

KAJIAN PUSTAKA : KONTROL DAN REDUKSI ETIL KARBAMAT PADA PRODUK FERMENTASI

LITERATURE REVIEW: CONTROL AND REDUCTION OF ETHYL CARBAMATE FORMATION IN FERMENTED PRODUCTS

¹Setyaning Pawestri¹), Fathma Syahbanu ²)

¹) Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pangan dan Agroindustri

²) Program Studi Gizi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Singaperbangsa Karawang

ABSTRACT

*Ethyl carbamate (EC) can be found in fermented products and alcoholic beverages. Tests on animals show this compound is a multisite carcinogen. The International Agency for Research on Cancer (IARC) classifies ethyl carbamate as a group 2A carcinogen. Due to its toxicity, ethyl carbamate in food products can be hazardous to health. Ethyl carbamate can be formed during fermentation and storage, which involves the reaction between ethanol and carbamyl compounds. The main precursor for the formation of ethyl carbamate is arginine metabolism by *Saccharomyces cerevisiae* and other lactic acid bacteria. Considering the toxicity of ethyl carbamate, it is crucial to understand the formation pathway, prominent analytical and monitoring techniques, mitigation practices and experimental methods to reduce EC. An effort can be conducted to mitigate EC by modifying bacterial genes for fermentation, which can be an applicable solution for the food industry.*

Keywords: ethyl carbamate; fermentation; carcinogen; precursor

INTISARI

Etil karbamat (EK) dapat ditemukan pada produk hasil fermentasi dan minuman beralkohol. Uji pada hewan menunjukkan senyawa ini bersifat multisite karsinogen. International Agency for Research on Cancer (IARC) menggolongkan etil karbamat sebagai golongan 2A karsinogen. Dikarenakan sifat toksisitasnya, keberadaan etil karbamat pada produk makanan dapat membahayakan kesehatan. Etil karbamat dapat terbentuk saat proses fermentasi dan saat penyimpanan dimana melibatkan reaksi antara etanol dan senyawa yang mengandung karbamil. Prekursor utama pembentukan etil karbamat adalah hasil metabolisme arginin oleh *Saccharomyces cerevisiae* dan bakteri asam laktat lainnya. Mempertimbangkan toksisitas etil karbamat, maka penting untuk mengetahui jalur pembentukan, pengembangan teknik analisis dan monitoring, hingga praktik mitigasi dan metode eksperimental untuk mereduksi EK. Salah satu cara mitigasi EK adalah modifikasi gen bakteri untuk fermentasi yang dapat menjadi solusi aplikatif bagi bidang industri pangan.

Kata kunci: etil karbamat; fermentasi; karsinogen; prekursor

PENDAHULUAN

Produk makanan dan minuman hasil fermentasi dikonsumsi secara luas di seluruh dunia. Fermentasi dari produk dilakukan oleh mikroorganisme yang mampu menghasilkan berbagai enzim, seperti protease, amilase, dan lipase. Hasil dari proses fermentasi yang tidak diinginkan adalah komponen toksik sebagai hasil metabolisme dan reaksi sampingan

seperti etil karbamat. Etil karbamat (EC, CAS No. 51-79-6) secara alami terbentuk selama proses fermentasi atau saat penyimpanan (IARC, 2007). Dikarenakan etil karbamat (EC) dapat terbentuk dalam makanan dan minuman selama reaksi yang terjadi selama pemrosesan atau fermentasi makanan dan minuman, itu dianggap sebagai kontaminan proses (Gowd, 2018).

¹ Correspondence author: Setyaning Pawestri. E-mail: setyaning_pawestri@unram.ac.id

Beberapa tahun terakhir, kekhawatiran akibat kandungan etil karbamat dalam produk pangan meningkat dikarenakan sifat genoksisitas dan potensi karsinogeniknya (Hashiguchi, *et al.*, 2010). Pengujian pada hewan yang diinjeksi dengan etil karbamat meningkatkan pertumbuhan tumor dan menyebabkan etil karbamat diklasifikasikan menjadi golongan 2A karsinogen (IARC, 2007). Etil karbamat terbentuk karena adanya reaksi antara urea (hasil metabolisme arginin) dan etanol. Bakteri asam laktat dapat mengkatalis pembentukan urea lewat metabolisme asam amino seperti arginin ataupun metabolisme sitrulin (Arena, *et al.*, 1999).

U.S. Food and Drug Administration (FDA), European Food Safety Agency (EFSA) dan JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) telah melaporkan keberadaan etil karbamat pada berbagai jenis produk makanan dan mengeluarkan panduan mengenai batas maksimum yang diizinkan. Kekhawatiran terhadap efek etil karbamat akibat konsumsi produk hasil fermentasi dan alkohol menarik perhatian dunia terhadap hubungannya dengan kesehatan (WHO, 2006). Kandungan etil karbamat selain menjadi ancaman bagi kesehatan juga tantangan bagi industri pangan yang memanfaatkan proses fermentasi. Oleh karena itu, artikel ini membahas informasi mengenai jalur pembentukan etil karbamat, pengembangan teknik analisis kandungan etil karbamat pada produk pangan, hingga cara mengurangi kandungan etil karbamat dari sebelum fermentasi dan saat fermentasi.

