

VALIDASI METODE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION UNTUK DETEKSI DNA BABI (*SUS SCROFA DOMESTICA*) DAN CELENG (*SUS BARBATUS*) PADA SOSIS SAPI

Mariyani, Sismindari, Rumiya

Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta, Indonesia

Email: mariyani@mail.ugm.ac.id, sismindari@gmail.com, rumiyaris@ugm.ac.id

Abstrak

Babi (*Sus scrofa domestica*) dan celeng (*Sus barbatus*) hewan satu spesies yang memiliki kemiripan sangat tinggi, perbedaan keduanya dilihat dari susunan basa DNA yang dimiliki. Metode analisis DNA antara babi dan celeng banyak yang belum berhasil membedakan kedua spesies tersebut seperti pada penelitian yang dilakukan Hikmah (2019) untuk membedakan babi dan celeng menggunakan primer Nk-ND1 dengan metode *real time* PCR namun berhasil mendapatkan perbedaan basa antara fragmen DNA babi dan celeng dari hasil sekuensing sehingga perbedaan urutan basa tersebut dijadikan sebagai primer spesifik babi untuk membedakan kedua spesies babi dan celeng dengan metode *real time* PCR. Lima spesies hewan yang digunakan yaitu babi, celeng, sapi, kambing dan ayam, primer babi forward 5'-GATGCCCTAAACTATTCACC-3' dari hasil sekuensing dan primer babi reverse yaitu 5'-TAGTGCTAGGGATAAGGCTAGG-3' desain, SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), proteinase-K (Invitrogen), isolasi DNA menggunakan *Geneaid Genomic DNA Mini Kit*. Validasi metode *real time* PCR dengan uji spesifitas primer terhadap 5 isolat DNA jaringan segar, uji efisiensi dan sensitivitas pada 6 konsentrasi DNA (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 dan 0,0005 ng) dan sosis referensi campuran daging sapi:babi (100%; 50%; 25%; 10%; 5% dan 1%), uji keterulangan dilakukan sebanyak 5 kali replikasi. Hasil analisis menunjukkan sepasang primer spesifik terhadap DNA babi dan celeng. Efisiensi DNA babi yaitu 109,5% dan $R^2 = 0,967$, efisiensi celeng 99,1% dan $R^2 = 0,999$. Batas deteksi absolut DNA babi dan celeng yaitu 0,05 ng/ μ L dan 0,5 ng/ μ L, batas deteksi relatif sosis babi yaitu 5% dan sosis celeng 1%. Nilai RSD rata-rata pada analisis keterulangan DNA babi dan celeng yaitu 4,210% dan 3,611%. Pada sampel tidak terdeteksi adanya DNA babi dan celeng, secara kuantitatif metode ini tidak memenuhi persyaratan validasi.

Kata Kunci: *real-time* PCR; babi (*Sus scrofa domestica*); DNA celeng (*Sus barbatus*); validasi

Abstract

Pigs (Sus scrofa domestica) and boars (Sus barbatus) are animals of one species that have a very high similarity, the difference between the two is seen from the base arrangement of DNA. Dna analysis method between pigs and boars many have not managed to distinguish the two species as in the study conducted Hikmah (2019) to distinguish pigs and boars using primer Nk-ND1 with real time PCR

How to cite:	Mariyani, M. (2021). Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi DNA Babi (<i>Sus Scrofa Domestica</i>) dan Celeng (<i>Sus Barbatus</i>) pada Sosis Sapi. <i>Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia</i> , 6(8). http://dx.doi.org/10.36418/Syntax-literate.v6i8.3806
E-ISSN:	2548-1398
Published by:	Ridwan Institute

method but managed to get the difference between the dna fragments of pigs and boars from the results of sequencing so that the difference in the order of the base is used as a specific primer pig to distinguish the two species of pigs and boars with real time pcr method. The five animal species used are pigs, boars, cows, goats and chickens, forward pig primer 5'-GATGCCCTAAAACCTATTCACC-3' from sequencing results and reverse pig primer i.e. 5'-TAGTGCTAGGGATAAGGCTAGG-3' Hikmah design (2019), SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), proteinase-K (Invitrogen), DNA isolation using Geneaid Genomic DNA Mini Kit. Validation of real time PCR method with primary specificity test against 5 isolates of fresh tissue DNA, efficiency and sensitivity tests on 6 DNA concentrations (50; 5; 0.5; 0.05; 0.005 and 0.0005 ng) and reference sausages of beef:pork mixture (100%; 50%; 25%; 10%; 5% and 1%), recurrence tests were conducted 5 times replication. The results of the analysis showed a specific pair of primers on the DNA of pigs and boars. Pig DNA efficiency is 109.5% and $R^2 = 0.967$, boar efficiency is 99.1% and $R^2 = 0.999$. The absolute detection limit of pig and boar DNA is 0.05 ng/ μ L and 0.5 ng/ μ L, the relative detection limit of pig sausage is 5% and boar sausage is 1%. The average RSD value in the analysis of the recurrence of pig and boar DNA was 4.210% and 3.611%. In the sample there is no detectable presence of dna of pigs and boars, quantitatively this method does not meet the validation requirements.

Keywords: real-time PCR; pig (*Sus scrofa domestica*); DNA of boars (*Sus barbatus*); Validation

Pendahuluan

Mayoritas penduduk Indonesia merupakan umat muslim sehingga pangan yang beredar harus terjamin kehalalannya Umat Islam mengikuti hukum yang ada dalam Alquran. melarang umat muslim makan atau menggunakan produk apa pun yang berasal dari babi (Nakyinsige, Man, & Sazili, 2012). Populasi manusia yang semakin meningkat dan aktivitas yang semakin padat sehingga dalam hal konsumsi pangan cenderung memilih makanan yang siap dimasak maupun siap dimakan (Palandeng, Mandey, & Lumoindong, 2016) salah satunya produk olahan daging.

Maraknya pemalsuan daging sapi sering ditemukan seperti yang ditemukan oleh Balai Besar Veteriner Wates Yogyakarta sebanyak 17,71% sampel mengandung daging babi (Gusti, 2014). Cemarkan daging babi dan celeng juga ditemukan pada produk olahan daging (Priyanka, 2017), (Septiani, 2019), (Aina, Erwanto, Motalib Hossain, Ali, & Rohman, 2019). Beberapa metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya campuran daging babi pada produk olahan makanan yaitu metode spektroskopi FTIR (Guntarti, Rohman, Martono, & Yuswanto, 2017); (Rohman, Erwanto, & Man, 2011) dan analisis berbasis protein yaitu ELISA (Cahyaningsari, Latif, & Sudarnika, 2019).

