

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

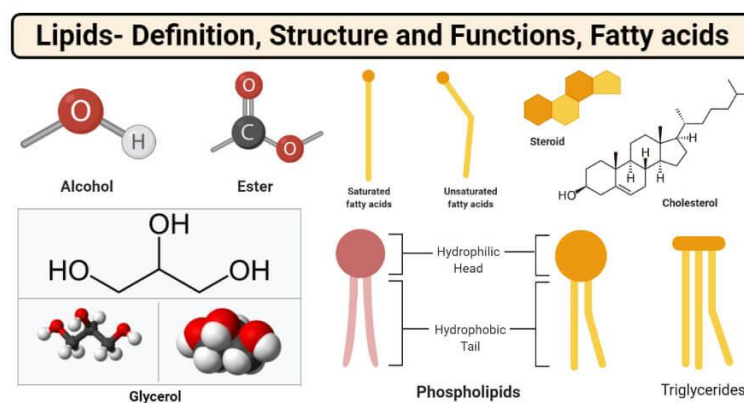
2.1 Lipid

Lipid merupakan komponen utama dalam produk daging yang tidak hanya berfungsi sebagai sumber energi, tetapi juga berperan penting dalam menentukan mutu sensori, sifat teknologi, dan nilai gizi (Fu et al., 2022). Keberadaan lipid berkontribusi terhadap pembentukan flavor, tekstur, serta stabilitas selama penyimpanan (Jia et al., 2022). Oleh karena itu, pemahaman mengenai karakteristik lipid menjadi dasar penting dalam analisis mutu dan pengolahan produk daging (Ruiz-Capillas & Herrero, 2021). Namun demikian lipid dalam daging tidak berada dalam bentuk bebas melainkan terdistribusi dalam jaringan kompleks yang mengandung protein dan air (Jia et al., 2022). Kondisi tersebut menjadikan proses isolasi atau ekstraksi lipid lebih kompleks dibandingkan dengan proses yang dilakukan pada matriks lain, seperti biji penghasil minyak maupun mikroalga. Interaksi antara lipid–protein serta tingginya kadar air dapat menghambat pelepasan lipid sehingga diperlukan metode dan kondisi ekstraksi yang tepat untuk memperoleh hasil yang optimal (Liu et al., 2024).

2.1.1 Struktur dan Klasifikasi Lipid dalam Produk Daging

Lipid dalam produk daging terdiri atas beberapa kelas utama, yaitu *Triglyceride* (TG), *Diglyceride* (DG), *Phospholipid* seperti *Phosphatidycholine* (PC) (Fu et al., 2022). Setiap kelas lipid memiliki struktur kimia yang berbeda terutama pada jumlah dan jenis asam lemak serta tingkat ketidakjenuhannya bisa dilihat pada **Gambar 2.1** yang akan memengaruhi sifat

fisik dan kimianya seperti titik leleh dan kestabilan oksidatif (Ruiz-Capillas & Herrero, 2021). Trigliserida yang bersifat non-polar cenderung mudah larut dalam pelarut non-polar, sedangkan fosfolipid yang memiliki gugus polar memerlukan pelarut yang lebih polar atau semi-polar (Jia et al., 2022). Selain itu, dalam pengembangan produk daging modern dikenal konsep struktur lipid yaitu modifikasi struktur lipid untuk meningkatkan nilai kesehatan tanpa menurunkan kualitas sensori (Deng et al., 2022).



Gambar 2.1 Struktur Lipid

(Sumber : <https://microbenotes.com/lipids/>)

Karakteristik lipid dalam produk daging memiliki implikasi langsung terhadap proses ekstraksi. Perbedaan polaritas antar kelas lipid menunjukkan bahwa efisiensi ekstraksi sangat bergantung pada kesesuaian antara sifat lipid dan jenis pelarut yang digunakan (*like dissolves like*) (Fu et al., 2025). Pelarut non-polar cenderung efektif dalam mengekstrak trigliserida, sedangkan pelarut polar atau semi-polar diperlukan untuk mengekstrak fosfolipid dan komponen lipid kompleks lainnya (Jia et al., 2022). Selain itu, kompleksitas matriks daging yang melibatkan interaksi antara lipid, protein, dan air menyebabkan

proses ekstraksi memerlukan bantuan teknologi untuk meningkatkan efisiensi pelepasan lipid (Tate et al., 2024).