METODE

Kajian literatur disusun dengan mempergunakan metode *literature review narrative*. Langkah pertama adalah melakukan pencarian sumber publikasi ilmiah dari

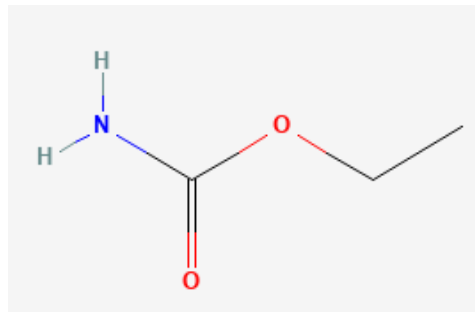
Research Gate, PubMed, Wiley dan Scencedirect. Kata kunci utama yang digunakan adalah *ethyl carbamate*. Kata kunci pendukung adalah urethane, kontaminan proses, deteksi etil karbamat, dan degradasi etil karbamat. Dilanjutkan dengan membuat ulasan abstrak dan isi artikel. Bilamana naskah hanya memiliki kata kunci yang sesuai, tetapi abstrak dan isi artikel tidak memenuhi tujuan kajian literatur maka dilakukan *exclude*. Temuan dari hasil artikel disintesis dan dituangkan dalam kajian literatur.

PEMBAHASAN

Etil Karbamat

Urethane adalah nama generik dari etil karbamat. Etil karbamat merupakan ester dari asam karbamik (NH_2COOH). *International Agency for Research on Cancer* (IARC) menetapkan etil karbamat sebagai golongan 2A (*probably carcinogenic to humans*) dari sebelumnya yang termasuk golongan 2B (*possibly carcinogenic to humans*) (IARC, 2007). Etil karbamat adalah salah satu dari enam zat dalam *Internationally Classified Substance Grouping* yang diprioritaskan untuk screening karena diklasifikasikan oleh lembaga internasional tertentu berpotensi membahayakan kesehatan manusia (Environment and Climate Change Canada Health Canada, 2016).

Dikarenakan bersifat karsinogenik banyak negara mulai mengatur regulasi terhadap kandungan etil karbamat pada produk pangan. Standar etil karbamat yang ditetapkan Kanada untuk *wine* adalah 30 ng/g dan minuman terdistilasi sebesar 150 ng/g didasarkan pada nilai konsumsi harian. Amerika menerapkan standar maksimum 15 ng/g untuk *wine* dan minuman terdistilasi sebesar 150 ng/g. Korea menerapkan kandungan etil karbamat < 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ untuk *wine* dari anggur (Kim, *et al.*, 2015).



Gambar 1. Struktur Senyawa Etil Karbamat (urethane)

Sumber : National Center for Biotechnology Information (2022)

Penilaian skrining menunjukkan bahwa adanya kemungkinan individu terpapar etil karbamat melalui sumber makanan, termasuk minuman beralkohol. Paparan diet terhadap etil karbamat dalam makanan fermentasi lainnya diperkirakan lebih rendah daripada minuman beralkohol. Pada tahun 2016, *Environment and Climate Change Canada and Health Canada (2016)* memeriksa paparan EK menggunakan simulasi Monte Carlo. Pada persentil ke-90 untuk pria dan wanita berusia > 19 tahun, intake EK dari makanan diperkirakan masing-masing sebesar 20,3 dan 20,0 ng/kg bb per hari. Intake EK dari minuman beralkohol untuk pria dan wanita berusia > 19 tahun diperkirakan masing-masing 106,0 dan 59,0 ng/kg bb per hari.

Estimasi JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*)

menegaskan level BMDL 10 (*Benchmark Dose Lower Limit*) etil karbamat adalah 0,3 mg/kg bb per hari dan rerata konsumsi etil karbamat dari makanan \pm 15 ng/kg bb per hari. Perhitungan ini didasarkan pada produk pangan seperti roti, produk susu terfermentasi dan kecap asin. Estimasi ini tidak berlaku untuk minuman beralkohol, dengan rerata konsumsi etil karbamat pada minuman beralkohol yang dapat mencapai 80 ng/kg berat badan per hari (WHO, 2006).

Sifat fisikokimia etil karbamat

Etil karbamat merupakan kristal kolumnar hampir tidak berbau dan tidak berwarna, berbentuk seperti bubuk granular pada suhu kamar. Larut dalam air, etanol, serta pada berbagai pelarut organik. Sifat fisikokimia etil karbamat dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sifat fisikokimia etil karbamat

Sifat fisikokimia	Etil Karbamat
Nama IUPAC	Etil Karbamat
Bentuk	Kristal kolumnar / bubuk granular putih
Rumus kimia	NH ₂ COOC ₂ H ₅
Berat molekul	89,09 g/mol
Kelarutan	air (1 g/0,5 mL), etanol (1 g/0,8 mL), kloroform (1 g/0,9 mL), gliserol (1 g/2,5 mL), dan minyak zaitun (1 g/32 mL).
Suhu didih	182 – 184 °C
Suhu lebur	48 – 80 °C
Flash point	92 °C
pH	netral ketika dilarutkan

Sumber : National Center for Biotechnology Information, 2017

Keberadaan Etil Karbamat pada Bahan Pangan

Pembentukan etil karbamat dalam minuman beralkohol dan makanan lain tergantung pada prekursor kimia dan katalis potensial yang tersedia dalam bahan baku serta kondisi penyimpanan selama fermentasi (misalnya, cahaya, suhu, pH dan durasi waktu) (Environment and Climate Change Canada Health Canada, 2016). Kandungan etil karbamat ditemukan bervariasi pada tiap produk hasil fermentasi seperti roti, yogurt, saus kacang, pasta kedelai, dan kimchi (Kim, *et al.*, 2010) serta pada minuman beralkohol seperti bir, wine, sake, vinegar dan anggur beras Cina (Battaglia, *et al.*, 1990; Hashiguchi, *et al.*, 2010). Konsentrasi etil karbamat terbesar ditemukan pada hasil derivat dari buah berbiji pada spesies *Prunus*

L. (Rosaceae) seperti ceri, buah plum, plum kuning, dan aprikot (Battaglia, *et al.*, 1990; Lachenmeier, *et al.*, 2005).

Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa makanan yang diproduksi dengan melibatkan fermentasi ragi jauh lebih mungkin mengandung EC daripada yang difermentasi oleh bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Ragi menggunakan arginin dan menghasilkan urea, yang bereaksi dengan etanol yang dihasilkan selama fermentasi alkohol untuk membentuk etil karbamat. Pembentukan etil karbamat dari urea disukai pada suhu tinggi. Produk fermentasi non-ragi (misalnya keju) biasanya mengandung tingkat EC yang tidak dapat dideteksi. Data kandungan etil karbamat pada pangan fermentasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan Etil Karbamat pada Produk Hasil Fermentasi

Produk	Negara	Jumlah sampel	Range	Referensi
Minuman				
Bir	China	20	2-3	Wu, <i>et al.</i> (2012)
	Hong Kong	15	ND-5.8	Tang, <i>et al.</i> (2011)
Wine	China	30	9-34	Wu, <i>et al.</i> (2012)
	Hong Kong	20	6.7-47	Tang, <i>al.</i> (2011)
	Korea Selatan	30	2.64 ± 3.71	Kim, <i>et al.</i> (2013)
Anggur beras	China	92	8-515	Wu, <i>et al.</i> (2012)
	Hong Kong	21	2.0-330	Tang, <i>et al.</i> (2011)
	Korea Selatan	8	14.11 ± 9.58	Kim, <i>et al.</i> (2013)
Makanan				
Roti	Hong Kong	15	ND-8.6	Tang, <i>et al.</i> (2011)
Kimchi	Korea Selatan	20	ND-18	Kim, <i>et al.</i> (2000)
Yogurt	Inggris	4	ND	EFSA (2005)
Pasta kedelai	Korea Selatan	7	ND-8	Kim, <i>et al.</i> (2000)
Kecap asin	China	22	8-108	Wu, <i>et al.</i> (2012)
	Hong Kong	5	1.8-17	Tang, <i>et al.</i> (2011)
	Korea Selatan	20	ND-73.3	Kim, <i>et al.</i> (2000)

Mekanisme Pembentukan Etil Karbamat

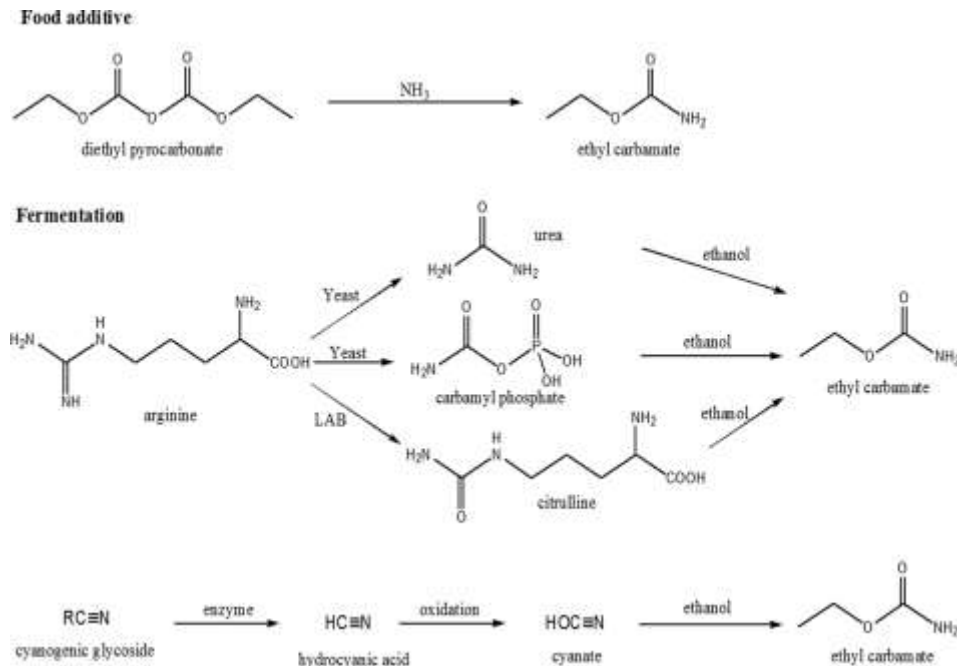
a. Jalur Pembentukan Etil Karbamat

Pembentukan senyawa etil karbamat dapat terjadi melalui beberapa jalur.