Celeng (*Sus barbatus*) merupakan nenek moyang dari babi (*Sus scrofa domestica*) sehingga memiliki kemiripan, karena hal tersebut daging babi (*Sus scrofa domestica*) maupun daging celeng (*Sus barbatus*) sering menjadi sasaran pemalsuan produk olahan makanan yang berbahan dasar daging, sehingga perlu adanya metode yang sensitive yang mampu medeteksi adanya campuran daging yang tidak diharapkan pada olahan

Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi DNA Babi (*Sus Scrofa Domestica*) dan Celeng (*Sus Barbatus*) pada Sosis Sapi

makanan dan mampu membedakan antara kedua spesies tersebut. Metode analisis berbasis DNA dapat diandalkan untuk menentukan kehalalan produk karena sangat baik dalam mengidentifikasi cemaran daging yang tidak diinginkan. DNA bersifat relatif stabil pada suhu tinggi (Aida, Man, Wong, Raha, & Son, 2005). Metode berbasis DNA Identifikasi cemaran daging babi dengan menggunakan *real-time* PCR juga telah dilakukan sebelumnya (Hikmah, 2019); (Maryam, Sismindari, Raharjo, Sudjadi, & Rohman, 2016); (Raharjo & Rohman, 2016).

Beberapa penelitian mengenai deteksi DNA babi dan DNA celeng telah berhasil dilakukan dan mampu membedakan antara kedua spesies babi dan celeng diantaranya penggunaan primer CYTBWB2-wb spesifik terhadap babi hutan (Aina et al., 2019), primer spesifik spesies pada DNA babi hutan Sumatra (Mutalib et al., 2012), perbedaan genetik antara babi dan babi hutan yang berhasil dikonfirmasi menggunakan analisis PCR-RFLP (Mutalib et al., 2012).

Selain itu banyak metode yang belum mampu membedakan antara DNA celeng dan DNA babi menggunakan primer spesifik babi dengan metode *real time* PCR seperti yang dilakukan (Hikmah, 2019) mendesain primer spesifik yang dapat membedakan DNA babi dan celeng, namun hasilnya belum dapat membedakan DNA babi dan celeng pada sosis ayam dimana hasil *real-time* PCR masih memberikan respon amplifikasi terhadap DNA celeng. Dari hasil sekuensing yang dilakukan, diperoleh hasil pensejajaran fragmen DNA babi dan celeng dimana terdapat perbedaan basa antara fragmen DNA babi (*Sus scrofa domestica*) dan celeng (*Sus barbatus*). Mengacu hasil sekuensing yang diperoleh Hikmah pada tahun 2019, perbedaan basa pada kedua sekuen tersebut dijadikan sebagai primer yang lebih spesifik terhadap babi. Pada penelitian ini menggunakan primer babi forward yang berbeda dari peneliti sebelumnya yaitu 5'-GATGCCCTAAACTATTCACC-3' diperoleh dari perbedaan basa pada sekuen antara babi dan celeng hasil sekuensing (Hikmah, 2019) sebagai keterbaruan dalam penelitian ini dan primer reverse yaitu 5'-TAGTGCTAGGGATAAGGCTAGG-3' hasil desain primer (Hikmah, 2019).

Metode Penelitian

Sampel daging celeng (*Sus barbatus*) diperoleh dari Provinsi Kalimantan Timur, daging babi (*Sus scrofa domestica*) diperoleh dari peternak babi di D.I Yogyakarta, daging ayam, sapi dan kambing diperoleh dari pasar tradisional Yogyakarta. Sampel sosis di peroleh secara acak dari supermarket yang ada di Provinsi D.I Yogyakarta. Primer babi forward 5'- GATGCCCTAAACTATTCACC-3' diperoleh dari perbedaan basa pada sekuen antara babi dan celeng hasil sekuensing (Hikmah, 2019) dan primer reverse yaitu 5'-TAGTGCTAGGGATAAGGCTAGG-3' hasil desain primer spesifik babi (Hikmah, 2019).

A. Isolasi DNA dan Pengukuran Kemurnian

Isolasi DNA dilakukan menggunakan *Geneaid Genomic Mini Kit (Tissue)* GT050 sesuai dengan protokol. Analisis kemurnian DNA hasil isolasi diukur pada panjang gelombang 260nm dan konsentrasi hasil isolasi DNA diukur absorbansinya

pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}) dikalikan dengan faktor pengenceran dan konstanta penyerapan (50 $\mu\text{l/ml}$) (Orbayinah, Widada, Hermawan, Sudjadi, & Rohman, 2019).

B. Analisis amplifikasi DNA dengan real-time PCR

1. Protokol *Real Time* PCR

Formula campuran reaksi yang digunakan untuk running *real - time* PCR dengan total volume 10 μL yang terdiri dari Ssofast Evagreen® supermix 5 μL , forward primer babi 0,5 μL (10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$) , reverse primer babi 0,5 μL (10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$), DNA 0,5 μL (50 ng) dan air bebas nuklease 3,5 μL , dengan tahap denaturasi awal diatur pada suhu 95°C selama 30 detik, annealing pada 54,4°C (hasil optimasi suhu penempelan primer) selama 30 detik dan elongation pada 72°C selama 10 detik sebanyak 25 siklus.

2. Optimasi Suhu Penempelan Primer

Optimasi suhu penempelan primer babi yang digunakan berkisar antara 53°C hingga 60°C berdasarkan hasil perhitungan suhu *annealing* primer. Dengan menggunakan lima suhu yang mewakili dari range tersebut yaitu 53,35°C; 54,4°C; 56°C; 57,9°C & 59,5°C.

3. Uji Spesifitas Primer

Spesifitas primer dikonfirmasi dengan mengamplifikasi 50 ng/ μL DNA babi, celeng, ayam, sapi, dan kambing serta kontrol negative tanpa DNA yang disebut dengan NTC (*No Templat Control*). Protokol real time PCR yang digunakan merupakan hasil optimasi suhu annealing primer yang telah dilakukan sebelumnya. primer spesifik terhadap spesies babi apabila hanya terdapat 1 melt curve yang terbentuk.