2.2 Ekstraksi Lipid

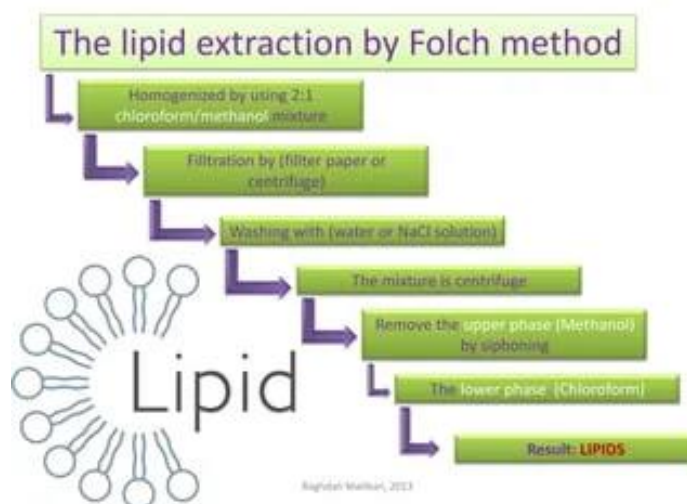
Ekstraksi lipid merupakan tahapan penting dalam analisis dan pengolahan produk daging karena berpengaruh langsung terhadap jumlah dan jenis lipid yang diperoleh. Keberhasilan proses ekstraksi tidak hanya ditentukan oleh metode yang digunakan tetapi juga dipengaruhi oleh karakteristik matriks daging yang kompleks yang melibatkan interaksi antara lipid, protein, dan air (Tate et al., 2024). Interaksi tersebut menyebabkan lipid tidak berada dalam bentuk bebas sehingga memerlukan metode ekstraksi yang efektif serta pemilihan pelarut yang tepat untuk memperoleh hasil yang optimal.

2.2.1 Metode Konvensional (Soxhlet, Folch, dan Bligh–Dyer)

Metode konvensional masih banyak digunakan sebagai acuan dalam ekstraksi lipid khususnya untuk penentuan kadar lipid total pada berbagai matriks pangan termasuk produk daging. Metode-metode tersebut memiliki karakteristik yang berbeda terutama dalam hal prinsip kerja jenis pelarut yang digunakan serta efisiensinya terhadap berbagai jenis lipid. Metode Soxhlet merupakan teknik ekstraksi padat–cair yang menggunakan pelarut organik yang dipanaskan dan disirkulasikan secara kontinyu. Metode ini dikenal sederhana dan efektif untuk mengekstrak lipid dari sampel dengan kadar lemak tinggi. Namun, pada matriks daging yang kompleks efisiensi ekstraksi *soxhlet* dapat menurun apabila tidak didahului dengan perlakuan seperti hidrolisis asam karena adanya interaksi antara lipid dan protein serta tingginya kadar air dalam jaringan daging (Khan et al.,

2021). Selain itu, penggunaan suhu tinggi dan waktu ekstraksi yang lama berpotensi menyebabkan degradasi lipid khususnya asam lemak tak jenuh. Dari segi pelarut *soxhlet* umumnya menggunakan pelarut non-polar seperti n-heksana, sehingga lebih selektif terhadap trigliserida dan kurang efektif dalam mengekstrak lipid polar.