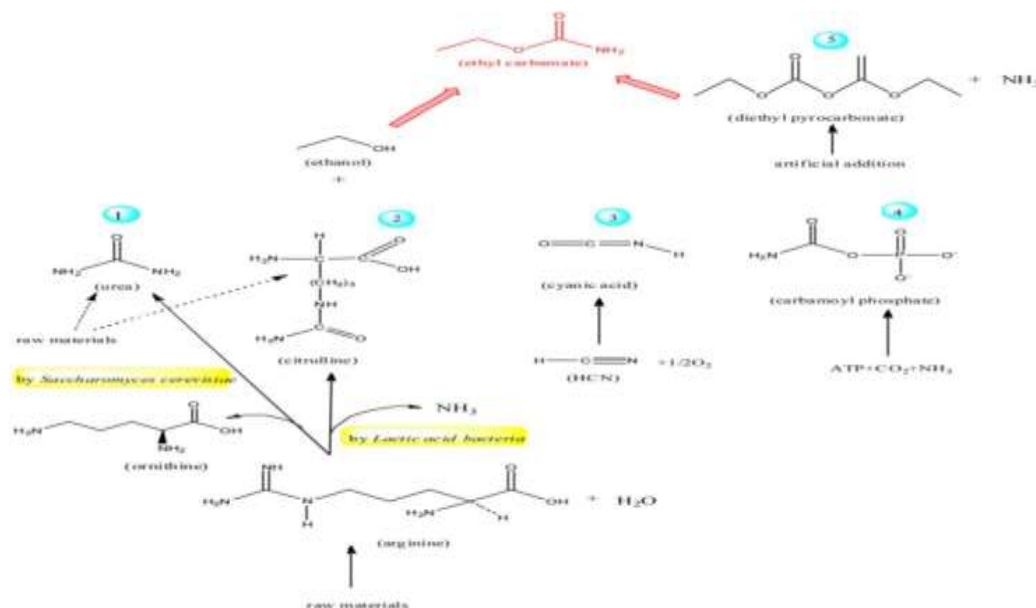
Prekursor dalam pembentukan EK diantaranya kelompok karbamil, termasuk di dalamnya urea, sitrulin, dan fosfat karbamil. Asam sianida dan dietil pirokarbonat juga dapat menjadi prekursor pembentukan EK. Pembentukan EK dapat dipercepat oleh faktor-faktor seperti panas atau pemrosesan termal, transisi logam, kondisi penyimpanan, pH, dan radiasi ultraviolet (UV) (Wu, *et al.*, 2014).

Beberapa senyawa dapat menyediakan gugus fungsi karbamil untuk pembentukan EK. Misalnya, arginin (asam amino dalam anggur) dapat dikatabolisme oleh ragi selama fermentasi untuk menghasilkan urea, sedangkan glikosida sianogenik dalam sumber tanaman tertentu (misalnya, plum dan

biji ceri) menghasilkan sianat melalui aksi enzim yang ada dalam jaringan tanaman. Dalam produksi *wine*, arginin menjadi kontributor kuat pembentukan EK karena arginin berlimpah dalam anggur dan strain ragi yang bertanggung jawab untuk fermentasi anggur dapat memetabolisme arginin menjadi urea atau sitrulin (Wang, *et al.*, 2014). Jalur pembentukan EK via sitrulin cukup jarang terjadi dibanding jalur pembentukan EK via urea. Dua jalur pembentukan etil karbamat dari bahan tambahan pangan dan proses fermentasi dapat dilihat pada Gambar 2. Sedangkan, jalur pembentukan EK oleh *S. cerevisiae* dan BAL disajikan pada Gambar 3.



Gambar 2. Jalur Pembentukan Etil Karbamat dari Bahan Tambahan Pangan dan Proses Fermentasi (BAL dan Khamir)
Sumber: Ryu, *et al.*, (2015)

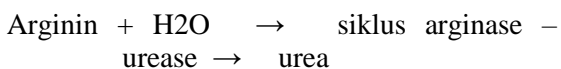


Gambar 4. Jalur Pembentukan Etil Karbamat oleh BAL dan *S. cerevisiae*
 Sumber : Polychroniadou, *et al.*, (2003)

b. Reaksi-Reaksi dalam Pembentukan Etil Karbamat

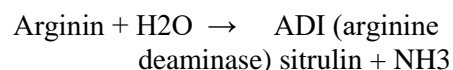
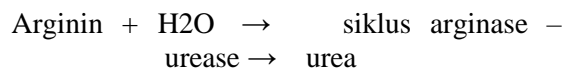
1. Reaksi antara urea dan etanol

Reaksi antara urea dan etanol merupakan jalur paling umum dalam pembentukan etil karbamat pada minuman fermentasi, seperti wine anggur, anggur beras Cina, dan sake. Keberadaan urea dalam jumlah besar dalam anggur, beras dan beberapa sumber bahan yang digunakan dalam fermentasi merupakan prekursor utama pembentukan etil karbamat (Coulon, *et al.*, 2010). Urea juga dapat dihasilkan selama fermentasi etanol, dimana akumulasi urea yang berasal dari derivat proses katabolisme arginin berkontribusi pada reaksi antara urea dan etanol (Dahabieh, *et al.*, 2010). *S. Cerevisiae* merupakan salah satu organisme untuk proses fermentasi yang mengkatabolisme arginin menjadi urea (Messenguy dan Dubois, 2000).



2. Reaksi antara Sitrulin dan Etanol

Sintesis etil karbamat dari sitrulin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat dan etanol dapat terjadi pada wine anggur dan brandi buah (Coulon, *et al.*, 2006). Berbeda dengan *S.cerevisiae* yang menghasilkan urea sebagai derivat proses metabolisme arginin (Messenguy dan Dubois, 2000; Coulon, *et al.*, 2006), pada bakteri asam laktat (BAL) metabolisme arginin menghasilkan sitrulin melalui jalur fermentasi malolaktat (Arena, *et al.*, 1999). Penelitian Azevedo, *et al.* (2002) menunjukkan bahwa produksi sitrulin selama fermentasi menunjukkan hubungan korelasi linier dengan pembentukan etil karbamat sehingga pemantauan jumlah sitrulin dapat diaplikasikan untuk mengantisipasi tingkat potensi etil karbamat melalui korelasi linier mereka.



3. Reaksi antara asam sianida dan etanol

Penelitian Hasiguchi, *et al.* (2010) keberadaan hidrogen sianida pada tanaman dapat dioksidasi menjadi asam sianida dan bereaksi secara subsequent dengan etanol untuk membentuk EC. Pembentukan sianogenik glikosida seperti amygdalin pada buah berbiji oleh enzim (terutama β -glukosidase) memicu pembentukan sianida, yang merupakan prekursor penting dari etil karbamat. Sianida dioksidasi menjadi sianat, yang kemudian bereaksi dengan etanol untuk membentuk etil karbamat (Battaglia, *et al.*, 1990; Lachenmeir, *et al.*, 2005).