4. Validasi *Real Time* PCR untuk Analisis Kuantitatif.

Validasi metode *real time* PCR secara kuantitatif mencakup spesifitas, efisiensi yang ditentukan dari kurva kalibrasi, sensitivitas dan pengulangan pengujian pada analisis DNA secara *real time* PCR (Anonim, 2010).

Efisiensi diuji berdasarkan nilai Ct dri minimal 6 seri kadar konsentrasi atau lebih baik pada DNA daging babi murni dan celeng (50; 5; 0,5; 0,005; dan 0,0005 ng/ μL) dan isolate DNA sosis babi 100% dan sosis celeng konsentrasi 100% (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005; dan 0,0005 ng/ μL) (Orbayinah et al., 2019). Nilai efisiensi yang baik pada kisaran 90-105% (Bio-Rad, 2006).

Sensitifitas atau batas deteksi untuk melihat konsentrasi erkecil yang masih dapat di amplifikasi. Batas deteksi absolut diukur dengan amplifikasi seri pengenceran DNA jaringan segar daging babi dan celeng (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005; dan 0,0005 ng/ μL). Sedangkan untuk sosis referensi LOD relatif diukur berdasarkan konsentrasi formula sosis sebagai referensi yang mengandung babi (100%; 50%, 25%, 10%; 5% dan 1%).

Uji keterulangan dinilai berdasarkan nilai koefisien variasi (CV) dari 5 kali replikasi amplifikasi DNA hasil isolasi sampel yang sama pada daging babi dan daging celeng konsentrasi 50 ng/ μL . Syarat keberterimaan repeatabilitas untuk

Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi DNA Babi (*Sus Scrofa Domestica*) dan Celeng (*Sus Barbatus*) pada Sosis Sapi

metode *real-time* PCR yaitu RSD <25% (Luque-Perez et al., 2013). Analisis pada sampel pasaran menggunakan 4 sosis sapi yang diambil secara acak dari berbagai supermarket yang ada di D.I Yogyakarta.

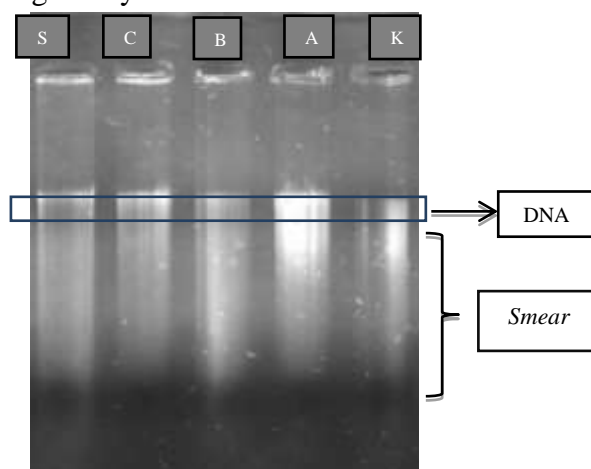
Hasil dan Pembahasan

Upaya menjamin kehalalan dari suatu produk yang beredar khususnya makanan berbahan dasar daging perlu perhatian khusus dari pemerintah maupun instansi terkait untuk menjamin keamanan dan kehalalan produk yang berlabel halal karena maraknya produk berlabel halal palsu.

Sejalan dengan amanat Undang-Undang Nomor 33 Tahun 2014 tentang jaminan produk halal yang menyatakan bahwa seluruh produk yang beredar dan diperdagangkan di Indonesia wajib bersertifikat halal, pada penelitian ini dilakukan identifikasi DNA babi maupun celeng dalam produk sosis dengan menggunakan primer babi forward 5'- GATGCCCTAAACTATTCACC-3' dan primer reverse yaitu 5'-TAGTGCTAGGGATAAGGCTAGG-3'

A. Isolasi DNA pada berbagai spesies

Hasil isolat DNA dilakukan pengujian secara kualitatif untuk mendeteksi adanya DNA dengan melarutkan gel agarosa dalam larutan buffer TBE untuk menjaga kesetimbangan pH saat migrasi fragmen DNA berlangsung, karena perubahan pH dapat mendenaturasi struktur DNA sehingga mengubah elektromobilitas DNA (Badrut MH, 2012). DNA molekul bermuatan negatif sehingga jika diberikan medan listrik pada kedua ujung gel maka DNA yang bermuatan negative akan bergerak dari kutub negative (katoda) menuju kutub positif (anoda) (Sismindari, 2012). Hasil elektroforesis el agarosa isolate DNA seperti yang ditunjukkan pada gambar 1 terlihat adanya pita DNA yang diikuti smear pada hasil elektroforesis gel agarose. Pita DNA yang paling terang dan tebal pada sampel ayam yang menunjukkan bahwa pada isolate DNA ayam memiliki konsentrasi yang tinggi diantara isolate DNA yang lainnya.



Gambar 1
Hasil Elektroforesis Gel Agarose Isolate Berbagai Spesies
(sapi, celeng, babi, ayam, kambing)

Pengujian secara kuantitatif dengan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA yang ditunjukkan pada tabel 1 menunjukkan nilai konsentrasi dan kemurnian isolat DNA yang berbeda, pada sampel isolate DNA sapi, babi, dan celeng memiliki kemurnian DNA 1,9. Isolat DNA ayam dan babi memiliki kemurnian >2, hal ini menandakan bahwa adanya kontaminan RNA karena RNA juga menyerap pada panjang gelombang 260 nm sehingga serapan DNA berkurang (Maftuchah, Winaya, A., dan Zainuddin, 2014); (Marín, Castillo, López-Lavalle, Chalarca, & Pérez, 2021).