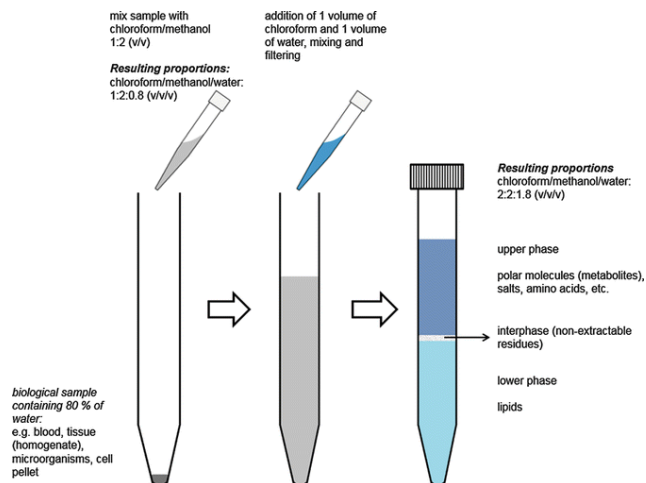
Metode Folch menggunakan campuran pelarut kloroform dan metanol yang mampu mengekstrak lipid secara lebih komprehensif baik lipid non-polar maupun polar sistem ekstraksi metode Folch dapat dilihat pada **Gambar 2.2**. Oleh karena itu, metode ini sering dianggap sebagai metode standar dalam analisis lipid karena mampu memberikan rendemen tinggi dan profil lipid yang lengkap (Kiyani et al., 2023). Pada matriks daging metode Folch terbukti efektif untuk mengekstrak berbagai kelas lipid termasuk fosfolipid.



Gambar 2.2 Sistem Ekstraksi Metode Folch

(Sumber : <https://www.slideshare.net/slideshow/lipid-extraction-by-folch-method/30301082>)

Metode Bligh–Dyer juga menggunakan sistem pelarut campuran kloroform, metanol, dan air namun dengan rasio pelarut yang lebih rendah dan waktu ekstraksi yang lebih singkat dibandingkan metode Folch. Metode ini lebih efisien untuk sampel dengan kadar lemak rendah dan sering digunakan dalam analisis jaringan biologis sistem metode Bligh-Dyer dapat dilihat pada **Gambar 2.3**. Pada sampel dengan kandungan lemak tinggi seperti daging metode ini cenderung menghasilkan rendemen yang lebih rendah dibandingkan metode Folch sehingga berpotensi menyebabkan estimasi lipid total yang kurang akurat (Xiao et al., 2012).



Gambar 2.3 Sistem metode Bligh-Dyer (Sündermann et al., 2011)

Secara umum, perbedaan utama antar metode konvensional tersebut terletak pada jenis dan sistem pelarut yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut memiliki peran yang sangat penting dalam menentukan efisiensi ekstraksi serta jenis lipid yang dapat diperoleh. Meskipun metode konvensional masih banyak digunakan keterbatasan seperti waktu ekstraksi yang lama,

penggunaan pelarut dalam jumlah besar, serta aspek keamanan dan lingkungan mendorong pengembangan metode alternatif yang lebih efisien.

2.2.1.1 Metode UAE (Ultrasound-Assisted Extraction)

Perkembangan teknologi ekstraksi mendorong munculnya metode yang lebih efisien dan ramah lingkungan, salah satunya adalah metode ultrasound-assisted extraction (UAE). Metode ini memanfaatkan gelombang UAE untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi melalui mekanisme kavitasi akustik. Kavitasi akustik terjadi akibat pembentukan dan runtuhnya gelembung mikro dalam medium cair yang dipicu oleh gelombang UAE (Deng et al., 2022). Runtuhnya gelembung tersebut menghasilkan gaya geser, tekanan lokal, dan turbulensi yang tinggi, sehingga mampu merusak struktur jaringan daging dan meningkatkan pelepasan lipid ke dalam pelarut (Shen et al., 2023). Dengan demikian, proses perpindahan massa antara matriks dan pelarut menjadi lebih cepat dan efisien. Efektivitas metode UAE tidak hanya dipengaruhi oleh parameter UAE, tetapi juga oleh sifat pelarut yang digunakan (Mienis et al., 2024). Karakteristik pelarut seperti viskositas, tegangan permukaan, dan tekanan uap berpengaruh terhadap pembentukan dan intensitas kavitasi, yang pada akhirnya menentukan efisiensi ekstraksi (Sicaire et al., 2016).