4. Reaksi antara fosfat karbamil dan etanol

Etil karbamat dapat terbentuk secara spontan selama penyimpanan dikarenakan reaksi antara kandungan karbamil yang dikeluarkan ketika fermentasi alkohol dan malolaktat (Coulon, *et al.*, 2006). Reaksi antara fosfat karbamil dan etanol sedikit mendapat perhatian dikarenakan fosfat karbamil ekstraseluler masih sedikit dipelajari. Fosfat karbamil fosfat dapat dibentuk dari ATP, NH_3 , dan CO_2 melalui katalisis oleh fosfat karbamil sintetase pada khamir. Dikarenakan ini adalah substrat dari pembentukan arginin, jalur sintesis ini diatur oleh mekanisme regulasi khusus yang disebut kontrol epiarginase dan *nitrogen catabolite repression* (NCR) pada proses fermentasi minuman (Messenguy dan Dubois, 2000).

5. Reaksi antara dietil piro karbonat dan ammonia

Keberadaan dietil pirokarbonat berasal dari zat tambahan artifisial. Sebelum 1960, hasil riset menemukan penambahan dietil pirokarbonat dapat mereduksi kontaminasi dan kerusakan oleh mikroorganisme (khamir atau bakteri) pada produk. Namun, penggunaan dietil pirokarbonat dihentikan dikarenakan efek samping pembentukan etil karbamat sebagai hasil dari reaksi antara

dietil pirokarbonat dengan ammonia (Polychroniadou, *et al.*, 2003).

Toksistas Etil Karbamat

Etil karbamat diduga mengalami metabolisme *in vivo* untuk menghasilkan epoksida vinil karbamat yang sangat reaktif, yang mengikat asam nukleat dan biomakromolekul lainnya. Adduct DNA yang terbentuk dari reaksi dengan senyawa epoksida dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya mutasi yang mengarah pada karsinogenesis. Etil karbamat telah diuji efek genotoksitasnya baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Beberapa hasil penelitian *in vivo* termasuk pengujian assay sel somatik, diantaranya perubahan induksi kromosomal, mikronukleus, dan pertukaran kromatid menunjukkan hasil positif, dengan assay mikronukleus tikus memberi respon terkuat (JECFA, 2006).

Etil karbamat adalah karsinogen multisite dengan periode latensi pendek. Dosis tunggal atau dosis oral jangka pendek pada 100-2000 mg/kg tubuh berat badan telah terbukti menginduksi tumor pada tikus, tikus dan hamster. Kisaran atas dosis ini tumpang tindih dengan standar dosis anestesi (1000 mg/kg berat badan) dan nilai LD50s pada hewan pengerat (WHO, 2006). Penelitian seumur hidup yang dilakukan National Toxicology Program (2004) melakukan penelitian karsinogenitas terhadap tikus jantan dan betina B6C3F1 menunjukkan perlakuan dengan etil karbamat meningkatkan insiden beberapa jenis tumor. Perlakuan pada tikus betina dengan dosis tunggal atau dosis ganda selama masa kehamilan dan menyusui meningkatkan peningkatan kejadian tumor pada keturunannya.

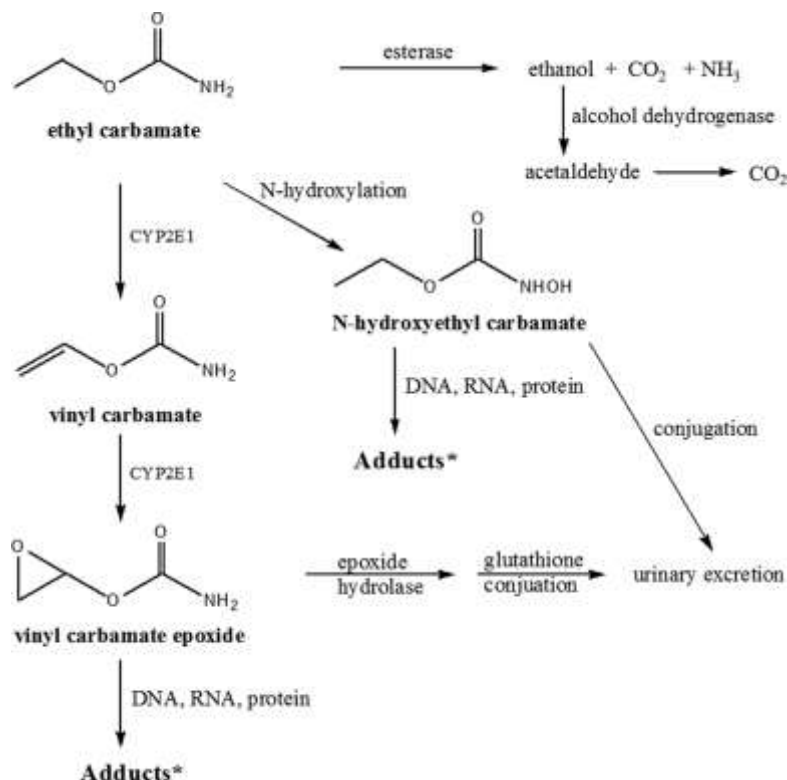
IARC (2010) menyimpulkan bahwa mutagenisitas dan genotoksistas etil karbamat sangat bervariasi antar strain bakteri yang berbeda. Etil karbamat ditemukan memiliki efek mutagenik lemah pada *Salmonella typhmuri*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan jamur. Hasil riset pada kemampuan etil karbamat untuk menginduksi mutasi pada sel mamalia secara *in vitro* juga bervariasi, dengan

respon positif, sering terjadi pada dosis tinggi. Studi tentang klastogenisitas etil karbamat dalam sel manusia secara *in vitro* menunjukkan bahwa etil karbamat dapat menginduksi SCE limfosit manusia dan menyebabkan kerusakan DNA pada fibroblas manusia.