Tabel 1
Hasil Kemurnian Isolat DNA Berbagai Spesies

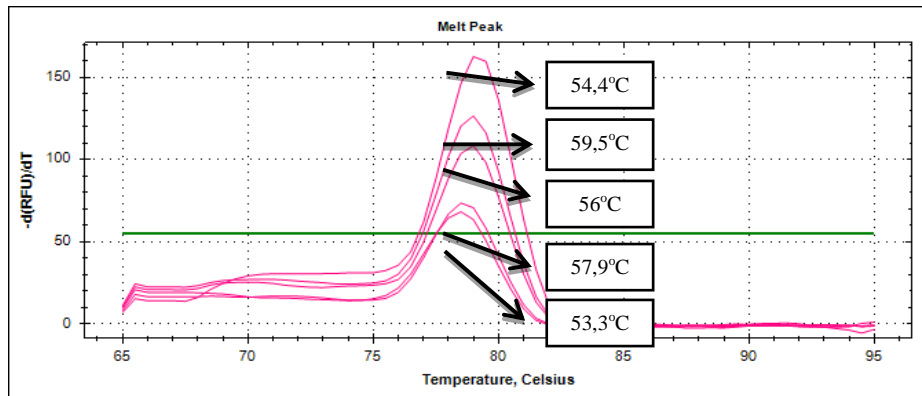
No.	Jenis Daging	ng/ μ l	Indeks Kemurnian (A_{260}/A_{280})
1	Sapi	46.64	1.97
2	Celeng	58.26	1.91
3	Babi	71.24	1.96
4	Ayam	118.21	2.04
5	Kambing	57.09	2.09

B. Optimasi suhu penempelan primer

Berdasarkan T_m primer hasil BLAST yaitu primer forward $54,33^{\circ}\text{C}$ dan primer reverse $57,95^{\circ}\text{C}$. Suhu penempelan primer biasanya berada dibawah 5°C suhu T_m diperoleh perkiraan suhu optimum 56°C , sehingga dilakukan running *real time*-PCR untuk optimasi suhu penempelan primer diuji pada 5 suhu yang berbeda dengan menggunakan range 8 yaitu $53,35^{\circ}\text{C}$; $54,4^{\circ}\text{C}$; 56°C ; $57,9^{\circ}\text{C}$ & $59,5^{\circ}\text{C}$.

Optimasi suhu dilakukan untuk mengetahui suhu penempelan optimum dari primer yang dapat mengamplifikasi target, pemilihan suhu berdasarkan jumlah respon fluoresensi (RFU) yang tinggi dan jumlah siklus yang kecil. Hasil *running real time* PCR menunjukkan data *melt peak* pada 5 suhu yang mewakili sebagai suhu uji coba. Kurva yang memberikan jumlah respon fluoresensi (RFU) tertinggi pada suhu $54,4^{\circ}\text{C}$ dan pada *melt peak* denaturasinya mempunyai puncak tertinggi berarti pada suhu tersebut jumlah amplikon yang terbentuk paling banyak (gambar 2). Sehingga suhu $54,4^{\circ}\text{C}$ yang dipilih sebagai suhu optimum untuk penempelan primer.

Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi DNA Babi (*Sus Scrofa Domestica*) dan Celeng (*Sus Barbatus*) pada Sosis Sapi

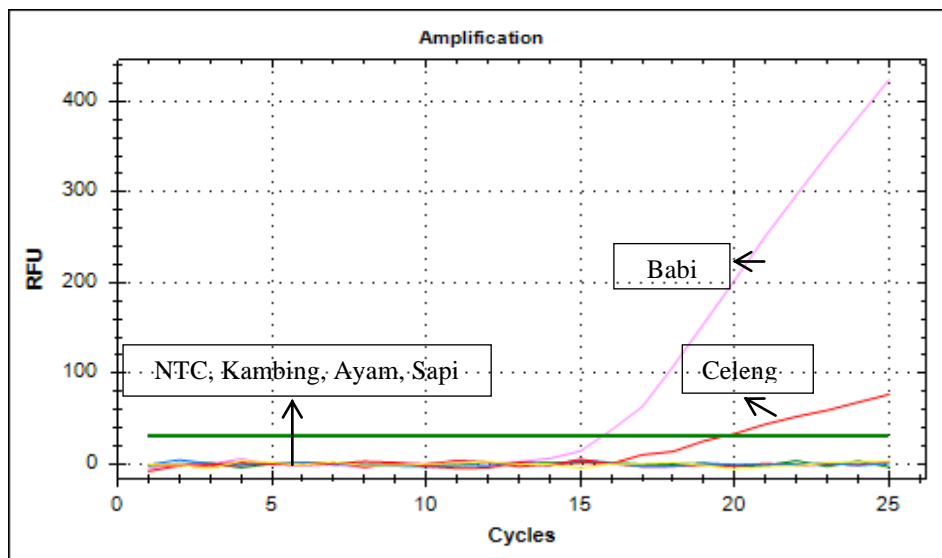


Gambar 2

Melt Peak Hasil Optimasi Suhu Penempelan Primer Babi Pada DNA Babi 25 Siklus, Menggunakan Real Time PCR

C. Uji spesifitas primer

Pada uji spesifitas primer digunakan suhu dari hasil optimasi sebelumnya yaitu suhu 54,4°C menguji spesifitas primer babi terhadap spesies target DNA babi dan 4 spesies DNA non target yaitu celeng, kambing, ayam dan sapi yang digunakan untuk memastikan bahwa primer tersebut hanya spesifik terhadap DNA babi.



Gambar 3

Hasil Amplifikasi Spesifitas Primer Babi Terhadap DNA Celeng, Babi, Ayam, Sapi dan Kambing 25 Siklus Menggunakan Real Time-PCR

