAKTU	KEGIATAN	PEMATERI
1	08.30 – 09.00	Registrasi & Pengkondisian peserta memasuki ruangan	Panitia
2	09.15 – 12.00	Hands-on Practice (Deteksi Gelatin Babi pada Bahan Pangan)	Hendy Dwi Warmiko, S.Si. , (Sales Support Supervisor at PT. Genecraft labs)
3	12.00 – 13.00	Ishoma & Lunch	-
4	13.00 – 14.30	Analisis Data Hasil Hands On Practice LC-HRMS	Hendy Dwi Warmiko, S.Si. , (Sales Support Supervisor at PT. Genecraft labs)
5	14.30 – 15.00	Coffee Break	Panitia
6	15.00 – 16.00	Diskusi Hasil Hands On Practice LC-HRMS	Hendy Dwi Warmiko, S.Si. , (Sales Support Supervisor at PT. Genecraft labs)
7	16.00 -16.15	Penutupan Rangkaian Acara Workshop & Hands-On Practice on Proteomics and Bioinformatics Approach for Halal Application with Liquid Chromatography- High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)	Panitia dan Peserta

Pendaftaran

Pendaftaran dapat dilakukan melalui formulir online bit.ly/proteomik2021 dengan Biaya pendaftaran sebesar Rp 1.500.000. Peserta akan mendapatkan konsumsi, seminar kit, dan sertifikat.

Panitia pelaksana

- INBIO dan Pusat Pengkajian Halal Universitas Brawijaya
-

Output dan Outcome

Output

Peserta diharapkan setelah mengikuti pelatihan ini dapat memahami prinsip kerja dari instrument LC-HRMS yang diaplikasikan untuk menargetkan protein spesifik dengan kadar kecil, dalam hal ini untuk deteksi halal serta mampu melakukan preparasi dari berbagai tipe sampel (produk) yang tercampur babi dan produk turunannya.

Outcome

Dapat memberikan practice dan hands on dalam deteksi halal dengan metode chromatography menggunakan LC-HRMS.

Penutup

Demikian Term of Reference ini dibuat sebagai panduan kegiatan. Semoga dapat memberikan informasi bagi pihak-pihak yang terkait.

Ringkasan Materi:

1. Defenisi Halal

Halal adalah istilah Arab dan dalam Al-Quran yang artinya diizinkan, disetujui, diperbolehkan. Hal ini merujuk pada makanan atau produk-produk yang boleh dikonsumsi oleh umat muslim. Halal juga dapat diekspresikan sebagai sesuatu yang diperbolehkan untuk dikonsumsi². Istilah halal juga digunakan sehubungan dengan adanya izin untuk memakan dan mengonsumsi barang-barang yang lainnya.

Pedoman tentang halalnya suatu makanan dijelaskan oleh Allah di dalam Al-Quran Surah Al-Maidah ayat 3 yang artinya “Terlarang bagimu (untuk memakan) bangkai, darah, daging babi, (daging hewan) yang disembelih atas nama selain Allah, ...” Haram adalah kebalikan dari halal sedangkan syubhat berarti ragu atau kecurigaan.

Makanan dan bahan-bahan yang dianggap haram untuk dikonsumsi umat muslim dapat diklasifikasikan dalam empat jenis antara lain yaitu bangkai, babi dan turunannya, alkohol dan turunannya serta darah dan turunannya. Selain itu, makanan yang terkontaminasi dengan produk-produk yang tersebut juga haram untuk dikonsumsi. Ketersediaan pangan yang aman, bergizi, dan sesuai dengan daya beli masyarakat serta tidak bertentangan dengan nilai-nilai agama, budaya maupun keyakinan seseorang adalah hak warga negara yang dijamin oleh Undang-Undang Dasar 1945 dan Undang-Undang Perlindungan Konsumen Nomor 8 Tahun 1999. Menurut keputusan Menteri Agama RI No. 581 Tahun 2001 definisi pangan halal adalah pangan yang tidak mengandung unsur atau bahan haram atau dilarang untuk dikonsumsi umat Islam, dan pengolahannya tidak bertentangan dengan syariat Islam.

Seiring dengan semakin bervariasinya produk makanan yang beredar di pasaran. Baik produk dalam negeri maupun impor dari luar negeri satu sisi memberikan kebebasan bagi konsumen untuk memilih produk makanan sesuai dengan keinginan. Namun, kemajuan teknologi industri makanan semakin banyak memperkenalkan kerumitan bahan baku dan produk olahannya di pasaran. Sehingga terdapat kesulitan untuk mengidentifikasi atau melacak asal bahan suatu produk makanan. Meskipun, pembuatan produk tersebut sudah menggunakan teknologi modern, tetapi masih memungkinkan adanya pencampuran bahan baku atau bahan-bahan lain yang berasal dari sumber yang tidak halal seperti produk dari babi dan turunannya.

