



Diferensiasi Gelatin Sapi dan Babi pada Cangkang Kapsul Keras Menggunakan metode Kombinasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Kemometrik

(Differentiation of bovine and porcine gelatin extracted from hard shell capsule by using HPLC combined chemometric method)

Zilhadia*, Fathmah Syafiqoh, & Ofa Suzanti Betha

Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta, Kota Tangerang Selatan, Banten

ABSTRACT: Bovine and porcine gelatin are the main ingredients for producing hard shell capsules. Porcine gelatin should not be consumed by Muslims so it is necessary to analyze the difference between bovine and porcine gelatin. The purpose of this study was to differentiate bovine and porcine gelatin in hard shell capsules using a combination of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Chemometrics, specifically the Principal Component Analysis (PCA) menu. Gelatin was extracted from the hard shell capsules and directly hydrolyzed using the acid hydrolysis technique, injected into HPLC and the chromatogram peak height of each amino acid constituent of gelatin was analyzed. The results showed that the amino acids that build gelatin can be separated well by HPLC. PCA can classify gelatin sources in simulated capsule shells. Standard gelatin and gelatin from capsule shells from the same animal source have the same amino acid composition. However, this study has not succeeded in identifying the source of commercial capsule shell gelatin.

Keywords: bovine gelatin; differentiation; HPLC; PCA; porcine gelatin.

ABSTRAK: Gelatin sapi dan babi merupakan bahan utama pembuatan cangkang kapsul keras. Gelatin babi tidak boleh dikonsumsi oleh Muslim sehingga perlu dilakukan analisis pembeda gelatin sapi dan babi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendiferensiasi gelatin sapi dan babi pada cangkang kapsul keras menggunakan metode kombinasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan Kemometrik menu *Principal Komponen Analisis* (PCA). Gelatin di ekstraksi dari cangkang kapsul keras dan langsung dihidrolisis menggunakan teknik hidrolisis asam, diinjeksikan ke dalam alat KCKT dan tinggi puncak kromatogram setiap asam amino penyusun gelatin dianalisis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa asam amino penyusun gelatin dapat dipisahkan dengan baik oleh KCKT. Gelatin standar dan gelatin dari cangkang kapsul dengan sumber hewan yang sama memiliki komposisi asam amino yang sama. Dengan demikian, PCA dapat mengklasifikasikan sumber gelatin pada cangkang kapsul simulasi. Namun penelitian ini belum berhasil mengidentifikasi sumber gelatin cangkang kapsul komersial.

Kata kunci: diferensiasi; gelatin babi; gelatin sapi; KCKT; PCA .

Pendahuluan

Gelatin merupakan suatu polimer yang disusun oleh campuran heterogen polipeptida diperoleh melalui hidrolisis kolagen jaringan ikat hewan [1]. Hewan utama penghasil gelatin dengan kualitas yang baik dan nilai kekuatan gel yang sesuai untuk berbagai sediaan adalah babi dan sapi. Hewan penghasil lainnya adalah ikan, namun bahan mentahnya sedikit. Penggunaan kulit babi sebagai bahan baku gelatin di seluruh dunia mencapai 44,9% dari total gelatin yang dihasilkan. Eropa Barat merupakan penghasil gelatin terbesar di dunia dimana 68% gelatin yang diproduksi berasal dari kulit babi [2,3]. Namun gelatin

babi bermasalah dalam hal status kehalalannya [4]. Hal ini menimbulkan kekhawatiran karena mayoritas penduduk Indonesia adalah muslim dan membawa konsekuensi perlunya perlindungan konsumen dengan adanya jaminan kehalalan mengenai sumber gelatin [3].