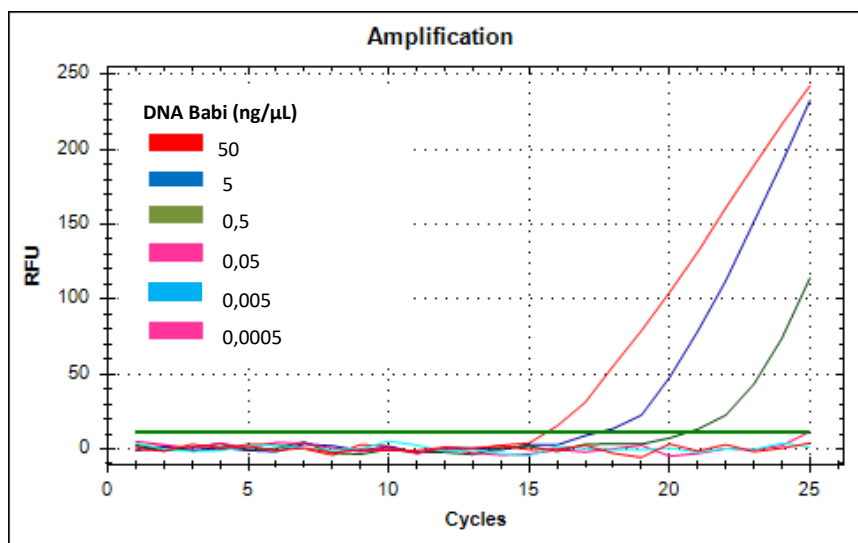
Berdasarkan hasil amplifikasi seperti yang ditunjukkan pada gambar 3 primer yang digunakan mampu mengamplifikasi DNA babi pada siklus 15,72, selain DNA babi ternyata juga mampu memberikan respon amplifikasi terhadap DNA celeng yang memberikan hasil amplifikasi di siklus 19,70 seperti terlihat pada gambar 3. Meskipun primer babi yang digunakan ini tidak hanya spesifik terhadap DNA babi namun juga spesifik terhadap DNA celeng, hal ini menjadi suatu keuntungan

terhadap analisis non halal karena primer tersebut mampu mendeteksi adanya DNA babi maupun DNA celeng pada produk yang akan dianalisis untuk menjamin kehalalannya.

D. Uji batas deteksi

Uji efisiensi dan batas deteksi absolut dilakukan pada rangkaian pengenceran 10 kali lipat dengan lima seri kadar konsentrasi isolat DNA daging babi dan daging celeng yaitu 50 ng; 5 ng; 0,5 ng, 0,05 ng; 0,005 ng dan 0,0005 ng. Batas deteksi relatif merupakan kemampuan untuk mengenali rasio terendah spesies target dalam campuran daging, dan batas deteksi absolut yaitu kemampuan untuk mengenali jumlah template terendah dari spesies target (Li, Li, Liu, Wei, & Wang, 2021).

1) Jaringan segar babi

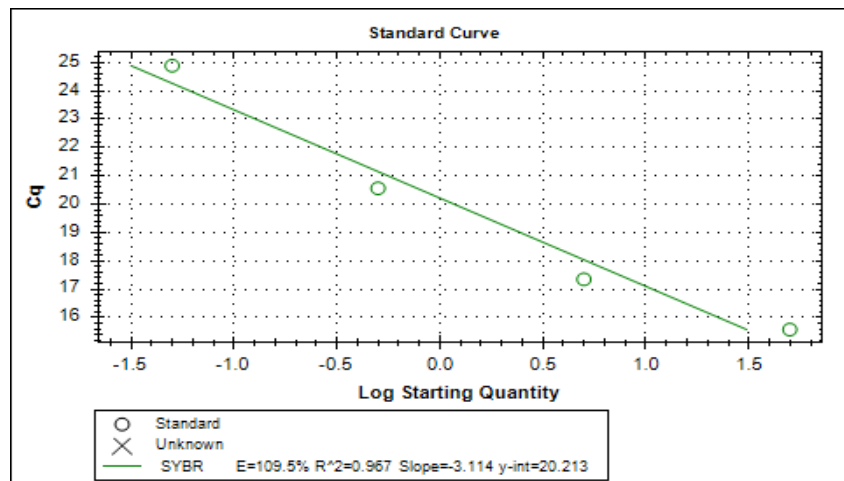


Gambar 4

Hasil Amplifikasi Seri Pengenceran DNA Jaringan Segar Babi dengan Real Time-PCR. Konsentrasi DNA Babi 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 dan 0,0005 ng/µl

Hasil amplifikasi dari lima seri pengenceran DNA babi ditampilkan pada gambar 5 menunjukkan bahwa empat seri pengenceran DNA babi dapat teramplifikasi yaitu 50 ng, 5 ng, 0,5 ng dan 0,05 ng pada nilai Cq berturut-turut yaitu 15,58; 17,35; 20,56 dan 24,89 sedangkan pada pengenceran 0,005 ng dan 0,0005 ng sudah tidak dapat teramplifikasi dengan menggunakan 25 siklus pada *real time* – PCR. Dapat dikatakan batas deteksi absolut pada DNA babi yaitu 0,05 ng/µL.

Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi DNA Babi (*Sus Scrofa Domestica*) dan Celeng (*Sus Barbatus*) pada Sosis Sapi



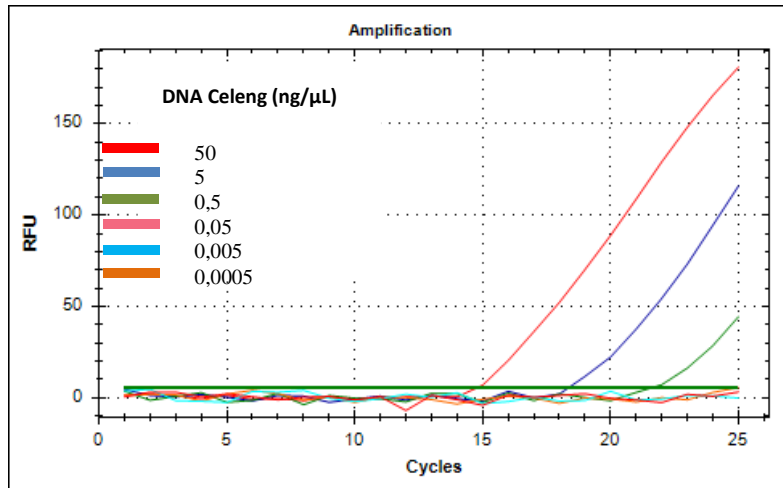
Gambar 5

Kurva Baku Seri Pengenceran DNA Jaringan Segar Babi Real Time-PCR. Konsentrasi DNA Babi 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 Dan 0,0005 Ng/μl

Kurva standar memberikan informasi mengenai seberapa baik kinerja reaksi dengan berbagai parameter reaksi yaitu efisiensi, R^2 dan slope. Berdasarkan hasil amplifikasi dari lima seri pengenceran DNA babi, dibuat kurva baku yang di tampilkan pada gambar 5. Pada kurva baku DNA babi diperoleh nilai $E = 109,5\%$, $R^2 = 0,967$ dan $\text{slope} = -3,114$. Nilai E yang dihasilkan memiliki nilai efisiensi yang baik antara 90%-110% yang sesuai dengan nilai slope yaitu antara -3,58 dan -3,10 (Tan et al., 2020). Untuk nilai R^2 yang diperoleh tidak memenuhi nilai keberterimaan yaitu $R^2 > 0,980$. R^2 dari kurva baku untuk melihat seberapa baik data penelitian mengikuti garis regresi, linearitas memberikan perubahan pengukuran replikasi dan melihat apakah efisiensi amplifikasi tetap sama atau tidak (Anonim, 2010); (Bio-Rad, 2006); (Luque-Perez et al., 2013). Sensitivitas uji PCR bergantung pada kualitas DNA karena adanya inhibitor PCR seperti lemak, glikogen, polisakarida dan mineral yang dapat mengganggu hasil PCR (Tan et al., 2020).