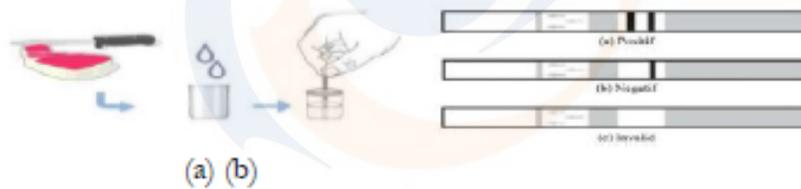
2. Metode Pengujian Halal

Identifikasi dan proses verifikasi bahan dalam suatu produk olahan makanan adalah sebuah langkah yang harus dilakukan untuk menjamin hak-hak konsumen. Keaslian suatu bahan dan memastikan bahwa bahan tersebut berasal dari sumber yang halal menjadi tujuan dari metode-metode deteksi makanan halal saat ini. Pengujian keaslian dan teknik analisis telah mengalami perkembangan yang sangat pesat. Masing-masing teknik dikembangkan secara spesifik dan disesuaikan untuk menangani masalah tertentu. Teknik yang paling cocok untuk sampel tertentu sering ditentukan berdasarkan sifat sampel itu sendiri, misalnya apakah itu mentah atau dimasak, makanan utuh atau bentuk padat, padat semi-padat atau cair.

Adanya keharusan untuk mendapatkan sertifikasi halal bagi suatu produk makanan atau minuman memiliki tujuan untuk memastikan kualitas dan mengurangi informasi palsu pada label suatu produk. Otentikasi adalah proses dimana makanan diverifikasi sesuai dengan deskripsi labelnya. Ada banyak metode analisis yang saat ini digunakan untuk mendeteksi otentikasi makanan halal antara lain yaitu metode analisis *Pork Detection Kit (PDK)*, *EnzymLinked Immunosorbent Assay (ELISA)*, *Real-Time Polymerase Chain Reaction DNA (RTPCR)*, *duplex droplet digital PCR (dddPCR)*, *Gas Chromatography (GC)*, *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometri (GC-MS)*, *Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR)*, *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, *Proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR) Spectroscopy*.

2.1 Pork Detection Kit (PDK)

Pork Detection Test/Porcine Test merupakan uji cepat immunochromatographic (lateral flow) yang digunakan untuk pengujian kualitatif atau semi-kuantitatif penentuan antigen daging babi. Pork Detection Test/Porcine Test adalah metode berbasis protein yang berdasarkan pada ikatan antibodi-antigen. Kelemahan metode berbasis protein adalah sifat protein yang tidak stabil terhadap panas dan perlakuan lain. Proses kerja dari Pork Detection Test/Porcine Test yaitu antigen dari sampel akan terikat oleh antibodi spesifik yang melekat pada warna partikel mikro selanjutnya mengalir ke garis tes dan bercampur dengan antibodi babi hingga membentuk garis berwarna yang menunjukkan hasil positif. Prosedur pengujian dan interpretasi hasil ditunjukkan pada gambar 1



Gambar 1. (a) prosedur pengujian dan (b) interpretasi hasil pengujian menggunakan Pork Detection Test/Porcine Test

2.2. Spectrometry

1) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) digunakan untuk identifikasi spesies dan untuk melihat profil protein. Teknik ini memiliki kelebihan yaitu handal, hemat biaya, sederhana, dan lebih cepat daripada fenotipik dan metode molekul konvensional untuk identifikasi patogen manusia. Asal usul daging (babi, sapi, kuda, sapi dan ayam) dan gelatin (daging babi atau sapi) dapat diketahui menggunakan metode MALDI TOFMS. Berdasarkan penelitian mereka MALDI-TOF-MS mampu mendeteksi hingga 1% gelatin dalam permen dan mendeteksi hingga 20% gelatin babi dalam gelatin daging sapi. Hal ini, membuktikan bahwa metode ini berpotensi untuk penelusuran daging dan kolagen yang sistematis dan rutin.

2) Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR)

Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR) adalah teknik yang digunakan untuk memperoleh spectrum inframerah dari penyerapan, emisi, fotokonduktivitas atau raman hamburan benda padat, cair atau gas. Analisa dengan menggunakan FTIR dapat digunakan untuk mengetahui kehalalan suatu produk makanan dengan melihat pola spektrum pada lemak hewannya. Hasil dari FTIR bisa menjelaskan kelompok fungsional produk sampel. Berbagai teknik FTIR diaplikasikan termasuk spektroskopi inframerah-dekat (14.000 hingga 4000 cm^{-1}) (NIR), spektroskopi inframerah-tengah (4000 hingga 400 cm^{-1}) (MIR) dan spektroskopi inframerah-jauh (ATR) (400 hingga 50 cm^{-1}). Spektroskopi MIR dan NIR paling umum digunakan, sedangkan ATR digunakan sebagai analisis lanjutan untuk mendeteksi kontaminan makanan karena persiapan sampel yang lebih sedikit