Absorpsi dan Metabolisme Etil Karbamat

Etil karbamat (EK) cepat diserap oleh gastrointestinal (saluran pencernaan) dan kulit dan kemudian didistribusikan ke seluruh tubuh. Di hati, hingga 90% EK yang diserap

dihidrolisis oleh mikrosomal esterase dan dieliminasi sebagai etanol, karbon dioksida, dan amonia (Ryu *et al.* 2015). Pada studi *in vivo* ditunjukkan proses eliminasi EK yang cepat, >90% EK tereliminasi sebagai karbondioksida dalam waktu 6 jam pada tikus. Jalur metabolisme yang berpotensi penting termasuk hidrolisis menjadi etanol dan amonia, dan rantai samping oksidasi menjadi vinil karbamat (WHO 2006). Gambar 5 menunjukkan jalur absorpsi dan metabolisme dari EK.



Gambar 5. Kemungkinan Jalur Aktivasi dan Inaktivasi Metabolisme Etil Karbamat. * Jalur Metabolisme Beracun Ditulis dengan Huruf Cetak Tebal. *Adducts Bertanggung Jawab atas Karsinogenik

Sumber : Ryu, *et al.* (2015)

Metode Analisis Etil Karbamat

Konsentrasi etil karbamat memegang peranan terhadap jaminan mutu dari minuman dan produk fermentasi. Sistem deteksi sangat krusial untuk menentukan

akurasi analisis etil karbamat. Beberapa sistem deteksi yang digunakan diantaranya *flame ionization detection* (FID), alkali FID (AFID), *selective ion monitoring* (SIM), dan *Hall electrolytic conductivity detection*

(HECD) (Lu *et al.* 2009). Lancheimer *et al.* (2005) menggunakan FTIR yang dikombinasikan dengan least square regression untuk analisis screening etil karbamat pada tumbuhan berbiji.

Metode GC-MS (*Gas Chromatography and Mass Spectrometry Detection*) dipandang sebagai metode kuantifikasi etil karbamat yang paling baik untuk saat ini. Metode tandem GC-MS atau

GC-MS-MS dapat meningkatkan spesifitas dan sensitivitas analisis etil karbamat (Lancheimer, *et al.*, 2005). GC-MS telah digunakan sebagai metode referensi oleh European Commission dan International Office of Vine dan Wine (OIV). Metode GC-MS dipilih dikarenakan memiliki sensitivitas penentuan hingga taraf *trace* (Abt, *et al.*, 2021). Metode penentuan kadar etil karbamat pada produk pangan tersaji pada Tabel 3.

Tabel 3. Metode Penentuan Kadar Etil Karbamat pada Produk Fermentasi dan Alkohol

Produk	Standar Internal	Preparasi Sampel		
		Ekstraksi Larutan-Larutan	Ekstraksi Fase Padat	Deteksi
Produk Pangan Fermentasi	Propil karbamat	Ekstraksi dengan CH ₂ Cl ₂ , etil asetat atau petroleum eter	Chem-Elut atau Extrelut Alumina terdeaktivasi	GC-MS/MS
	n-butyl karbamat	Penghilangan senyawa nonpolar dengan n-pentana atau heksana	Celite	GC-FID
	¹³ C, ¹⁵ N-etil karbamat		C ₁₈ Florisil	
	d ₅ -etil karbamat			
Alkohol	Metil karbamat	Ekstraksi dengan CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ atau etil asetat	Chem-Elut atau Extrelut Alumina	GC-MS
	Propil karbamat	Penambahan garam (NaCl, K ₂ CO ₃ atau Na ₂ SO ₄)	Florisil	GC-MS/MS
	n-butyl karbamat	Pengenceran menjadi 5% atau 20% alkohol	Mikroekstraksi fase padat headspace Kopolimer stirenadinilbenzena	GD-ECD
	Tert-butyl karbamat			GC-NPD
	¹³ C, ¹⁵ N-etil karbamat			GC-TEA
	d ₅ -etil karbamat	Penghilangan etanol		GC-FID
	Isopropil karbamat			FTIR-PLS HPLC-FLD

Sumber : Ryu, *et al.*, 2015

Strategi Mitigasi Etil Karbamat pada Pangan

Berbagai metode telah digunakan untuk membatasi pembentukan EC dalam

pangan, dan berbagai penelitian difokuskan untuk memitigasi EK. Praktik mitigasi yang sering digunakan industri dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Praktik Mitigasi Etil Karbamat pada Produk Fermentasi

Metode Mitigasi	Catatan
Ingridien awal	Buah anggur dengan kadar nitrogen yang berlebihan dapat berkontribusi pada pembentukan etil karbamat
Ragi direkayasa genetika	Komersialisasi produk rekayasa genetika ragi dengan peningkatan kemampuan reduksi urea; terbukti roti dan <i>red wine</i> yang dibuat dengan ragi ini membentuk jumlah etil karbamat lebih kecil
Distilasi	Efisiensi pemisahan fraksi kepala dan ekor dari fraksi pusat selama distilasi mereduksi konsentrasi etil karbamat dalam distilat
Penanganan enzimatik (urease)	Tindakan mengurangi konsentrasi urea prekursor etil karbamat; urease memiliki status GRAS dan boleh digunakan dalam proses pembuatan <i>wine</i> oleh OIV
Kondisi penyimpanan	Minuman fermentasi harus terhindar dari suhu tinggi dan sinar UV untuk mereduksi pembentukan EK. Penyimpanan <i>wine beras</i> dan <i>wine table</i> pada suhu 37-43°C meningkatkan konsentrasi EK

Sumber : Abt, *et al.*, 2021

Berdasarkan perkembangan penelitian, selain praktik mitigasi yang sering digunakan industri. Terdapat beberapa metode eksperimental yang dikembangkan untuk menurunkan kadar etil karbamat seperti : (i) modifikasi bahan dasar dan optimasi proses fermentasi; (ii) enzim pendegradasi etil karbamat; dan (iii) modifikasi bakteri untuk fermentasi. Pendekatan ini bertujuan untuk menurunkan prekursor etil karbamat. Praktik mitigasi dan metode eksperimental untuk mengurangi EK pada beberapa jenis alkohol tersaji di Tabel 5.

1. Modifikasi dari Bahan Baku dan Optimasi Proses Fermentasi

Pembentukan etil karbamat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor ini berbeda antara satu produk fermentasi dengan produk fermentasi lainnya. Urea, sitrulin, dan arginin berpartisipasi pada pembentukan etil karbamat pada hampir semua produk fermentasi, dan merupakan sumber nitrogen pada bahan baku. FDA telah merekomendasikan fertilisasi vineyard, kultivar, dan status nutrisi, termasuk menghindari fertilisasi secara luas dengan urea, ammonia, atau N-fertilizer lainnya,

menyediakan cukup tetapi nutrisi tidak berlebihan untuk pertumbuhan sel khamir dan pemilihan kultivar anggur dengan kandungan arginin lebih rendah (US Food and Drug Administration, 1997).

Kondisi fermentasi dapat mempengaruhi pembentukan etil karbamat. Kondisi ini diantaranya pH, suhu, oksigen, waktu penyimpanan, keberadaan bakteri asam laktat atau khamir, konsentrasi etanol, dan iradiasi. Penurunan suhu fermentasi dan penyimpanan, penurunan pH, dan penurunan kandungan alkohol merupakan beberapa cara untuk mengurangi pembentukan etil karbamat (Arena, *et al.*, 1999; Lachenmeier, *et al.*, 2005; Coulon, *et al.*, 2006; Hashiguchi, *et al.*, 2010)

2. Enzim Pendegradasi Etil Karbamat

Penggunaan urethanase untuk secara langsung menurunkan EK telah diusulkan, dan eksperimen yang sedang berlangsung sedang dilakukan untuk menentukan seberapa baik perawatan ini dapat meningkatkan skala. Urethanase dapat mengurangi EK dalam anggur beras dan kedelai saus sebesar 15 hingga 50% (Jia, *et al.*, 2010).

Tabel 5. Cara Mengurangi Kandungan Etil Karbamat dalam Minuman Beralkohol

Produk	Metode
Wine	Asam urease Penambahan diamonium fosfat Suhu yang lebih rendah pH yang lebih rendah Peningkatan ekspresi DUR1, 2 (urea amidolyase) dan DUR3 (urea permease)
Anggur beras/sake	Proses pemurnian bahan baku Suhu yang lebih rendah <i>Knock out</i> CAR1 (arginase) Asam urease
Alkohol ume <i>Spirits</i>	Absorber oksigen/penambahan kalium metabisulfit Prevensi dari paparan cahaya/masa simpan yang lebih pendek Filtrasi arang

Sumber : Ryu, *et al.*, 2015

3. Modifikasi Gen Bakteri untuk Fermentasi

Beberapa strain bakteri asam laktat secara alami memproduksi jumlah sitrulin, prekursor dari etil karbamat dari asam amino arginin dan mensekresikan sitrulin ke produk pangan (US Food and Drug Administration, 1997). Bakteri lain seperti *S.cerevisiae* menghasilkan urea sebagai hasil metabolisme arginin (Messenguy dan Dubois, 2000, Coulon, *et al.*, 2006). Modifikasi bakteri untuk fermentasi dengan mutasi gen diharapkan mampu menurunkan produksi etil karbamat oleh bakteri.

Dengan menggunakan metode penghilangan dan *gene silencing* pada arginase serta meningkatkan atau menurunkan ekspresi gen yang berhubungan dengan metabolisme urea sehingga bakteri hasil mutasi memiliki potensi aplikasi pada proses fermentasi komersial. *Silencing* dari gen pengeksresi arginase akan mengurangi proses katalisis arginin sehingga menurunkan jumlah urea dan ornitin yang menjadi prekursor pembentukan etil karbamat (Coulon, *et al.*, 2010).

DAFTAR PUSTAKA

- Abt, E., Incorvati, V., Robin, L.P., Redan, B.W. 2021. Occurrence of Ethyl Carbamate in Foods and Beverages: Review of the Formation Mechanisms, Advances in Analytical Methods, and Mitigation Strategies. *J Food Prot.* 84(12):2195-2212. doi: 10.4315/JFP-21-219. PMID: 34347857; PMCID: PMC9092314.
- Arena, M., Saguir, F., Manca de Nadra, M. 1999. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Intl J Food Microbiol* 52(3):155– 161.
- Azevedo, Z., Couto, J., Hogg, T. 2002. Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. *Lett Appl Microbiol.* 34(1):32– 36.
- Battaglia, R., Conacher, H.B.S., Page, B.D. 1990. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. *Food Addit Contam.* 7(4):477-496.

- Coulon, J., Husnik, J.I., Inglis, D.L., Merwe, G.K., Lounvaud, A., Erasmus, D.J., Vuuren, H.J.J. 2006. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *Am J Enol Vitic.* 57:113-124.
- Dahabieh, M., Husnik, J.I., Van Vuuren, H. 2010. Functional enhancement of sake yeast strains to minimize the production of ethyl carbamate in sake wine. *J Appl Microbiol* 109(3):963–973.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages. *EFSA J.* 551:1-44.
- Environment and Climate Change Canada Health Canada. 2016. Screening Assessment Internationally Classified Substance Grouping Carbamic acid, ethyl ester (Ethyl carbamate). https://publications.gc.ca/collections/collection_2016/eccc/En14-254-2016-eng.pdf. Diakses 22 Juni 2022.
- Famuyiwa, O.O., Ough, C. 1991. Modification of acid urease activity by fluoride ions and malic acid in wines. *Am J Enol Viticult.* 42(1):79–80.
- Gowd, V., Su, H., Karlovsky, P., Chen, W. 2018. Ethyl carbamate: an emerging food and environmental toxicant. *Food Chem.* 248:312–321. [PubMed: 29329860]
- Hashiguchi, T., Horii, S., Izu, H., Sudo, S. 2010. The concentration of ethyl carbamate in commercial ume (*Prunus mume*) liqueur products and a method of reducing it. *Biosci Biotechnol Biochem* (BBB). 74(10):2060–2066.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2007. Alcoholic beverage consumption and ethyl carbamate (urethane). IARC Vol. 96. Geneva (Switzerland): World Health Organization. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/vol96-summary.pdf/>. Diakses 22 Juni 2022.
- _____. 2010. Urethane. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans: Alcohol Consumption and Ethyl Carbamate. Volume 96. World Health Organization. IARC. Lyon, France
- Jia, Y., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Fang F. 2020. Identification of an urethanase from *Lysinibacillus fusiformis* for degrading ethyl carbamate in fermented foods. *Food Biosci.* 36:100666.
- Kim, Y.K., Koh, E., Chung, H.J., Kwon, H.J. 2000. Determination of ethyl carbamate in some fermented Korean foods and beverages. *Food Addit Contam.* 17(1): 469-475.
- Kim, D.H., Jang, H.S., Choi, G.I., Kim, H.J., Kim, H.J., Kim, H.L., Kim, K.S. 2013. Determination of residue levels of ethyl carbamate in alcoholic beverages by gas chromatography/ tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Saf.* 1: 63-68.
- Kim, Y.G., Lyu, J., Kim, M.K., Lee, K.G. 2015. Effect of citrulline, urea, ethanol, and urease on the formation of ethyl. *Food Chem.* 189:74-79.
- Lachenmeier, D.W., Schehl, B., Kuballa, T., Frank, W., Senn, T. 2005. Retrospective trends and current status of ethyl carbamate in German stone-fruit spirits. *Food Addit Contam.* 22(5):397–405.
- Lu, D., Wang, G., Xiong, L., Wen, Y. 2009. Rapid determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages with GC/MS coupling with supported liquid-liquid extraction. *J Chin Mass Spectrom Soc* 30:145–8.
- Messenguy F, Dubois E. 2000. Regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a network of specific and pleiotropic proteins in response to multiple environmental

- signals. *Food Sci Biotechnol.* 38(4):277–285.
- National Center for Biotechnology Information. 2017. PubChem Compound Database; CID=5641. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5641> Diakses 25 Juni 2022.
- _____. 2022. PubChem Compound Summary for CID 5641, Urethane. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Urethane>. Diakses 1 Juli 2022.
- National Toxicology Program (NTP). 2004. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Urethane, Ethanol, and Urethane/Ethanol (Urethane, CAS No. 51-79-6; Ethanol, CAS No. 64-17-5) in B6C3F1 Mice (*Drinking Water Studies*).
- Polychroniadou, E., Kanellaki, M., Iconomopoulou, M., Koutinas, A., Marchant, R., Banat, I. 2003. Grape and apple wines volatile fermentation products and possible relation to spoilage. *Bioresour Technol.* 87(3):337–339.
- Ryu, D., Choi, B., Kim, E., Park, S., Paeng, H., Kim, C.I., Lee, J.Y., Yoon, H.J., Koh, E. 2015. Determination of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages and Fermented Foods Sold in Korea. *Toxicol Res.* 31(3):289-97. doi: 10.5487/TR.2015.31.3.289. PMID: 26483888; PMCID: PMC4609976.
- Tang, A.S., Chung, S.W., Kwong, K., Xiao, Y., Chen, M.Y., Ho, Y.Y., Ma, S.W. 2011. Ethyl carbamate in fermented foods and beverages: dietary exposure of the Hong Kong population in 2007-2008. *Food Addit. Contam. Part B*, 4, 195-204.
- US Food and Drug Administration. 1997. Ethyl carbamate preventative action manual. center for food safety and applied nutrition. <http://www.fda.gov/downloads/food/foodborneillnesscontaminants/ucm119802.pdf>. Diakses 22 Juni 2022.
- Wang, P., Sun, J., Li, X., Wu, D., Li, T., Lu, J., Chen, J., Xie, G. 2014. Contribution of citrulline to the formation of ethyl carbamate during Chinese rice wine production. *Food Addit. Contam. Part A.* 31:587–592.
- World Health Organization (WHO). 2006. Safety evaluation of certain contaminants in food: sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_930_eng.pdf/. Diakses 25 Juni 2022.
- Wu P, Cai C, Shen X, Wang L, Zhang J, Tan Y, Jiang W, and Pan X. 2014. Formation of ethyl carbamate and changes during fermentation and storage of yellow rice wine. *Food Chem.* 152:108–112. [PubMed: 24444913].