2) Jaringan segar celeng

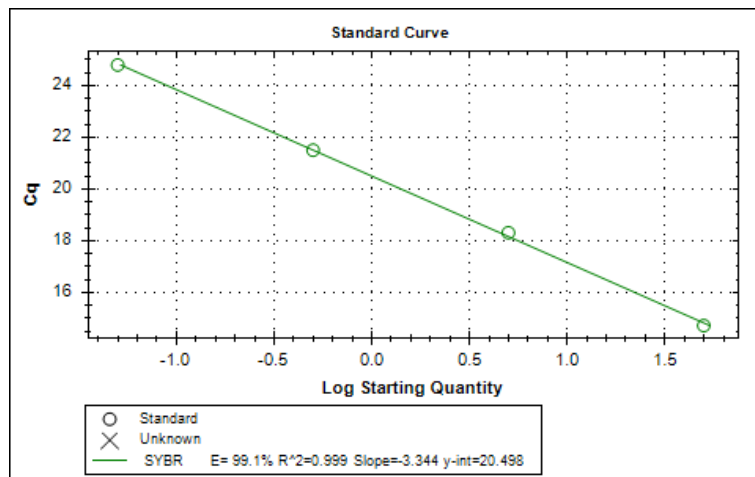
Uji batas deteksi juga dilakukan pada DNA jaringan segar celeng dengan menggunakan seri pengenceran yang sama. Hasil amplifikasi di tampilkan pada gambar 7, menunjukkan empat konsentrasi yaitu 50, 5, 0,5 dan 0,05 ng/μL yang teramplifikasi dengan nilai C_q yang diperoleh berturut-turut yaitu 14,69; 18,29; 21,46 dan 24,37 sedangkan pada konsentrasi 0,005 ng dan 0,0005 ng tidak teramplifikasi sehingga batas deteksi absolut pada DNA jaringan segar celeng yaitu 0,5 ng/μL.



Gambar 6

Hasil Amplifikasi Seri Pengenceran DNA Jaringan Segar Celeng Dengan Real Time-PCR. Konsentrasi DNA Celeng 50; 5; 0,5; 0,05; Dan 0,005 Ng/μl

Berdasarkan hasil amplifikasi seri pengenceran pada DNA jaringan segar celeng diperoleh kurva baku (gambar 7) untuk melihat efisiensi dan linearitas dari hasil metode *real time* – PCR yang digunakan. Diperoleh nilai efisiensi = 99,1%, $R^2 = 0,999$ dan slope = -3,344, Nilai efisiensi yang diperoleh memberikan hasil yang baik dimana reaksi yang baik harus memiliki efisiensi antara 90%-110% dan nilai R^2 pada kurva baku menunjukkan seberapa baik data eksperimen mengikuti garis regresi dan nilai R^2 yang baik yaitu $>0,980\ 0000$.



Gambar 7

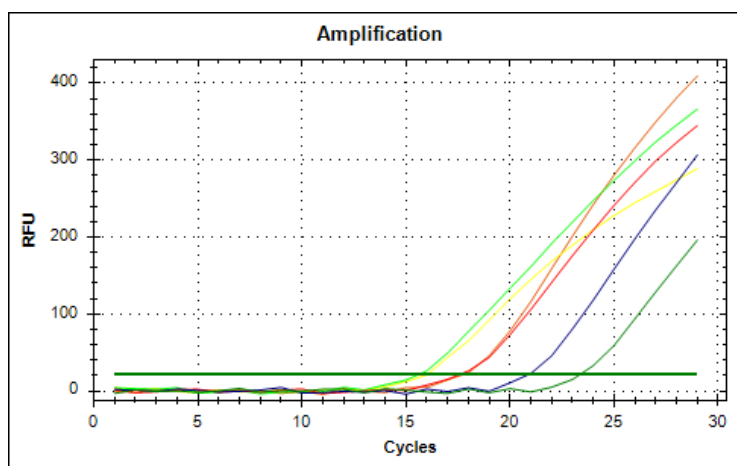
Kurva Baku Seri Pengenceran DNA Jaringan Segar Celeng Real Time-PCR. Konsentrasi DNA Celeng 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 Dan 0,005 Ng/μl

- 3) Batas Deteksi Relatif (Konsentrasi Formula 100%, 50%, 25%, 10%, 5% Dan 1%)

Pengujian batas deteksi relatif dilakukan untuk mengenali rasio terendah spesies target dalam campuran daging, konsentrasi daging babi maupun daging

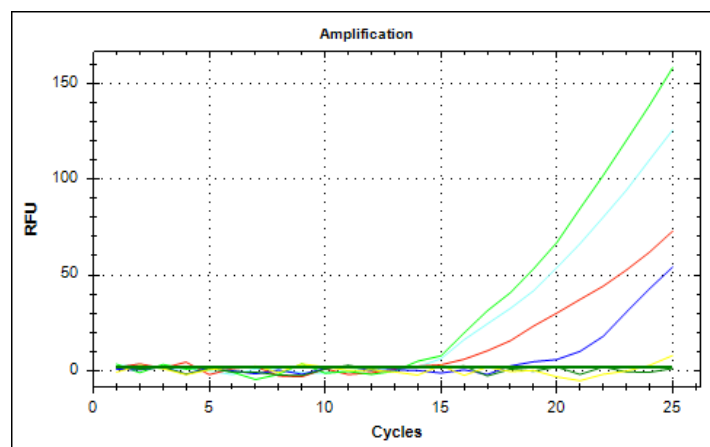
Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi DNA Babi (*Sus Scrofa Domestica*) dan Celeng (*Sus Barbatus*) pada Sosis Sapi