2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknologi dalam bidang biologi molekuler yang digunakan untuk memperbanyak salinan sepotong DNA di bagian tertentu sehingga menghasilkan ribuan hingga jutaan salinan dari urutan DNA tertentu. PCR adalah teknik penggandaan atau amplifikasi sekuen DNA spesifik secara invitro dengan jalan polimerisasi secara simultan dengan primer yang komplementer dengan untai DNA target. Primer adalah sekuen oligonukleotida pendek biasanya tersusun atas 20 pasang basa yang berfungsi sebagai pemula sintesis rantai DNA dalam reaksi PCR. Teknik PCR melibatkan tiga tahap yaitu denaturasi, penempelan primer (annealing), dan pemanjangan (elongation). Pada siklus pertama, DNA cetakan dipisahkan menjadi dua untai tunggal dengan pemanasan 95 °C di dalam campuran yang mengandung oligonukleotida primer dengan jumlah berlebih serta keempat dNTP. Suhu ini kemudian dikurangi menjadi 55 °C, untuk memberi kesempatan primer menempel (anneal) pada sekuen target. Primer akan membentuk ikatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Suhu penempelan tergantung pada panjang primer dan sekuen DNA targetnya. Setelah penempelan primer, suhu inkubasi dinaikkan menjadi 72 °C untuk proses perpanjangan (extension) sekuen DNA target. Proses perpanjangan ini dapat terjadi karena enzim DNA polimerase. Produk pertama dari hasil amplifikasi akan berfungsi sebagai cetakan untuk siklus kedua, demikian seterusnya. Apabila siklus denaturasi, penempelan primer dan pemanjangan diulang-ulang maka DNA target akan dilipatgandakan. Produk utama yang dihasilkan adalah segmen DNA untai ganda yang panjangnya ditentukan oleh jarak antara kedua primer.

2.4. Chromatography

Gas Chromatography (GC)

Gas chromatography (GC) juga dikenal sebagai vapour phase chromatography (VPC). Gas chromatography (GC) memberikan waktu analisis yang lebih singkat dan suhu elusi sampel lebih rendah karena laju aliran yang lebih tinggi dan berat molekul yang lebih rendah. Adanya pemalsuan makanan terutama dalam miyak, lemak dan alkohol telah menjadi masalah bagi konsumen muslim. Teknik ini mendeteksi pemalsuan dengan membandingkan waktu retensi dan daerah puncak asam lemak yang telah diderivatisasi menjadi metil asam lemak ester terhadap standar yang sesuai. Struktur dan komposisi asam lemak dalam lemak dan minyak dapat digunakan sebagai indikator dalam penentuan sumber lipid. Selain itu, kromatografi gas dapat digunakan untuk melihat profil metabolik alkohol yang berasal dari berbagai sumber karena minuman beralkohol sering digunakan sebagai bahan untuk penyedap rasa dan pengawet dalam industri makanan. Seperti yang kita ketahui dalam hukum islam bahwa lemak babi, babi dan

alkohol dilarang untuk dikonsumsi oleh umat islam. Oleh karena itu, pengembangan teknik GC menggunakan berbagai detektor sangat diminati dalam otentikasi makanan halal untuk mengidentifikasi adanya alkohol dan sumber lipid dalam makanan.

Gas Chromatography-Mass Spectrophotometri (GC-MS)

Gas Chromatography-Mass Spectrophotometri (GC-MS) dapat digunakan untuk menganalisa kehalalan suatu produk pangan yang mengandung lemak hewani khususnya lemak babi yaitu dengan mengubah asam lemak suatu sampel menjadi derivat esternya yang selanjutnya dianalisa dengan menggunakan GC-MS

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) adalah teknik modern yang secara luas digunakan untuk pemisahan analitik dan preparative senyawa yang terkandung dalam suatu campuran. Aplikasi untuk analisis kontaminan atau deteksi pemalsuan dalam makanan telah banyak dilakukan karena teknik ini memiliki banyak keunggulan. Salah satu keunggulannya adalah dapat memisahkan komponen sampel yang tidak mudah menguap menjadi dapat dipisahkan dengan mudah oleh HPLC, selain itu teknik ini berlaku untuk senyawa yang sangat polar, masa molekul yang tinggi, komponen yang sangat ionik dan tidak stabil secara termal dalam sistem pangan. Keuntungan lain dari HPLC adalah bahwa derivatisasi analit tidak diperlukan se sering dalam analisis kromatografi gas. Tabel 4 menunjukkan beberapa otentikasi halal dalam produk makanan

Tabel 4. Analisis metode HPLC untuk otentikasi halal dalam produk makanan.