Gelatin memiliki sifat yang unik sehingga digunakan secara luas dalam industri makanan dan farmasi. Dalam industri makanan, gelatin ditemukan dalam produk seperti jelly, es krim, yogurt, ataupun marshmallow. Industri farmasi menggunakan gelatin sebagai

Article history

Received: 26 Juni 2022

Accepted: 08 August 2022

Published: 24 Okt 2022

Access this article



*Corresponding Author: Zilhadia

Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah Jakarta, Jl. Ir H. Juanda No.95, Cemp. Putih, Kec. Ciputat Tim., Kota Tangerang Selatan, Banten 15412 | Email: zilhadia@uinjkt.ac.id

bahan utama pembuatan cangkang kapsul keras dan lunak [5]. Cangkang kapsul keras merupakan salah satu bentuk sediaan farmasi yang populer digunakan oleh masyarakat karena dapat menutupi rasa dan bau obat, mempunyai warna yang menarik, dan dapat hancur secara cepat pada cairan gastrointestinal karena sifatnya yang larut air [6]. Peningkatan jumlah pemakaian kapsul keras lebih besar dibandingkan dengan tablet [7].

Keberadaan gelatin sapi dan babi dalam produk cangkang kapsul keras tidak dapat dihindari. Namun keberadaan kedua gelatin tersebut sangat sukar untuk diidentifikasi karena memiliki sifat fisika dan kimia yang hampir mirip [8]. Oleh karena itu perlu diupayakan metode yang selektif untuk membedakan gelatin sapi dan babi. Berbagai studi telah dilakukan untuk hal tersebut. Sahilah *et al* 2012 dan Zilhadia *et al*, 2017 membedakan gelatin babi dan sapi berbasis DNA dengan *Real Time* PCR [9,10] dan Zhang *et al*, 2008 menggunakan Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometry (LC-MS) [11]. Hashim *et al*, 2010 membedakan gelatin berdasarkan analisis gugus fungsi menggunakan Fourier Transform Infra Red (FTIR) [12]. Zilhadia *et al*, 2018 menerapkan FTIR untuk analisis gelatin pada sediaan gummy vitamin C [13]. Hashim *et al*, 2010 menganalisis perbedaan gelatin sapi dan babi berdasarkan pada asam amino penyusun protein dengan KCKT [12]. Perkembangan metode analisis menggunakan KCKT dikombinasi dengan teknik Principal Component Analysis (PCA) juga dilakukan oleh Widyaninggar *et al*, 2012 [14]. PCA merupakan salah satu menu *chemometric* yang merupakan teknik proyeksi data. PCA mereduksi data yang kompleks dan mencari data signifikan yang akan di buat *score plot* pada komponen 1 dan komponen 2. Hasil *score plot* ditampilkan dalam bentuk kuadran sehingga sangat membantu dalam klasifikasi suatu objek [15,22]. PCA

Pada penelitian ini, dilakukan validasi teknik analisis perbedaan gelatin sapi dan gelatin babi pada cangkang kapsul keras yang dibuat menggunakan penggabungan metode KCKT dan khemometrik khususnya menu PCA. Metode tersebut kemudian diuji cobakan untuk produk cangkang kapsul vitamin yang beredar di pasaran.

Metode Penelitian

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah standar asam amino (Sigma Aldrich) yang terdiri dari asam L- aspartat, L- serin, asam L- glutamat, glisin, L- histidin, L- arginin, L- treonin, L-alanin, L- prolin, L- sistein, L- tirosin, L- valin, L- metionin, L- lisin, L-

isoleusin, L- leusin, L- fenilalanin, triptofan, gelatin sapi standar (sigma Aldrich, Jerman), gelatin babi standar (sigma Aldrich, Jerman), internal standar AABA/alpha amino butiric acid (Merck, Jerman), Accq-fluor borat, reagen fluor A, asam klorida (Merck), asetonitril (merck, Jerman), akuades, aseton (Merck, Jerman), sampel cangkang kapsul, gliserin (P&G, Chemical Singapore), titanium dioksida (Merck, Jerman) dan pewarna tartrazine (Merck, Jerman). Sampel cangkang kapsul keras diambil 5 produk secara acak dengan produsen yang berbeda-beda yang beredar di apotek di Jakarta.