celeng yang di tambahkan pada daging sapi dimaksudkan dengan meniru kemungkinan penambahan babi ataupun adanya kontaminasi silang (skouridou 2019), pada sampel sosis celeng konsentrasi 1% masih dapat terdeteksi dengan baik (gambar 8) pada penelitian ini, pada sampel sosis babi konsentrasi 5% masih dapat terdeteksi sedangkan pada konsentrasi 1% sudah tidak dapat terdeteksi menggunakan 25 siklus (gambar 9). Tidak terdeteksinya pada konsentrasi 1% mungkin disebabkan kurang homogen pada saat pencampuran daging pada pembuatan sosis, ataupun adanya kemungkinan konsentrasi 1% dapat terdeteksi dengan baik apabila menggunakan siklus *real time*-PCR yang lebih banyak (>25 siklus). Sensitivitas 1% campuran daging babi ditunjukkan dari beberapa penelitian yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya (Anonim, 2010); (Bio-Rad, 2006); (Luque-Perez et al., 2013).



Gambar 8

Hasil Amplifikasi Seri Pengenceran DNA Sosis Refrensi Celeng Dengan Real Time-PCR. Konsentrasi DNA Sosis Celeng Referensi 100%, 50%, 25%, 10%, 5% Dan 1%



Gambar 9

Hasil Amplifikasi Seri Pengenceran DNA Sosis Refrensi Babi Dengan Real Time-PCR. Konsentrasi DNA Sosis Babi Referensi 100%, 50%, 25%, 10%, 5% Dan 1%

E. Uji Keterulangan

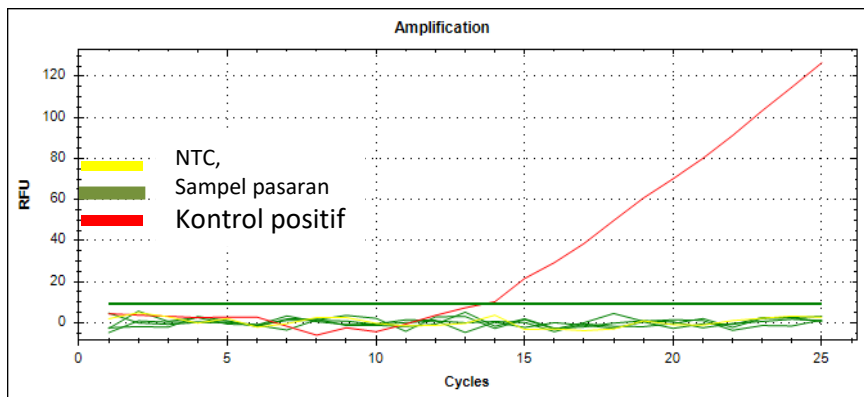
Uji keterulangan atau presisi melihat kedekatan antar hasil pengukuran Ketika suatu metode analisis dilakukan secara berulang terhadap sampel yang homogen dalam waktu yang berbeda, presisi dinyatakan sebagai RSD dalam persen. Metode yang digunakan akan dikatakan valid jika presisinya masuk. Presisi dihitung berdasarkan dari nilai RSD_r (*Relative repeatability standard deviation*) $< 25\%$.

Dari nilai C_q amplifikasi DNA babi diperoleh masing-masing nilai SD (standar deviasi) rata-rata 0,557 dan DNA celeng 0,500 dan nilai rata-rata RSD_r (*relative repeatability standar deviation*) DNA babi yaitu sebesar 4,210%, DNA celeng 3,611%. Berdasarkan nilai RSD_r yang diperoleh bahwa metode analisis yang digunakan untuk mendeteksi DNA babi dan DNA celeng memenuhi persyaratan validasi PCR yaitu $<25\%$ (Anonim, 2010); (Luque-Perez et al., 2013).

Pengujian validasi yang dilakukan pada DNA babi dan DNA celeng tidak semua memberikan hasil efisiensi dan koefisien determinasi yang baik sehingga data yang diperoleh dari persamaan regresi menunjukkan hasil yang kurang optimal untuk validasi analisis secara kuantitatif dengan metode *real time* PCR.

F. Uji pada sampel sosis pasaran

Uji untuk mendeteksi adanya DNA babi atau tidak digunakan 4 sosis berlabel halal yang diperoleh dari beberapa supermarket yang ada di Yogyakarta sebagai sampel.



Gambar 10
Hasil amplifikasi sampel isolate DNA sosis pasaran dengan *real time* PCR

Identifikasi DNA babi maupun celeng pada sampel sosis sapi pasaran menggunakan primer spesifik babi tidak memberikan hasil amplifikasi pada semua sampel dan NTC (*not template control*) seperti yang terlihat pada gambar 10 berarti ke empat sampel sosis pasaran tersebut tidak mengandung DNA babi.

Kesimpulan

Primer babi yang digunakan yaitu forward 5'-GATGCCCTAAACTATTCACC-3' dan primer reverse 5'-

Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi DNA Babi (*Sus Scrofa Domestica*) dan Celeng (*Sus Barbatus*) pada Sosis Sapi

TAGTGCTAGGGATAAGGCTAGG-3' belum dapat membedakan secara spesifik antara DNA babi (*Sus scrofa domestica*) dan DNA celeng (*Sus barbatus*) dengan menggunakan metode *real time* PCR. Secara kualitatif primer babi dapat digunakan untuk mendeteksi adanya DNA babi atau celeng sedangkan secara kuantitatif metode *real time* PCR yang digunakan untuk mendeteksi DNA babi (*Sus scrofa domestica*) maupun DNA celeng (*Sus babrbatus*) belum memenuhi persyaratan validasi.