Kasus	Jenis makanan	Hasil analisis	Referensi
Babi dan lemak babi (<i>pork and lard</i>) Daging babi (<i>pork</i>)	Kulit atau produk segar dari sapi, kambing, dan babi serta beberapa produk olahan makanan	Profil dari <i>triglyceride</i> babi berbeda dengan sapi atau kambing. Lemak babi memiliki <i>triglyceride</i> yang banyak dibandingkan daging yang lain.	Saeed et al. (1989)
	Produk olahan makanan dari daging babi, kambing, ayam, dan lemak kalkun	Mendeteksi lemak dari makanan olahan, pemisahan <i>triglyceride</i> dan menji keaslian dan adanya pencampuran pada suatu produk	Rashood et al. (1995)

Liquid Chromatography -High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)

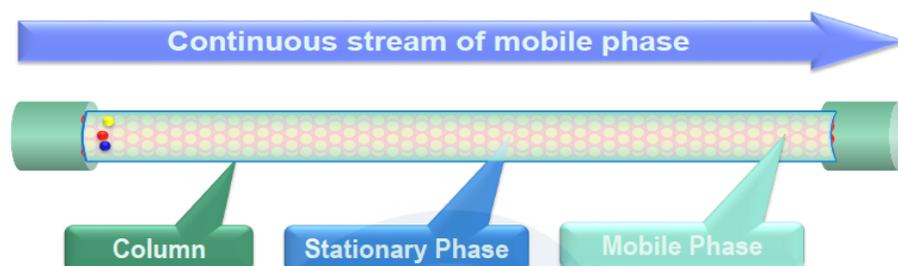
Liquid Chromatography -High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) adalah metode untuk identifikasi simultan (protein) dan kuantifikasi stimulan (efedrin, kafein, obat anoreksia seperti phentermine, phendimetrazine, phenmetrazine, fenfluramine, benfluorex, mephentermine, fencanfamine, sibutramine) dan PDE5I (sildenafil, vardenafil dan tadalafil) dalam suplemen makanan menggunakan spektrometer massa Orbitrap benchtop. Proteomics merupakan keseluruhan protein dalam sel, jaringan dan cairan pada tubuh organisme dalam waktu tertentu. Identifikasi proteomics yang paling akurat dapat menggunakan LC-HRMS. Sebagai contoh protein dalam darah dapat teridentifikasi 10000 protein yang terhubung dalam ikatan peptide. LC-HRMS dapat membaca target protein dalam bentuk urutan peptide dari asam amino yang menyandi protein tersebut. Dalam proses identifikasi protein yang dihasilkan dapat di aligment dalam sequence database protein dalam bentuk FASTA pada database SWISS Prot/ PDB.

Chromatography metode dalam pemisahan analit yang bercampur.



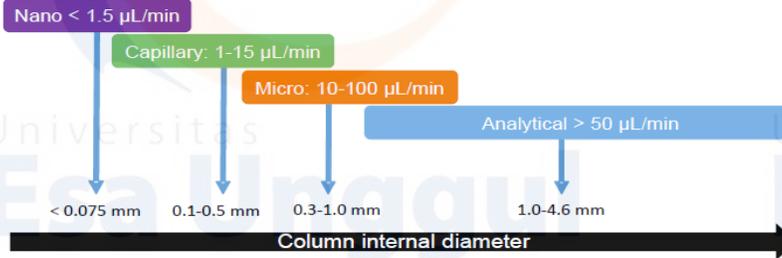
- Separation is achieved by creating a two-phase partitioning system in which the analytes migrate differently based on their affinity to one phase.
- Partitioning happens by interaction of analyte with:
 - Mobile phase → transports the analyte
 - Stationary phase → retains the analyte
- Common forms are:
 - **Column** chromatography, e.g. Gas and Liquid chromatography
 - **Planar** chromatography, e.g. Thin layer chromatography

The Column and the Chromatographic Process



- The stationary phase retains analytes due to various affinity interactions.
- When different chemical components pass through the column at different rates they become separated in single zones.

What is Low-Flow LC?



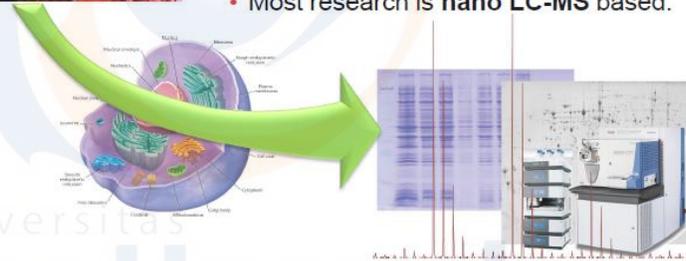
Comparing nanoLC to Analytical flow, several key differences are present:

200-300 nL/min	Typical flow rate	450 $\mu\text{L}/\text{min}$
> 1 hour	Typical gradient length	< 1 hour
> 100	Typical number of targets	< 100

What is Proteomics?

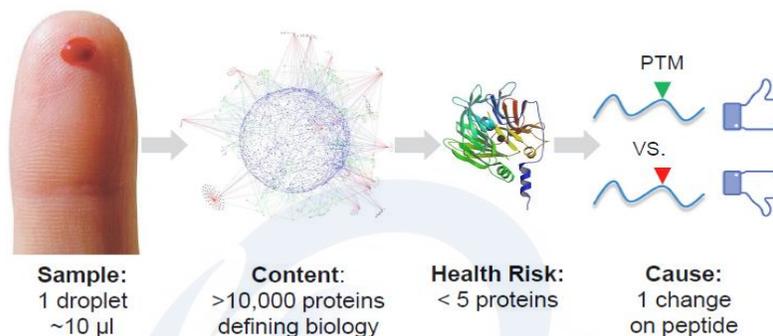


- **Proteomics:** the study of proteins of a cell, tissue, body fluid or organism at a given time.
- Focus on **protein** structures, functions and interactions, often specific to disease.
- Most research is **nano LC-MS** based.



LC-HRMS in Proteomics

LC-HRMS most commonly applied in proteomics



Analytes of interest are proteins, peptides or PTMs

Increased Sensitivity with low-flow LC

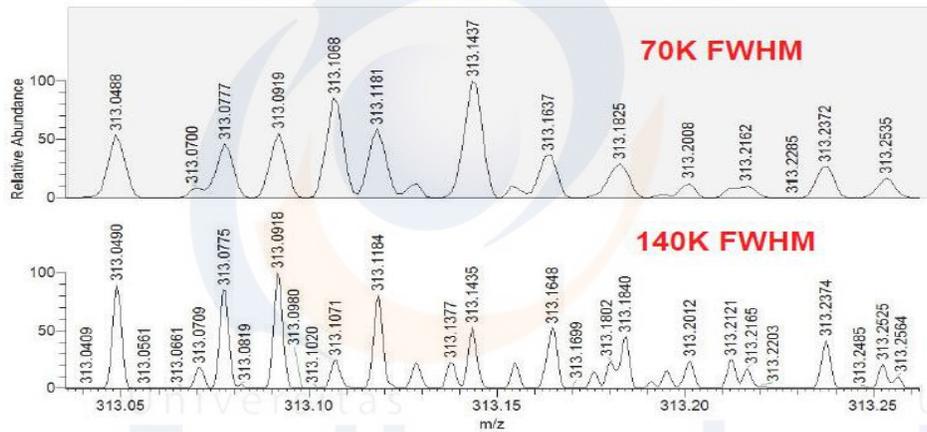
- **Smaller column ID:**
 - Increased sensitivity
 - Increased resolution and reduced peak width
- **Longer columns available:**
 - Increased theoretical plate number
 - Increased resolution
- **Smaller electrospray droplets**
 - improved ion evaporation → less background ions
 - **Better signal/noise ratio → sensitivity increase**
- **Reduced solvent consumption**
 - Green technology
 - Reduced running costs
 - Reduced waste disposal costs



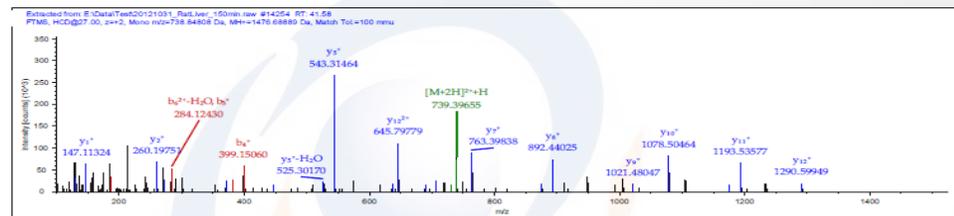
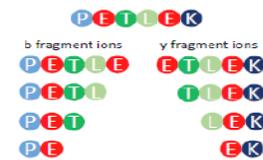
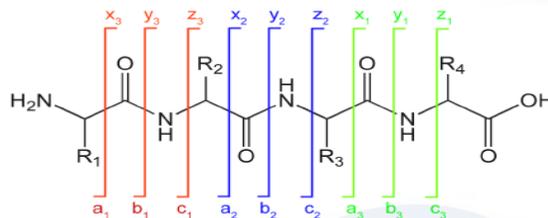
nanoViper 75 cm; 75 μ m C18, 2 μ m, 100 Å
Longest commercial column available
PN 164939

Mass Resolution: The Most Direct Approach to Deal with Complexity

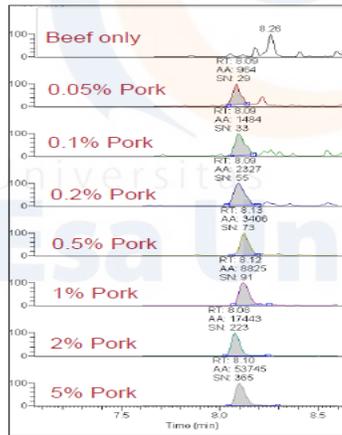
Protonated AFB1: $C_{17}H_{13}O_6$; $m/z = 313.071215$



Peptide Fragmentation by MS/MS

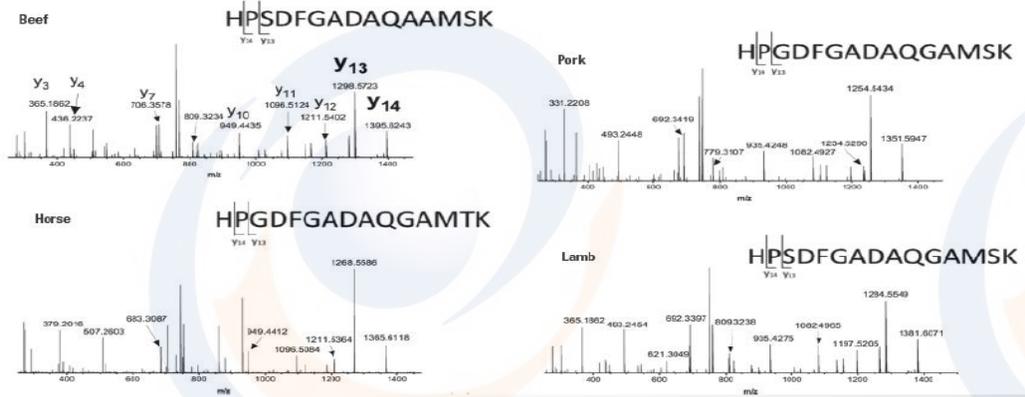


XIC of Peptide Marker in Pork-Beef Mixtures



- The identified peptide is unique for porcine meat and does not observe in beef.
- Porcine meat can be detected at 0.05% spike level in cooked pork.
- Consistent retention time (8.10±0.03 min) and narrow peak width were achieved.

Peptide Marker in Pork-Beef Mixtures

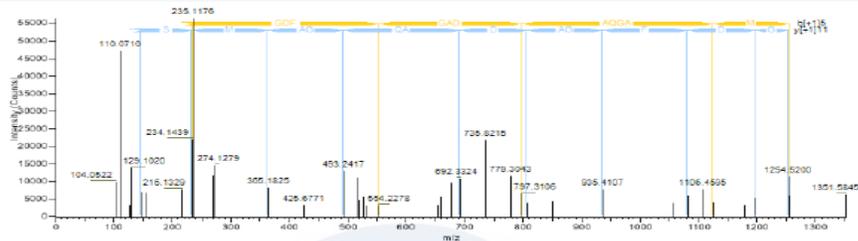


Peptide Marker in Pork-Beef Mixtures

Accession	Description
P02189	Myoglobin OS=Sus scrofa OX=9823 GN=MB PE=1 SV=2

Sequence: HPGDFGADAQGAMSK

Charge: -2, Monoisotopic m/z: 744.82623 Da (-4.21 mnu/-5.65 ppm), MH+: 1488.64519 Da, RT: 11.5110 min,



	(NH3)+	P>	<G	G>	<D	D>	<F	F>	G>	A>	D>	A>	Q>	G^
b (-1)	136.05519	235.11596	292.14043	407.16738	554.23593	611.25727	682.29439	797.32134	863.35846	995.41704	10			
b (+1)	121.03964	218.09241	275.11398	390.14083	537.20525	594.23072	665.26784	780.29479	851.33191	979.39049	10			
b (-1)	120.05562	217.10039	274.12966	389.15681	536.22523	593.24670	664.28382	779.31077	850.34789	978.40647	10			
y (+1)	1351.59478	1254.54201	1197.52054	1082.49359	935.42517	878.40370	807.38658	692.35963	621.30251	493.24393	4			
y (-1)	1334.56823	1237.51546	1180.49399	1065.46704	918.39962	861.37715	790.34003	675.31308	604.27596	476.21738	4			

H[P]G[D]F]G A[D]A Q]G A]M]S]K

Other Peptide Marker in Pork-Beef Mixtures

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Species	Protein	Uniprot Accession Number	Peptide Sequence	AA Position	Theoretical Mass (z = 2)	Observed Mass (z = 2)	Mass Accuracy (ppm)	R_p (min)
Beef	Myosin-1	Q9BE40	TLALLFSGPASGEAEGGPK	619-637	901.4702	901.4694	-0.89	16.8
Horse	Myosin-1	Q8MJV0 T	LALLFSGPASDAEAGGK	619-637	888.4623	888.4620	-0.34	17.0
Pork	Myosin-1	Q9TV61	TLAFLFTGAAGADAEGGGK	619-638	912.9600	912.9594	-0.66	17.4
Lamb	Myosin-1	XM_004012706.1 (RefSeq)	TLAFLFSGAASAEAEAGGAK	619-638	927.9652	927.9650	-0.21	17.6
Beef	Myosin-2	Q9BE41	TLAFLFSGTPTGDSEASGGTK	619-639	1022.4971	1022.4968	-0.29	16.4
Horse	Myosin-2	Q8MJV1	TLALLFSGAQADAEAGGK	617-636	960.5073	960.5070	-0.31	17.0
Pork	Myosin-2	Q9TV63	TLAFLFSGAQ TGEAEAGGK	619-638	978.4891	978.4894	-0.31	17.1
Lamb	Myosin-2	XM_004012707.1 (RefSeq)	TLALLFSGTPTAESEGGTK	617-636	984.0020	984.0022	0.20	16.5
Beef	β -Haemoglobin	P02070	FFESFGDLSTADAVMINNPK	40-58	1045.4804	1045.4796	-0.77	16.9
Horse	β -Haemoglobin	P02062	FFDSFGDLSNPGAVMGNPK	42-60	1000.4646	1000.4637	-0.90	17.2
Pork	β -Haemoglobin	P02067	FFESFGDLSNADAVMGNPK	2-60	1023.4673	1023.4670	-0.29	16.8
Lamb	β -Haemoglobin	P02075	FFEHFGDLSNADAVMNNPK	40-58	1076.9915	1076.9906	-0.84	15.3

Proteomics

Proteomika merupakan kajian secara molekular terhadap keseluruhan protein yang dihasilkan dari ekspresi gen di dalam sel, terutama mengenai struktur dan fungsinya. Keseluruhan protein di dalam sel diistilahkan sebagai proteom. Istilah proteomik pertama kali dikenal pada tahun 1997, yang juga dibuat berdasarkan analogi genetika untuk ilmu yang mempelajari mengenai gen. Untuk istilah proteom sendiri berasal dari gabungan istilah protein dan genom yang dikemukakan oleh Marc Wilkins pada tahun 1994 pada saat mengambil gelar PhD. Salah satu alat yang umumnya digunakan untuk ilmu ini adalah matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI).

Practice and Hands On Halal Detection

Bahan

Amonium Bikarbonat , LC-MS Grade, asam klorida, Natrium Hidroksida, Asam trifluoroasetat asam format, Air LC-MS Grade, Asetonitril LC-MS Grade, Metanol LC-MS Grade, DI Air Aseton, Gelatin babi, Gelatin sapi, Daging babi dan vitamin Gel.

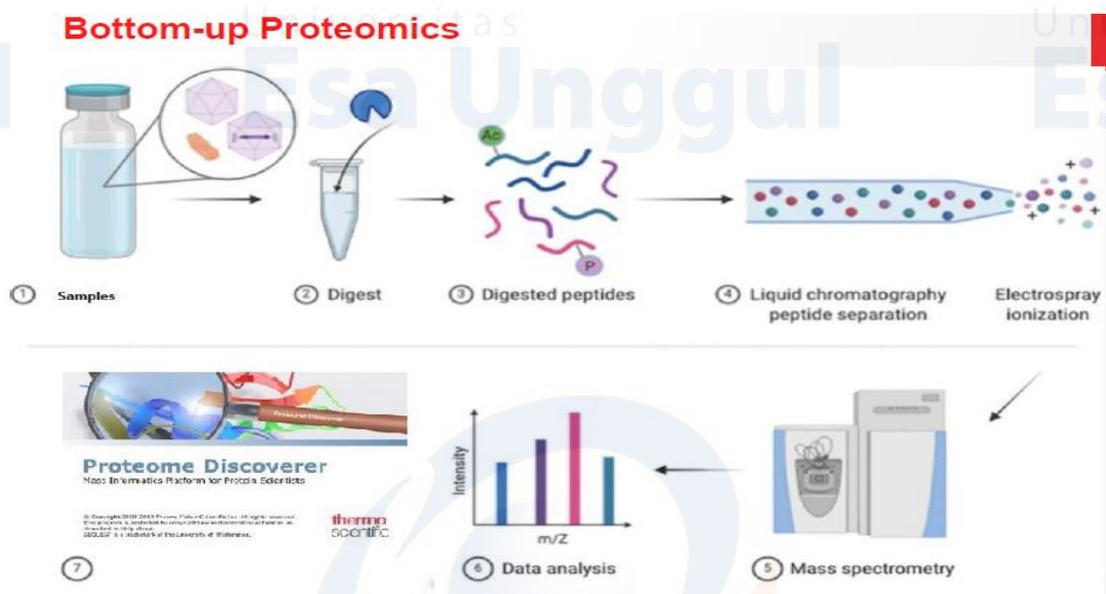
Peralatan

Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi (Ilmiah Termo™ Dionex™ Ultimate 3000 Pemisahan Cepat) Spektrometri Massa Resolusi Tinggi (Thermo Scientific™ Q Exactive™ Orbitrap™) Kolom Thermo Scientific™ Acclaim™ PepMap™ 100 C18 LC dengan ukuran partikel 3 μ m dan

dimensi 1,0 mm x 150 mm Pemanas blok / Inkubator Pengaduk Magnetik, mikrosentrifuge, pH meter, mikropipet

Persiapan Sampel

Sebanyak 0,2 g sampel dicampur dengan 1 mL akuades. Campuran divorteks dengan kecepatan tinggi selama 3 menit untuk mendapatkan suspensi yang homogen. Sampel disonikasi selama 30 menit pada suhu kamar, diikuti dengan sentrifugasi pada 1500 xg selama 5 menit untuk menghilangkan partikel/pelet. Diambil sebanyak 500 μ L suspensi dipindahkan ke tabung microcentrifuge. Protein diendapkan dengan 500 μ L aseton, vortex 1 menit, spin down selama 10 menit. Kemudian aseton dibuang. Pelet protein dilarutkan dalam 500 μ L 100 mM amonium bikarbonat (pH 8,5), vortex 1 menit dan larutan disonikasi selama 60 menit pada intensitas maksimum untuk meningkatkan hasil disolusi protein. Protein didenaturasi dengan pemanasan pada 90°C selama 15 menit. Larutan dibiarkan dingin selama 15 menit. Tripsin tingkat proteomik ditambahkan, vortex 1 menit dan reaksi dilakukan pada suhu 37°C selama 16 jam. Pencernaan protein dipadamkan dengan menambahkan 500 L TFA 1%. Solusi, vortex 1 menit. Sampel diputar selama 10 menit dan 500 μ L supernatan disaring menggunakan membran 0,22 μ m dan dipindahkan ke dalam vial injeksi untuk dianalisis menggunakan LC-HRMS. Analisis data dan Identifikasi protein komprehensif dilakukan menggunakan Thermo Scientific Perangkat lunak Proteome Discoverer 2.5 (San Jose, CA, USA) bersama dengan database FASTA UniProtKB/SwissProt



Tahapan analisis proteomics

Referensi

- Andriyani, E., Fais, N.L. and Muarifah, S., 2019. Perkembangan Penelitian Metode Deteksi Kandungan Babi untuk Menjamin Kehalalan Produk Pangan Olahan. *Journal of Islamic Studies and Humanities*, 4(1), pp.104-126.
- AR Orduna, E. Husby, CT Yang, D. Ghosh & F. Beaudry. 2015. Penilaian keaslian daging menggunakan bioinformatika, biomarker peptida yang ditargetkan, dan Spektrometri massa resolusi tinggi. *Aditif & Kontaminan Makanan: Bagian A*, DOI: 10.1080/19440049.2015.1064173
- Cai, Y., He, Y., Lv R., Chen, H., Wang Q., dan Pan, L. 2017. Detection and quantification of beef and pork materials in meat products by duplex droplet digital PCR. *PLOS ONE*. Vol. 12, No. 8.
- May Lim Charity. 2017. "Jaminan produk halal di Indonesia (Halal products guarantee in Indonesia)", *Jurnal Legislasi Indonesia*. Vol. 14, No. 01.
- Sugiana, F.A., Widyowati, H., Warisman, M.A., Suryani, dan Desriani. 2018. Low cost and comprehensive pork detection in processed food products with a different food matrix. *Indonesian Journal of Biotechnology*. Vol 23, No. 1. 2018.
- X.Sha, G.Wang, X.Li, L.Zhang, Z.Tu. 2019. Identifikasi dan kuantifikasi gelatin dengan metode bebas label berbasis spektrometri massa resolusi tinggi. *Hidrokoloid Makanan*. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105476
- X. Sha, Z. Hu, Z. Tu, L. Zhang, Z. Li, X. Li, T. Huang, H. Wang, L. Zhang, H. Xiao. 2017. Identifikasi tiga gelatin mamalia dengan kromatografi cair-spektrometri massa resolusi tinggi. *LWT - Ilmu dan Teknologi Pangan*. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.10.001

Dokumentasi Pelatihan



Pemaparan Materi



Praktek di Laboratorium

Dokumentasi Presentasi Pelatihan Bagi Para Dosen Bioteknologi



SERTIFIKAT

No.: 465/UN10.D40/TU/2021

diberikan kepada

Seprianto, S.Pd, M.Si

atas partisipasinya sebagai peserta dalam Workshop & Hands-On Practice on
"Proteomics and Bioinformatics Approach for Halal Application with
Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)"
yang diselenggarakan oleh Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya
bekerja sama dengan INBIO Indonesia pada tanggal 24-25 November 2021



Prof. Luchman Hakim, S.Si., M.Agr.Sc., Ph.D
NIP 197108081998021001



Evi Octaviany, S.Pd, M.Si
Evi Octaviany, S.Pd., M.Si.
INBIO INDONESIA, DIREKTUR