Dibandingkan dengan metode konvensional UAE memiliki beberapa keunggulan antara lain mampu meningkatkan rendemen ekstraksi dalam waktu yang lebih singkat mengurangi penggunaan pelarut dan energi serta memungkinkan proses berlangsung pada suhu yang lebih rendah sehingga dapat menjaga stabilitas komponen lipid yang sensitif terhadap panas (Deng et al.,

2022). Selain itu, metode ini juga fleksibel dan dapat dikombinasikan dengan pelarut yang lebih aman seperti pelarut polar-non polar (Mienis et al., 2024). Meskipun demikian metode UAE juga memiliki beberapa keterbatasan, seperti potensi peningkatan suhu lokal yang dapat memicu oksidasi lipid serta tantangan dalam penerapan pada skala industri terkait distribusi energi UAE yang belum merata (Oprescu et al., 2022).

2.2.2 Pelarut Ekstraksi Lipid

Pemilihan pelarut dalam ekstraksi lipid didasarkan pada prinsip *like dissolves like* yaitu suatu senyawa cenderung larut dalam pelarut yang memiliki karakteristik polaritas yang serupa. Lipid non-polar seperti trigliserida dan kolesterol ester lebih mudah larut dalam pelarut non-polar sedangkan lipid polar seperti fosfolipid memerlukan pelarut yang lebih polar untuk dapat diekstrak secara optimal (Saini et al., 2021). Efisiensi ekstraksi lipid sangat dipengaruhi oleh kesesuaian antara sifat lipid dan pelarut yang digunakan. Selain melarutkan lipid, pelarut juga harus mampu menembus matriks biologis dan melepaskan lipid yang terikat pada protein maupun membran sel. Oleh karena itu, ekstraksi lipid total umumnya menggunakan kombinasi pelarut polar dan non-polar sehingga berbagai kelas lipid dapat diekstrak secara bersamaan (Ulmer et al., 2018).

2.2.2.1 Kloroform (Chloroform)

Kloroform (CHCl_3) merupakan pelarut organik non-polar hingga semi-polar yang telah digunakan secara luas dalam ekstraksi lipid dari berbagai matriks biologis, termasuk jaringan hewan, mikroorganisme, dan bahan

pangan. Kloroform memiliki kemampuan melarutkan berbagai lipid hidrofobik, seperti trigliserida, digliserida, kolesterol ester, dan asam lemak bebas, sehingga sering digunakan sebagai komponen utama dalam metode ekstraksi lipid klasik seperti Folch dan Bligh–Dyer (Breil et al., 2017). Dalam sistem ekstraksi dua fase, kloroform membentuk fase bawah karena memiliki densitas yang lebih tinggi dibandingkan air dan metanol.

Sebagian besar lipid terpartisi ke dalam fase ini akibat afinitasnya yang tinggi terhadap senyawa non-polar. Fase kloroform sering digunakan sebagai fraksi utama untuk analisis lipid total maupun analisis lipidomik (Ulmer et al., 2018). Kemampuan kloroform dalam mengekstrak berbagai kelas lipid menjadikannya salah satu pelarut yang paling efektif untuk memperoleh cakupan lipid yang luas. Sifat toksik dan dampak lingkungannya mendorong pengembangan berbagai sistem pelarut alternatif yang lebih aman dan berkelanjutan (Venturi et al., 2025).

2.2.2.2 Metanol (Methanol)

Metanol (CH_3OH) merupakan pelarut polar yang banyak digunakan dalam ekstraksi lipid karena kemampuannya berinteraksi dengan senyawa polar maupun amfipatik. Dalam sistem ekstraksi lipid metanol berfungsi meningkatkan permeabilitas matriks biologis melalui pemutusan interaksi antara lipid, protein, dan komponen membran sel lainnya (Ulmer et al., 2018). Selain itu metanol mampu melarutkan berbagai lipid polar, terutama fosfolipid dan glikolipid, yang umumnya kurang larut dalam pelarut non-polar. Kehadiran metanol juga membantu membentuk fase homogen pada tahap awal ekstraksi sehingga meningkatkan kontak antara pelarut dan matriks sampel

(Breil et al., 2017). Penggunaan metanol bersama pelarut non-polar menghasilkan sistem ekstraksi yang mampu mengakomodasi rentang polaritas lipid yang lebih luas dibandingkan penggunaan satu jenis pelarut secara tunggal. Oleh karena itu, metanol menjadi komponen penting dalam berbagai metode ekstraksi lipid yang digunakan dalam analisis lipidomik modern (Saini et al., 2021).

2.2.2.3 Air

Air merupakan komponen penting dalam sistem ekstraksi lipid berbasis kloroform–metanol karena berperan dalam pembentukan sistem dua fase. Penambahan air menyebabkan campuran homogen kloroform:metanol berubah menjadi sistem biphasic yang terdiri atas fase organik dan fase berair (Folch et al., 1957). Dalam sistem tersebut, sebagian besar lipid akan berpindah ke fase kloroform, sedangkan protein, garam, gula, dan komponen non-lipid lainnya akan berada pada fase metanol:air. Dengan demikian, air berfungsi membantu pemisahan lipid dari komponen non-lipid sehingga meningkatkan kemurnian ekstrak lipid yang diperoleh (Ulmer et al., 2018). Jumlah air yang digunakan dapat memengaruhi kualitas pemisahan fase dan distribusi lipid selama proses ekstraksi. Perubahan jumlah air dalam sistem kloroform:metanol:air berpotensi memengaruhi rendemen ekstraksi maupun profil lipid yang dihasilkan, sehingga perlu dioptimalkan sesuai karakteristik sampel yang digunakan (Saini et al., 2021).

2.2.2.4 Sistem Pelarut Kloroform:Metanol:Air

Sistem kloroform:metanol:air merupakan sistem pelarut yang paling banyak digunakan dalam ekstraksi lipid biologis dan menjadi dasar metode

Folch serta Bligh–Dyer. Sistem ini dikembangkan untuk mengatasi kompleksitas matriks biologis yang mengandung lipid, protein, karbohidrat, dan air dalam satu jaringan (Folch et al., 1957). Pada tahap awal kloroform dan metanol membentuk campuran homogen yang mampu menembus jaringan dan melarutkan lipid dengan berbagai tingkat polaritas. Penambahan air selanjutnya menyebabkan sistem berubah menjadi dua fase yang stabil. Fase bawah yang kaya kloroform mengandung sebagian besar lipid yang diekstrak sedangkan fase atas yang tersusun atas metanol dan air mengandung senyawa non-lipid yang bersifat hidrofilik (Breil et al., 2017).

Keunggulan utama sistem ini terletak pada kemampuannya mengekstrak lipid netral dan lipid polar secara simultan. Metanol berperan dalam mendisrupsi interaksi lipid dengan komponen seluler, kloroform melarutkan lipid hidrofobik, sedangkan air memfasilitasi pemisahan lipid dari komponen non-lipid (Ulmer et al., 2018). Kombinasi ketiga pelarut tersebut menghasilkan efisiensi ekstraksi yang tinggi serta cakupan kelas lipid yang lebih luas dibandingkan sistem pelarut tunggal (Saini et al., 2021).

2.2.3 Pengaruh Rasio Pelarut terhadap Hasil Ekstraksi

Rasio pelarut merupakan parameter penting yang menentukan efisiensi ekstraksi dan distribusi lipid dalam sistem ekstraksi. Perubahan proporsi pelarut dapat memengaruhi polaritas medium, kelarutan lipid, kestabilan sistem dua fase, serta partisi berbagai kelas lipid selama proses ekstraksi (Saini et al., 2021). Peningkatan proporsi pelarut non-polar cenderung meningkatkan kelarutan lipid netral seperti trigliserida dan kolesterol ester. Sebaliknya,

peningkatan proporsi pelarut polar umumnya meningkatkan pelepasan dan kelarutan lipid membran yang bersifat amfipatik, terutama fosfolipid dan glikolipid (Ulmer et al., 2018).

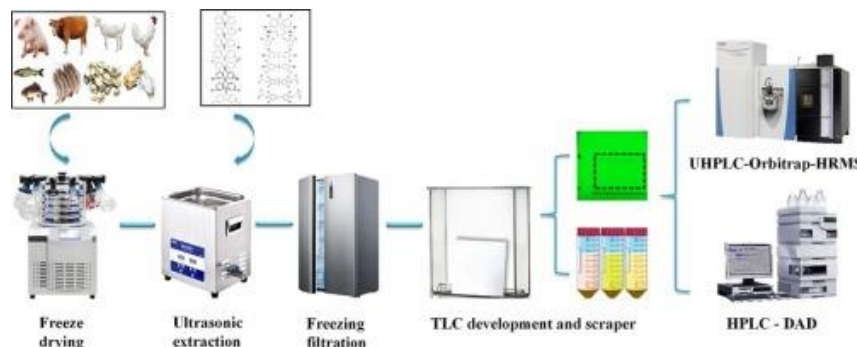
Jumlah air juga berperan penting dalam pembentukan sistem dua fase. Penambahan air memengaruhi distribusi senyawa antara fase organik dan fase berair serta menentukan efektivitas pemisahan komponen lipid dan non-lipid. Oleh karena itu, perubahan rasio kloroform:metanol:air dapat menghasilkan perbedaan rendemen lipid maupun komposisi kelas lipid yang diekstrak (Breil et al., 2017). Berbagai studi lipidomik menunjukkan bahwa komposisi pelarut tidak hanya memengaruhi jumlah lipid yang berhasil diekstrak, tetapi juga memengaruhi keragaman spesies lipid yang dapat terdeteksi menggunakan teknik kromatografi dan spektrometri massa. Dengan demikian, rasio pelarut merupakan faktor penting yang menentukan representativitas profil lipid yang diperoleh dari suatu matriks biologis (Y. Wang et al., 2025).

2.3 Analisis UHPLC-HRMS

Teknik analisis *Ultra High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry* (UHPLC-HRMS) merupakan metode analisis yang sangat efektif untuk memisahkan dan mengidentifikasi senyawa lipid dalam berbagai matriks, termasuk daging (Wei et al., 2025). Prinsip kerja UHPLC-HRMS menggabungkan dua teknik analisis yang kuat kromatografi cair performa tinggi (HPLC) dan spektrometri massa (MS) untuk cara kerja UAE dan UHPLC-HRMS dapat dilihat pada **Gambar 2.4**. Dalam proses ini sampel lipid pertama-tama dipisahkan menggunakan kolom kromatografi di mana senyawa lipid akan

terpisah berdasarkan sifat fisikokimianya, seperti polaritas dan ukuran molekul. Pemisahan ini menggunakan gradien pelarut tertentu yang dioptimalkan untuk berbagai jenis lipid. Setelah pemisahan, senyawa yang terpisah kemudian diionisasi menggunakan teknik ionisasi seperti *electrospray ionization* (ESI) dan dianalisis menggunakan spektrometri massa beresolusi tinggi. Spektrometri massa ini memungkinkan deteksi dan identifikasi senyawa berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z), dengan akurasi yang sangat tinggi (Windarsih et al., 2022).

Keunggulan metode UHPLC-HRMS dibandingkan teknik analisis lainnya terletak pada sensitivitas dan resolusi yang tinggi (Shi et al., 2024). Metode ini mampu mendeteksi senyawa dalam konsentrasi yang sangat rendah bahkan di bawah 1 ppm yang sangat penting dalam analisis lipid karena komponen lipid sering kali hadir dalam jumlah yang kecil dalam matriks kompleks seperti daging (Wei et al., 2025). Sebagai contoh, UHPLC-HRMS dapat mendeteksi asam lemak rantai panjang dalam konsentrasi rendah yang sering kali luput pada teknik lain. Selain itu, metode ini memiliki kecepatan analisis yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode tradisional seperti HPLC konvensional, yang memungkinkan analisis lebih banyak sampel dalam waktu yang lebih singkat (Candoğan et al., 2020).



Gambar 2.4 Cara Kerja UAE dan UHPLC-HRMS

(sumber : Ying et al., 2022)

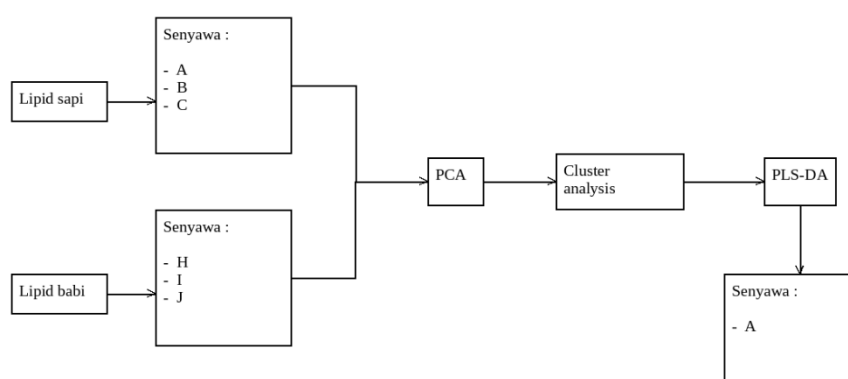
Metode ini juga menawarkan kemampuan untuk melakukan analisis non-target yang berarti dapat mendeteksi dan mengidentifikasi berbagai senyawa lipid tanpa perlu mengetahui sebelumnya jenis senyawa yang akan dianalisis (Rocchetti et al., 2024). Ini sangat berguna dalam penelitian metabolomik, di mana peneliti ingin mendapatkan gambaran menyeluruh tentang profil lipid dalam sampel. Sebagai contoh, dalam studi oleh (Windarsih et al., 2022) metode ini berhasil mengidentifikasi senyawa lipid yang berpotensi menjadi biomarker pencampuran daging babi dalam produk daging sapi. Dengan pendekatan ini, peneliti dapat mengidentifikasi senyawa lipid yang mungkin berkontribusi pada karakteristik organoleptik, nutrisi, atau mendeteksi potensi pencemaran dan adulterasi produk (Windarsih et al., 2022).

Dalam konteks analisis lipid pada daging, UHPLC-HRMS juga memungkinkan untuk analisis lipid spesifik yang berkaitan dengan kualitas daging, seperti asam lemak jenuh (saturated fatty acids, SFAs), asam lemak tak jenuh tunggal (*monounsaturated fatty acids*, MUFAs), dan asam lemak tak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) (Jia et al., 2022). Senyawa bioaktif lainnya, seperti fosfolipid dan sterol, juga dapat dianalisis dengan presisi tinggi. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa metode ini dapat digunakan untuk

mendeteksi pencampuran daging, seperti pencampuran daging babi dalam produk daging sapi, dengan sensitivitas yang tinggi, sehingga memberikan kontribusi penting dalam memastikan kehalalan dan keamanan produk daging (Windarsih et al., 2022).

2.4 Kerangka Berpikir Penelitian

Untuk memperoleh interpretasi yang komprehensif terhadap profil lipid ham sapi dan ham babi, penelitian ini menggunakan pendekatan analisis kemometrik secara bertahap. Analisis dimulai dengan reduksi dimensi data menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA) untuk mengidentifikasi pola penyebaran sampel, kemudian dilanjutkan dengan Cluster Analysis untuk mengevaluasi tingkat kemiripan antar sampel berdasarkan profil lipid. Selanjutnya, *Partial Least Squares-Discriminant Analysis* (PLS-DA) digunakan sebagai metode klasifikasi guna mengidentifikasi struktur lipid yang berkontribusi paling besar dalam membedakan kedua kelompok sampel. Alur analisis kemometrik yang digunakan pada penelitian ini ditunjukkan pada **Gambar 2.5**.



Gambar 2.5 Kerangka Berfikir Penelitian