Pembuatan Lembaran Cangkang Kapsul Gelatin Keras Simulasi Menggunakan Gelatin Sapi dan Babi Standar

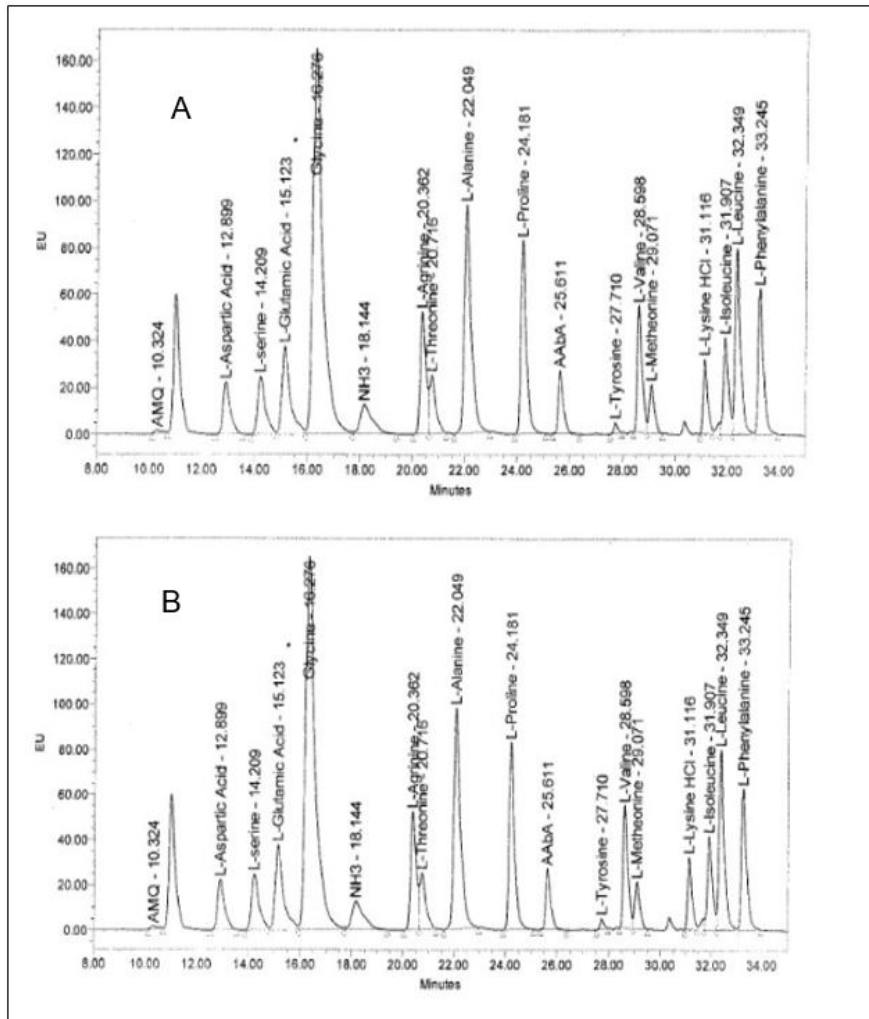
Sebanyak 5 g gelatin dimasukkan ke dalam gelas piala, ditambahkan dengan 5 mL akuades, lalu dipanaskan pada suhu 60 °C sampai membentuk larutan jernih. Terhadap larutan tersebut ditambahkan 1 mL gliserin, 0,125 g titanium dioksida (yang telah didispersikan dalam 1 mL aquadest) dan 5 mg pewarna tartrazin (yang telah dilarutkan dalam 1 mL aquadest) lalu dicukupkan dengan akuades hingga 10 mL. Setelah homogen, larutan dituang ke dalam cetakan untuk memperoleh lapisan tipis larutan gelatin. Lalu disimpan di dalam desikator [14].

Hidrolisis Asam Amino

Gelatin sapi dan babi standar, cangkang kapsul keras simulasi dan produk kapsul keras komersial yang telah dikeluarkan isinya ditimbang sebanyak 0,1 gram, lalu ditambahkan 5 mL asam klorida dan dialiri gas nitrogen untuk mencegah oksidasi. Larutan diaduk selama 5 menit menggunakan *vortex* dan dihidrolisis pada suhu 110 °C selama 22 jam. Setelah dihidrolisis, campuran didinginkan pada suhu ruang [16,17]. Isi tabung dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan aquabides sampai tanda batas, disaring dengan membran filter 0,45 µm, lalu filtrat diambil 500 µL untuk ditambahkan 40 µL larutan standar internal (6,45 mg α -aminobutyric acid dalam 25 mL asam klorida 0,1M dan 460 µL aquabides).

Derivatisasi dan Injeksi KCKT

Sebanyak 10 µL larutan hasil hidrolisis ditambahkan 70 µL AccQ.Tag Fluor borate, ditambahkan 20 µL reagen fluor A, divortex, didiamkan selama 1 menit. Larutan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 55 °C, lalu disuntikkan 5 µL filtrat pada alat KCKT (Waters 2695) dengan temperatur kolom 37°C, laju alir fase gerak 1,0 mL/menit, kromatografi menggunakan sistem gradien dengan fase gerak AccQTag Eluent A (buffer asetat-



Gambar 1. Profil asam amino penyusun gelatin pada kromatogram KCKT, (A: Gelatin sapi, B: Gelatin babi)

fosfat) dan Acetonitril 60% grade HPLC (campuran 60% asetonitril dan 40% akuabides), detektor fluorensen tipe 2475 (Waters, USA) pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 395 nm [18].

Konsentrasi asam amino dalam sampel dihitung sebagai berikut:

$$AA \left(\frac{mg}{100 \text{ gram}} \right) = \frac{\frac{\text{area komponen sampel}}{\text{area AABA sampel}} \times C \text{ standar} \left(\frac{pmol}{\mu L} \right) \times BM \times fp (\mu L)}{\frac{\text{area komponen standar}}{\text{area AABA standar}} \times 1000000 \times \text{bobot sampel} (gram) \times 1000} \times 100$$

Analisis Data menggunakan Kemometrik menu PCA

Data kromatogram yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan teknik PCA dengan cara memasukkan data tinggi puncak asam amino penyusun gelatin pada kromatogram ke dalam software Minitab 15 untuk membedakan komposisi asam amino pada gelatin standar,

cangkang kapsul keras simulasi dan produk cangkang kapsul keras komersial.

Hasil dan Diskusi

Lembaran cangkang kapsul keras simulasi dibuat dari bahan dasar gelatin dan air dengan penambahan gliserin, titanium dioksida dan pewarna tartrazin. Titanium dioksida memiliki indeks bias yang tinggi sehingga mempunyai sifat yang dapat menghamburkan cahaya dalam penggunaannya sebagai pigmen pemutih atau *opacifier agent* [19]. Lembaran cangkang kapsul keras simulasi yang dihasilkan berupa lapisan tipis, berwarna kuning, *opaque* dan dapat digulung. Secara organoleptis dapat dilihat bahwa lembaran cangkang kapsul keras simulasi yang dibuat dari standar gelatin sapi memiliki warna kuning pucat atau kuning kecoklatan sedangkan lembaran cangkang kapsul keras yang dibuat dari standar gelatin babi memiliki warna kuning terang. Hal

Tabel 1. Komposisi asam amino gelatin sapi, gelatin babi dan gelatin yang diekstrak dari cangkang kapsul keras simulasi

Asam Amino (%)	GB	GS	KB	KS	A	B	C	D	E
L-Aspartic acid	5,25	4,47	1,29	1,33	2,37	2,51	2,46	2,4	2,12
L-Serine	3,21	3,02	1,13	1,18	2,55	2,57	2,51	2,49	2,59
L-Glutamic acid	8,22	7,34	2,53	2,49	4,23	4,37	4,24	4,25	3,81
Glycine	21,94	20,49	7,44	7,94	18,97	18,47	19,16	19,46	20,3
L-Histidine	1,64	1,552	0,41	0,48	1,03	0,23	0,77	0,51	0,08
L-Arginine	11,45	9,319	2,94	3,11	6,62	6,73	6,35	6,47	6,46
L-Threonine	2,36	1,934	0,64	0,74	3,11	3,25	3,17	3,16	3,28
L-Alanine	6,66	6,187	2,98	2,49	11,9	11,38	11,98	11,78	11,51
L-Proline	10,27	9,542	1,01	1,56	9,31	9,41	9,46	9,54	9,65
L-Cystine	0,46	0,201	0,00	0,00	0,21	0,11	0,15	0,31	0,03
L-Tyrosine	0,93	0,474	0,40	0,55	0,34	0,33	0,35	0,31	0,32
L-Valine	2,64	2,361	0,72	0,72	7,06	7,35	7,12	6,99	7,29
L-Methionine	0,65	0,856	0,46	0,62	2,13	1,66	2,12	2,01	1,88
L-Lysin HCl	2,77	2,647	0,89	0,83	3,81	4,21	4,01	3,91	3,41
L-Isoleucine	1,35	1,616	0,36	0,45	4,77	4,93	4,82	4,9	4,99
L-Leucine	2,90	2,879	0,90	0,87	9,94	10,29	10,1	10,17	10,34
L-Fenylalanine	3,23	2,276	0,73	0,83	7,93	7,5	7,26	7,51	8,02
Triptophan	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,00

Keterangan: GB: gelatin babi, GS: gelatin sapi, KB: gelatin kapsul babi, KS: gelatin kapsul sapi, A-E : gelatin dari cangkang kapsul sampel 1-5

ini sesuai dengan serbuk gelatin standar yang digunakan dimana standar gelatin babi memiliki warna putih dan standar gelatin sapi memiliki warna kecoklatan.

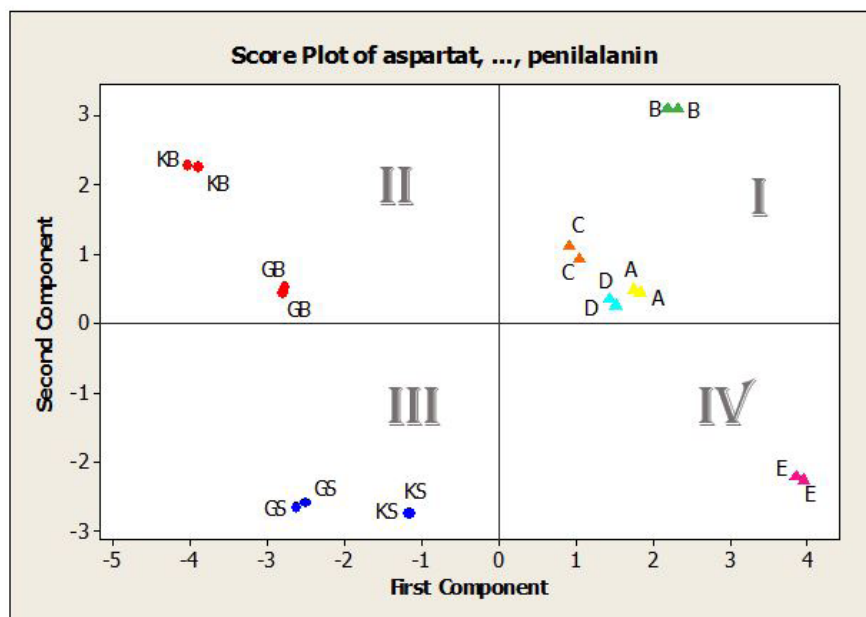
Hidrolisis asam amino dilakukan menggunakan asam klorida karena bersifat oksidator kuat yang dapat memecah ikatan peptida secara sempurna dan melepaskan asam amino penyusun gelatin. Selama proses hidrolisis ini, hubungan antara ikatan rantai polipeptida dari kolagen dengan ikatan rantai polipeptida yang lain akan menjadi terpisah. Hal ini disebabkan karena rusaknya struktur fibrosa dari kolagen [20]. Pada hidrolisis asam, asparagin dan glutamin dihidrolisis menjadi asam aspartat dan asam glutamat, triptofan secara lengkap dirusak, sistein tidak dapat ditentukan, tirosin sebagian dirusak, serin dan treonin dapat dihidrolisis tetapi masih tersisa sekitar 10% dan 5% [17].

Penambahan larutan standar internal digunakan sebagai faktor koreksi kesalahan volumetrik selama persiapan sampel dan mengkoreksi hilangnya residu asam amino selama proses hidrolisis yang akan dideteksi dengan berkurangnya standar internal, sehingga penggunaan larutan standar internal dapat meningkatkan presisi. Analisis asam amino pada penelitian ini menggunakan

proses derivatisasi pra kolom. Kelebihan dari derivatisasi pra kolom adalah waktu analisis yang lebih cepat dan cocok untuk analisis dengan jumlah residu sedikit [17].

Analisis profil asam amino dilakukan terhadap gelatin babi dan sapi standar, gelatin yang diekstrak dari cangkang kapsul keras simulasi dan gelatin dari produk cangkang kapsul komersial. Profil asam amino gelatin sapi dan babi standar dapat dilihat pada Gambar 1. Ada 18 Asam amino yang digunakan sebagai standar yaitu L-asam aspartat (Asp), L-serin (Ser), L-asam glutamat (Glu), L-glisin (Gly), L-histidin (His), L-arginin (Arg), L-treonin (Thr), L-alanin (Ala), L-prolin (Pro), L-tirosin (Tyr), L-valin (Val), L-metionin (Met), L-lisin (Lys), L-isoleusin (Ile), L-leusin (Leu), L-fenilalanin (Phe), L- sistein (Cys), dan triptofan.

Komposisi asam amino pada gelatin babi, gelatin sapi dan gelatin yang diekstrak dari cangkang kapsul silmulasi dapat dilihat pada Tabel 1. Semua jenis asam amino terdapat dalam gelatin kecuali triptofan [21]. Asam amino glisin, prolin dan arginin pada gelatin babi memiliki kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan gelatin sapi. Asam amino glisin, prolin dan arginin pada gelatin babi memiliki kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan gelatin sapi dan memiliki kadar asam amino metionin dan tirosin



Gambar 2. Kurva *score plot* PC1 dan PC2 asam amino gelatin standar, gelatin yang diekstrak dari cangkang kapsul keras simulasi dan produk cangkang kapsul komersial (GB : gelatin babi standar, GS : gelatin sapi standar, KB : gelatin babi yang diekstraksi dari cangkang keras simulasi, KS : gelatin sapi yang diekstraksi dari cangkang keras simulasi, A-E: gelatin dari kapsul komersial 1-5)

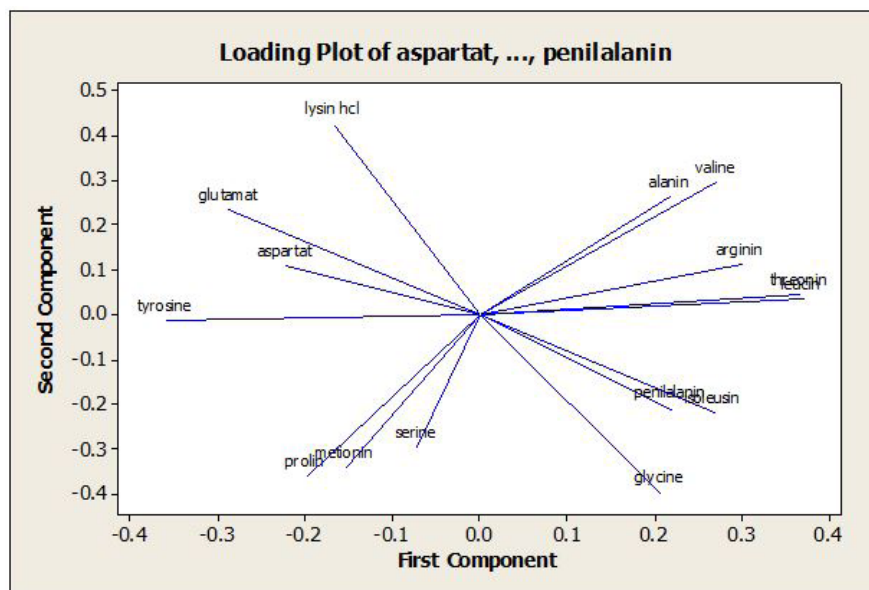
yang lebih rendah sedangkan asam amino triptofan rusak selama proses hidrolisis.

Selanjutnya dilakukan pengelompokan masing-masing sampel gelatin menggunakan teknik kemometrik yaitu PCA (*Principal Components Analysis*). Variabel yang digunakan adalah % tinggi puncak dari masing masing asam amino dalam kromatogram karena % tinggi puncak berbanding lurus dengan konsentrasi asam amino pada sampel. PCA dapat mengekstrak komponen utama menggunakan variabel tersebut dan mengklasifikasikan gelatin sapi dan babi [8]. Jumlah variabel yang digunakan untuk dimasukkan ke dalam software Minitab XV adalah 15 variabel (% tinggi puncak 15 asam amino), selanjutnya software akan melakukan analisis PCA. Berdasarkan pada *Principal Component 1* (PC1) dan *Principal Component 2* (PC2) maka dapat dibuat *score plot*. Kurva *score plot* digunakan untuk menaksir struktur data yaitu sebagai dasar perbedaan gelatin sapi dan babi. Semakin dekat letak antar sampel pada *score plot*, maka semakin besar pula kemiripannya atau sampel merupakan kelompok yang sama. Sampel dengan nilai *score plot* yang hampir sama mempunyai sifat fisika kimia yang hampir sama [15]. Hasil pengelompokan PCA dalam bentuk diagram *score plot* dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa gelatin babi standar dan cangkang kapsul yang dibuat dari gelatin babi standar

berada dalam satu kuadran yaitu kuadran 2 yang memiliki nilai PC1 negatif dan PC2 positif. Gelatin sapi standar dan cangkang kapsul yang dibuat dari standar gelatin sapi berada dalam satu kuadran yaitu kuadran 3 yang memiliki nilai PC1 dan PC2 negatif. Hal ini menunjukkan bahwa gelatin standar dan gelatin dari cangkang kapsul dengan sumber gelatin yang sama memiliki komposisi asam amino yang sama dan dapat dipisahkan dengan proses ekstraksi yang baik oleh KCKT. Sementara itu kurva *score plot* gelatin yang diekstrak dari sampel uji A,B,C dan D memiliki nilai PC1 dan PC2 positif dan sampel uji E memiliki nilai PC1 positif dan PC2 negatif. Diduga, kemungkinan pengelompokan gelatin dari sampel komersial A,B,C,D dan E terbuat dari campuran antara gelatin babi dan sapi.

Untuk melihat asam amino yang paling berpengaruh terhadap komponen utama, maka dilakukan analisis loading plot. Kurva loading plot dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan Gambar 3, variabel asam amino tirosin, treonin dan leusin memiliki jarak horizontal yang jauh dari garis $x = 0$, artinya asam amino tersebut memiliki kontribusi yang besar pada pembentukan nilai PC1 dengan nilai koefisien masing-masing -0.321, 0.102 dan 0.305. Sedangkan variabel yang berkontribusi paling besar terhadap pembentukan PC2 memiliki jarak terjauh vertikal dari garis $y = 0$ adalah lisin, valin dan glisin dengan nilai koefisien masing-masing -0.341, 0.317 dan 0.341. Variabel



Gambar 3. Kurva *loading plot* PC1 dan PC2 pada gelatin standar, gelatin yang diekstrak dari cangkang kapsul keras simulasi dan produk cangkang kapsul keras komersial

variabel lain dengan nilai koefisien yang lebih kecil juga tetap berpengaruh pada nilai PC1 dan PC2 yang akhirnya juga berpengaruh pada *score plot* dan menentukan hasil pembeda gelatin sapi dan gelatin babi. Walaupun demikian kontribusinya tidak sebesar variabel-variabel utama diatas.

Penelitian ini belum dapat secara tegas mengelompokkan sumber gelatin yang diekstrak dari cangkang kapsul komersial. Hal ini bisa jadi disebabkan oleh proses ekstraksi dan pemurnian gelatin yang kurang sempurna sehingga gelatin masih bercampur dengan bahan tambahan lain yang tentu saja lebih kompleks pada cangkang kapsul komersial. Hal tersebut menjadi keterbatasan dari penelitian ini yang bisa diteliti lebih lanjut pada penelitian selanjutnya.

Kesimpulan

Metode KCKT yang dikombinasi dengan teknik kemometrik menu PCA (*Principal Component Analysis*) dapat menganalisis perbedaan gelatin babi dan gelatin sapi pada lembaran cangkang kapsul keras yang dibuat sendiri, tetapi belum bisa membedakan sumber gelatin yang dipakai pada produk kapsul keras yang diambil dari pasaran.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah Jakarta untuk fasilitas penelitian yang telah diberikan.

Referensi

- [1]. Gelatin Manufacturers Institute of America. Gelatin Handbook, USA: GMIA;2012.
- [2]. Schrieber R, and Herbert G. Gelatine handbook: theory and industrial practice. USA: John Wiley and Sons; 2007.
- [3]. Jamaludin MA, Zaki NM, Ramli MA, Hashim DM, and Rahman A. Istihalah: Analysis on the utilization of gelatin in food products. 2011 2nd International Conference on Humanities, Historical and Social Science. 2011. Singapore: IACSIT Press.
- [4]. Zilhadia, Yahdiana H, Irwandi J, Effionora A. (2018). Characterization and functional properties of gelatin extracted from goatskin. International Food Research Journal. 2018; 25(1):275-281.
- [5]. McDowall RD. (2019). Help Data Integrity, The updated version of United States Pharmacopoeia (USP) part of 1058 on analytical instrument qualification (AIQ) merges instrument qualification and computer validation into a single integrated process. North America : LC-GC;2019. P312-317.
- [6]. Farmakope Indonesia (Edisi V). Jakarta: Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan. 2014.
- [7]. Stegeman S. Hard gelatine capsules today and tomorrow. USA: Capsugel library; 2002.
- [8]. Nemati M, Oveisi MR, Abdollahi H, Sabzevari O. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2004; 34:485–92.
- [9]. Sahilah AM, Mohd FL, Norrakiah AS, Aminah A, Wanaida WM, Ma'aruf, AG, et al. 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. 2012; 19(1): 371-375.
- [10]. Zilhadia, Izzah AN, Betha OS. Perbandingan metode SYBR Green dan Hydrolysis Probe dalam analisis DNA gelatin sapi dan gelatin babi menggunakan Real Time Polymerase Chain Reaction. Jurnal Sains Farmasi dan Klinis. 2017; 4(1): 16-23.
- [11]. Zhang G, Liu T, Wang Q, Chen L, Lei J, Luo J, Ma G, et al. Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: A new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. Food Hydrocolloids. 2019; 23(7): 2001–2007.

- [12]. Hashim DM, CheMan YB, Norakasha R, Shuhaimi M, Salmah Y, Syahariza ZA. Potensial use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatin. *Journal of Food Chemistry*. 2010; 118: 856-860.
- [13]. Zilhadia, Kusumaningrum F, Betha OS, Supandi S. (2018). Diferensiasi gelatin sapi dan gelatin babi pada gummy vitamin c menggunakan metode kombinasi Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR) dan Principal Component Analysis (PCA). *Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018; 5(2): 90-96.
- [14]. Widyaninggar A, Triwahyudi, Triyana K, Rohman A. Differentiation between porcine and bovine gelatin in commercial capsule shells based on amino acid profiles and principal component analysis. *Indonesian Journal Pharmacy*. 2012; 23(2):96-101.
- [15]. Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* Fifth edition. 2005. Inggris : Pearson Education Limited.
- [16]. Hafidz RM, Yaakob RN, Amin ICM, Noorfaizan A. Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *International Food Research Journal*. 2011;18: 813-817.
- [17]. Fountoulakis M, Lahm HW. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography*. 1998; 826:109–134.
- [18]. Kabelova I, Dvořáková M, Čížková H, Dostálek P, dan Melzoch K. Determination of free amino acids in cheeses from the Czech market. *Czech Journal Food Science*. 2009; 27 (3):143–150.
- [19]. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipient Sixth Edition*. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2019.
- [20]. See SF, Hong PK, Ng KL, WanAida WM, Babji AS. Physicochemical properties of gelatins extracted from skins of different freshwater fish species. *International Food Research Journal*. 2010;17:809-816.
- [21]. Nhari RM, Ismail A, CheMan YB. Analytical methods for gelatin differentiation from bovine and porcine origins and food products. *Journal of Food Science*. 2012; 71; 1.
- [22]. Xian-Long, Weia F, Xiaoa X, Zhaoc X, Shia Y, Liua W, Zhanga P, Shuang-Cheng M, Tiand S, Lina R. Identification of five gelatins by ultra performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) using principal component analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012; 62: 191–195.



Copyright © 2022 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)