BIBLIOGRAFI

- Aida, Azrina A., Man, Y. B. Che, Wong, CMVL, Raha, A. R., & Son, R. (2005). Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. *Meat Science*, 69(1), 47–52. [Google Scholar](#)
- Aina, Ganea Qorry, Erwanto, Yuny, Motalib Hossain, Mohd Rafie Johan, Ali, Md Equb, & Rohman, Abdul. (2019). The employment of q-PCR using specific primer targeting on mitochondrial cytochrome-b gene for identification of wild boar meat in meatball samples. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(3), 300. [Google Scholar](#)
- Anonim. (2010). Guidelines On Performance Criteria and Validation of Methods for Detection, Identification and Quantification of Specific DNA Sequences and Specific Proteins In Foods. *CAC/GL*, 74, 1–22.
- Badrut MH, T. (2012). *Pengertian dan Cara Kerja Elektroforesis*. Retrieved from <https://generasibiologi.com/2012/08/elektroforesis.html>
- Bio-Rad, L. (2006). Real-time PCR applications guide. *Hercules: Bio-Rad Laboratories Inc*, 41. [Google Scholar](#)
- Cahyaningsari, Diyan, Latif, Hadri, & Sudarnika, Etih. (2019). Identifikasi Penambahan Daging Babi pada Pangan Berbahan Dasar Daging Sapi Menggunakan ELISA dan qPCR. *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 7(2), 17–25. [Google Scholar](#)
- Guntarti, Any, Rohman, Abdul, Martono, Sudiby, & Yuswanto, Agustinus. (2017). Authentication of wild boar meat in meatball formulation using differential scanning calorimetry and chemometrics. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 8–12. [Google Scholar](#)
- Gusti. (2014). *Pengawasan Peredaran Daging Babi sebagai Hasil Olahan Bahan Pangan Asal Hewan di Daerah Istimewa Yogyakarta. Positif Mengandung Babi, Pemalsuan Daging di DIY Kurang Diawasi*, . Yogyakarta.
- Hikmah, N. (2019). *Validasi Metode Real Time PCR dan Analisis Sekuensing Untuk Deteksi DNA Babi (Sus scrofa domesticus) dan Celeng (Sus scrofa) Pada Sosis Ayam*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Li, Jinchun, Li, Jiapeng, Liu, Ruixi, Wei, Yixuan, & Wang, Shouwei. (2021). Identification of eleven meat species in foodstuff by a hexaplex real-time PCR with melting curve analysis. *Food Control*, 121, 107599. [Google Scholar](#)
- Luque-Perez, Encarnación, Mazzara, Marco, Weber, Thomas P., Foti, Nicoletta, Grazioli, Emanuele, Munaro, Barbara, Pinski, Gregor, Bellocchi, Gianni, Van den Eede, Guy, & Savini, Cristian. (2013). Testing the robustness of validated methods for quantitative detection of GMOs across qPCR instruments. *Food Analytical Methods*, 6(2), 343–360. [Google Scholar](#)

Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi DNA Babi (*Sus Scrofa Domestica*) dan Celeng (*Sus Barbatus*) pada Sosis Sapi

- Maftuchah, Winaya, A., dan Zainuddin, A. (2014). *Teknik Dasar Analisis Biologi Molekuler, 1st ed, 1*. Yogyakarta: Deepublish.
- Marín, Diana Victoria, Castillo, Diana Katherine, López-Lavalle, Luis Augusto Becerra, Chalarca, Jairo Rodríguez, & Pérez, Cristo Rafael. (2021). An optimized high-quality DNA isolation protocol for spodoptera frugiperda JE smith (Lepidoptera: Noctuidae). *MethodsX*, 8, 101255. [Google Scholar](#)
- Maryam, St, Sismindari, Raharjo, Tri Joko, Sudjadi, & Rohman, Abdul. (2016). Determiation of porcine contamination in laboratory prepared dendeng using mitochondrial D-Loop686 and cyt b gene primers by real time polymerase chain reaction. *International Journal of Food Properties*, 19(1), 187–195. [Google Scholar](#)
- Mutalib, Sahilah Abd, Nazri, Wan Sakeenah Wan, Shahimi, Safiyyah, Yaakob, Norhayati, Sani, Norrakiah Abdullah, Abdullah, Aminah, Babji, Abdul Salam, & Ghani, Maaruf Abd. (2012). Comparison between pork and wild boar meat (*Sus scrofa*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Sains Malaysiana*, 41(2), 199–204. [Google Scholar](#)
- Nakyinsige, Khadijah, Man, Yaakob Bin Che, & Sazili, Awis Qurni. (2012). Halal authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science*, 91(3), 207–214. [Google Scholar](#)
- Orbayinah, Salmah, Widada, Hari, Hermawan, Adam, Sudjadi, Sismindari, & Rohman, Abdul. (2019). Application of real-time polymerase chain reaction using species specific primer targeting on mitochondrial cytochrome-b gene for analysis of pork in meatball products. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(2), 260. [Google Scholar](#)
- Palandeng, Feriana C., Mandey, Lucia C., & Lumoindong, Frans. (2016). Karakteristik fisiko-kimia dan sensori sosis ayam petelur afkir yang difortifikasi dengan pasta dari wortel (*Daucus carota L*). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 4(2), 19–28. [Google Scholar](#)
- Priyanka, Vallery Athalia. (2017). Deteksi Cemaran Daging Babi Pada Produk Sosis Sapi di Kota Yogyakarta Dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Yogyakarta: Universitas Atmajaya*, 4, 9–15. [Google Scholar](#)
- Raharjo, T. J., & Rohman, A. (2016). Analysis of pork contamination in Abon using mitochondrial D-Loop22 primers using real time polymerase chain reaction method. *International Food Research Journal*, 23(1), 370. [Google Scholar](#)
- Rohman, A., Erwanto, Y., & Man, Yaakob B. Che. (2011). Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Meat Science*, 88(1), 91–95. [Google Scholar](#)

Septiani, Triayu. (2019). Detection of Porcine DNA in Processed Beef Products Using Real Time–Polymerase Chain Reaction. *Indonesian Journal of Halal Research (IJHAR)*, 1(2), 31–34. [Google Scholar](#)

Sismindari. (2012). *Replikasi DNA Dan Mutasi, 1st ed, Seri Biologi Molekuler Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, Yogyakarta.

Tan, Lee Lee, Ahmed, Siti Aminah, Ng, Siew Kit, Citartan, Marimuthu, Raabe, Carsten A., Rozhdestvensky, Timofey S., & Tang, Thean Hock. (2020). Rapid detection of porcine DNA in processed food samples using a streamlined DNA extraction method combined with the SYBR Green real-time PCR assay. *Food Chemistry*, 309, 125654. [Google Scholar](#)

Copyright holder:

Mariyani (2021)

First publication right:

Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia

This article is licensed under:

