

Optimization of Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) Based Pork Contamination Detection in Beef Processed Food Products

Optimasi Deteksi Kontaminasi Daging Babi Berbasis *Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction* (qPCR) pada Produk Makanan Olahan Daging Sapi

Cindy Pramila¹, Yuni Ahda¹, Dwi Hilda Putri¹, Afifatul Achyar^{1*}

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Corresponding author: afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id

Abstract

Indonesia is a country with a majority Muslim population. Consuming halal food is the basic right of every Muslim. Until now the price of beef is still relatively expensive. The consequence of the high price of meat is that there are people who mix or replace beef with other animal meat such as pork. Food products made with meat mixtures are very difficult to distinguish with the naked eye. The Multiplex Real Time PCR method is a fast, sensitive, and specific test method for detecting pork contamination in processed beef food products. The results showed that the optimum primer concentration for Bos and Sus primer pairs was 0.4 μM . The optimum concentration of DNA to amplify *Bos taurus* and *Sus scrofa* DNA was at a concentration of 100 ng/ μl which produced amplicons with peak values of 86.3°C for *Bos taurus* and 84.7°C for *Sus scrofa*.

Key words Multiplex Real Time PCR optimization, *ND5* gene, pork, beef, halal

Abstrak

Indonesia merupakan salah satu negara dengan mayoritas penduduk beragama Islam. Mengonsumsi pangan yang halal adalah hak dasar setiap muslim. Sampai saat ini harga daging sapi masih relatif mahal. Konsekuensi dari mahalnya harga daging tersebut yaitu ada oknum yang mencampur atau mengganti daging sapi dengan daging hewan lain seperti daging babi. Produk pangan yang dibuat dengan campuran daging sangat sulit dibedakan dengan mata telanjang. Metode *Multiplex Real Time* PCR merupakan metode pengujian yang cepat, sensitif, dan spesifik untuk mendeteksi kontaminasi daging babi pada produk pangan olahan daging sapi. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi primer yang optimum untuk pasangan primer Bos dan Sus adalah 0,4 μM . Konsentrasi DNA yang optimum untuk mengamplifikasi DNA *Bos taurus* dan *Sus scrofa* yaitu pada konsentrasi 100 ng/ μl yang menghasilkan amplicon dengan nilai peak 86,3°C untuk *Bos taurus* dan 84,7 °C pada *Sus scrofa*.

Kata kunci optimasi *Multiplex Real Time* PCR, gen *ND5*, babi, daging sapi, halal

Pendahuluan

Pangan merupakan kebutuhan pokok manusia yang sangat penting untuk meningkatkan kesehatan, agar manusia dapat menjalankan aktivitas sehari-hari dengan baik. Oleh karena itu, keamanan pangan menjadi sangat penting agar tidak terjadi gangguan kesehatan yang tidak diinginkan. Namun akhir-akhir ini banyak beredar makanan di masyarakat yang tidak lagi terjamin keamanannya (Achyar, 2023).

Indonesia merupakan salah satu negara dengan mayoritas penduduk beragama Islam. Berdasarkan data Direktorat Jenderal Kependudukan dan Pencatatan Sipil Kementerian dalam Negeri, jumlah populasi penduduk Indonesia yang beragama Islam pada tahun 2021 berjumlah 236,53 juta jiwa atau setara dengan 86,88% dari total penduduk Indonesia yaitu 272,23 juta jiwa. Tingginya jumlah penduduk muslim di Indonesia berpengaruh pada gaya hidup halal yang menjadi landasan dalam pemilihan produk (Widayat, 2020).

Barang dan atau jasa yang terkait dengan makan, minuman, obat, kosmetik, produk kimiawi, produk biologi, produk rekayasa genetik, serta barang gunaan yang dipakai dan dimanfaatkan oleh masyarakat khususnya muslim, yang masuk, beredar dan diperdagangkan di Indonesia haruslah bersertifikat halal. Hal ini diatur oleh UU RI No. 33 Tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal yang tertuang dalam pasal 4 (Undang-Undang No.33 Tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal).

Di Indonesia produk olahan daging seperti bakso, sosis, dan burger sudah banyak penggemarnya. Pada umumnya bahan baku untuk pembuatan bakso, sosis, dan burger itu adalah daging sapi. Sampai saat ini harga daging sapi masih relatif mahal. Konsekuensi dari mahalnya harga daging tersebut yaitu ada oknum penjual bakso, sosis, dan burger yang mencampur atau mengganti daging sapi dengan daging hewan lain seperti daging babi (Mustaqimah, 2021).

Produk pangan yang dibuat dengan campuran daging sangat sulit dibedakan dengan mata telanjang, karena seringkali daging tersebut sudah dihancurkan dan dicampur dengan berbagai bahan lain. Permasalahan tersebut tentu meresahkan masyarakat mengingat sebagian besar masyarakat Indonesia adalah umat muslim yang hanya mengkonsumsi makanan yang halal. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode yang cepat dan efisien untuk mendeteksi jenis daging yang digunakan dalam produk olahan daging, sehingga dapat menjamin kehalalan daging yang digunakan (Widayat, 2019).

Kasus pencampuran daging sapi dengan daging babi dan daging tikus terjadi setiap tahun di Indonesia. Pada Januari 2019, dua pedagang ditangkap polisi di Pasar Wonosari karena mencampur daging sapi dengan daging babi. Pada Maret 2018, dua pedagang bakso digerebek polisi karena memasukkan daging babi ke dalam bakso di daerah kampus Universitas Jambi. Kasus lain, Kepolisian Bogor membongkar praktik pembuatan bakso yang dicampur menggunakan daging babi di sebuah ruko di wilayah Citeureup, Kabupaten Bogor. Penggerebekan itu berlangsung pada Minggu, 14 Mei 2017 (Zilhadia, 2020). Pada Februari 2016, Kepolisian Sektor Metro Setiabudi menangkap pedagang bakso karena mencampur daging sapi dengan daging tikus (Roswiem, 2018).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik biologi molekuler yang banyak digunakan untuk uji autentikasi makanan melalui analisis DNA target, termasuk deteksi DNA turunan babi (daging babi dan gelatin babi dalam produk makanan). Teknik PCR digunakan untuk tujuan autentikasi halal karena kemampuannya mendeteksi target spesifik sekuen DNA pada produk makanan atau produk farmasi. Teknik PCR memiliki kemampuan yang sensitif untuk mendeteksi keberadaan daging babi dalam daging segar dan produk olahan yang dicampur dengan bahan lain (Mardhotillah *et al*, 2023).

Real Time PCR merupakan metode analisis berbasis DNA yang handal, efektif, dan terpercaya. Teknik *Real Time* PCR ini lebih akurat serta proses amplifikasi dan juga analisisnya terjadi bersamaan sehingga waktu yang dibutuhkan untuk identifikasi DNA akan lebih singkat. Metode ini memiliki kelebihan dapat mengidentifikasi dengan sampel yang sedikit, tidak harus melakukan visualisasi, risiko kontaminasi yang kecil, dan dapat melakukan pemeriksaan sampel dengan jumlah banyak sekaligus (Rahmania *et al*, 2021).

Real Time PCR membutuhkan pewarna fluoresens dalam mengidentifikasi dan mendeteksi DNA pada sampel. Pewarna fluoresens yang umum digunakan adalah *SYBR Green*. Berdasarkan latar belakang penjelasan di atas, maka perlu dilakukan pengujian DNA Babi yang diduga terdapat pada produk pangan olahan daging sapi yang dianalisis menggunakan metode *Multiplex Real Time* PCR dengan menggunakan pewarna fluoresens *SYBR Green*.

Bahan dan Metode

Penelitian ini berfokus pada pengembangan modifikasi metode *Real Time* PCR dengan melakukan optimasi untuk mendeteksi gen babi berbasis PCR *multiplex* pada sampel makanan olahan daging sapi. Gen target

yang akan diamplifikasi adalah DNA mitokondria yaitu gen ND5 yang mengkode NADH dehydrogenase subunit 5 pada *Sus scrofa* dan *Bos taurus*. Gen dalam DNA mitokondria sering digunakan dalam identifikasi spesies karena variasi urutan yang tinggi antar spesies dan lebih banyak salinan per sel daripada DNA inti (Chattri *et al.*, 2023).

Tabel 1. Primer yang digunakan pada *Multiplex Real Time PCR*

Gen Target	Primer	Sekuen	Amplikon	Referensi
ND5 Babi	Sus-F	5'-CCA TTA ATC GGC CTA CTC C-3'	467 bp	(Achyar <i>et al.</i> , 2023)
	Sus-R	5'-GGT ATT GCT TTA TAC AGT CCG-3'		
ND5 Sapi	Bos-F	5'-ACC CTT GAT TGG ACT AGC ATT-3'	206 bp	
	Bos-R	5'-TAC ATC CAA TCT ATT ACA TTA TGC T-3'		

Optimasi dilakukan secara bertahap dengan menggunakan metode *singleplex* terlebih dahulu kemudian dilanjutkan dengan *multiplex*. Optimasi secara *singleplex* dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi primer dan konsentrasi *template* DNA. Setelah mendapatkan konsentrasi primer yang optimum dan konsentrasi *template* DNA yang optimum, dilanjutkan dengan melakukan *Multiplex Real Time PCR*. *Multiplex Real Time PCR* dengan menggunakan pewarna *SYBR Green* dilakukan dengan membandingkan T_m pada *melt curve* antara *singleplex* dan *multiplex*. Program *Multiplex Real Time PCR* dilakukan dalam kondisi sebagai berikut:

Tabel 2. Pengaturan program *Real Time PCR*

No	Tahap <i>Real Time PCR</i>	Suhu (°C)	Durasi	Siklus
1	Denaturasi Awal	95	3 min	40x
2	Denaturasi Lanjutan	95	5 sec	
3	<i>Annealing</i>	60	15 sec	
4	<i>Melting Curve Analysis</i>	60	5 sec	
		95		

1. Optimasi *Singleplex Real Time PCR*

a. Variasi Konsentrasi Primer

Optimasi konsentrasi primer penting karena jika konsentrasi yang digunakan tidak tepat dapat menyebabkan terjadinya pengikatan primer non spesifik yang mengakibatkan hasil negatif atau positif palsu dan mengurangi sensitivitas reaksi PCR (Chattri, 2023).

Reaksi *Real Time PCR* untuk amplifikasi gen *ND5* babi dan sapi dilakukan terpisah dalam tabung PCR. Komposisi reaksi *Real Time PCR* dengan volume total 10 µl PCR Mix disiapkan dengan campuran larutan yang terdiri atas: 5 µl SensiFAST™ SYBR® No-ROX mix (Bioline) 2x; 0,2-0,5 µM primer forward (Bos/Sus) dan primer reverse (Bos/Sus) (dilakukan optimasi terlebih dahulu); dan 1 µl DNA ~~template~~ *template*. Untuk reaksi *Real Time PCR* dicukupkan volumenya sebanyak 10 µl dengan menambahkan *nuclease free-water* (NFW). Untuk validasi dilakukan kontrol yaitu NTC (*No Template Control*) yang tidak mengandung DNA target dengan menggunakan *nuclease free-water*.

Tabel 3. Variasi konsentrasi primer

Primer	Konsentrasi Primer (ng/µM)			
	0,5	0,4	0,3	0,2
Bos	0,5	0,4	0,3	0,2
Sus	0,5	0,4	0,3	0,2

b. Variasi Konsentrasi DNA

Program *Real Time PCR* yang digunakan merupakan hasil dari optimasi konsentrasi primer yang sudah optimum. Optimasi konsentrasi DNA *template* dilakukan dengan memberikan variasi konsentrasi *template* DNA melalui pengenceran berseri DNA sapi, babi, dan tikus. Terdapat enam variasi konsentrasi yang digunakan mulai dari konsentrasi tertinggi (Tabel 3).

Tabel 4. Variasi konsentrasi *template* DNA

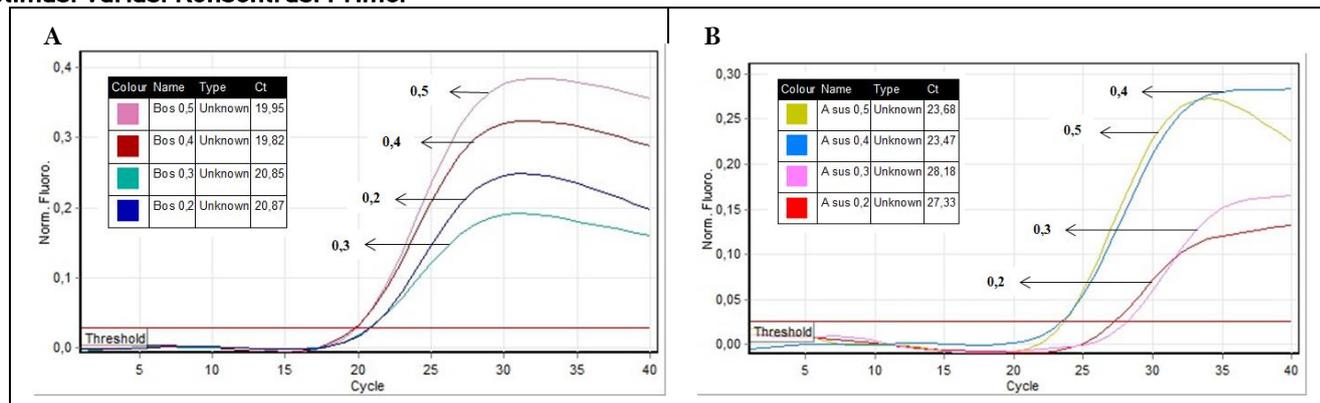
DNA	Konsentrasi DNA Template (ng/µl)					
	A	B	C	D	E	F
Sapi	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56
Babi	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56
Tikus	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56

2. Optimasi *Multiplex Real Time PCR*

Setelah mendapatkan konsentrasi primer yang optimum dan konsentrasi *template* DNA yang optimum, dilanjutkan dengan melakukan *Multiplex Real Time PCR*. Selanjutnya dilakukan perbandingan nilai Ct antara *singleplex* dan *multiplex*. Amplifikasi *Real Time PCR* yang dihasilkan menggunakan metode *singleplex* dan *multiplex* harus menunjukkan nilai T_m pada *melt curve* yang sama.

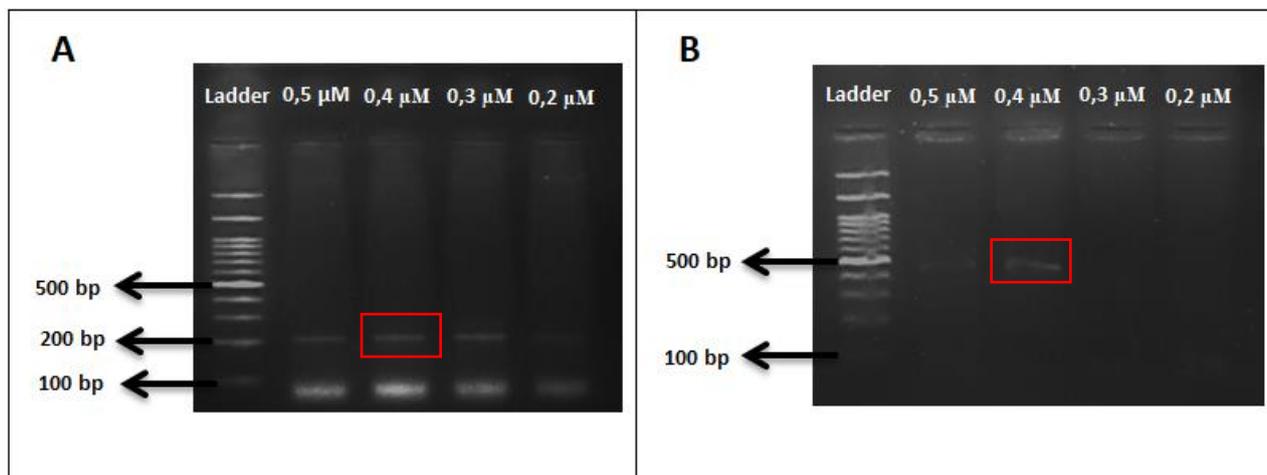
Hasil dan Pembahasan

Optimasi Variasi Konsentrasi Primer



Gambar 1. Kurva Amplifikasi Variasi Konsentrasi Primer a). Primer Bos b). Primer Sus

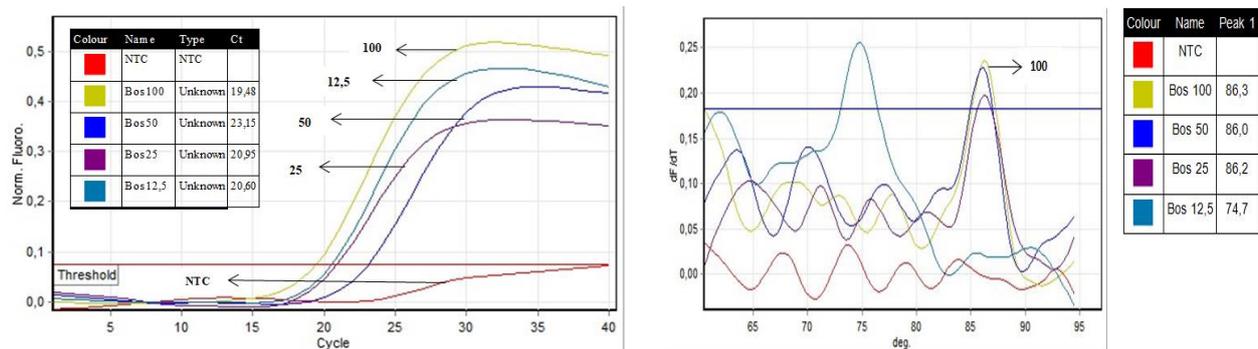
Berdasarkan kurva amplifikasi *Real Time PCR* yang dihasilkan dari variasi konsentrasi pasangan primer Bos dan primer Sus menunjukkan bahwa semua variasi konsentrasi primer teramplifikasi dengan baik dilihat dari naiknya kurva dan munculnya nilai Ct dari setiap konsentrasi primer. Namun, konsentrasi primer yang memiliki Ct terendah terlihat pada pengujian dengan konsentrasi primer 0,4 μM . Semakin rendah nilai Ct artinya semakin cepat terjadinya amplifikasi untuk melewati threshold. Oleh karena itu untuk reaksi *Real Time PCR* selanjutnya menggunakan konsentrasi yang sudah optimum untuk pasangan primer Bos dan Sus masing-masing 0,4 μM .



Gambar 2. Visualisasi Elektroforesis Variasi Konsentrasi Primer a). Primer Bos b). Primer Sus

Hasil visualisasi dengan elektroforesis untuk variasi konsentrasi primer dapat dilihat pada gambar 3. Hasil visualisasi pada variasi A menunjukkan adanya pita pada gen target *ND5 Bos taurus* pada semua sumur berukuran 206 bp. Namun, pita terlihat jelas pada sumur 0,5 μM ; 0,4; dan 0,3 μM . Hasil visualisasi pada variasi B menunjukkan adanya pita pada gen target *ND5 Sus scrofa* dengan ukuran 467 pada sumur 0,5 μM yang mana terlihat sangat samar dan pada sumur 0,4 μM terlihat lebih tebal. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi primer optimum pada pasangan primer Bos dan Sus terdapat pada konsentrasi 0,4 μM .

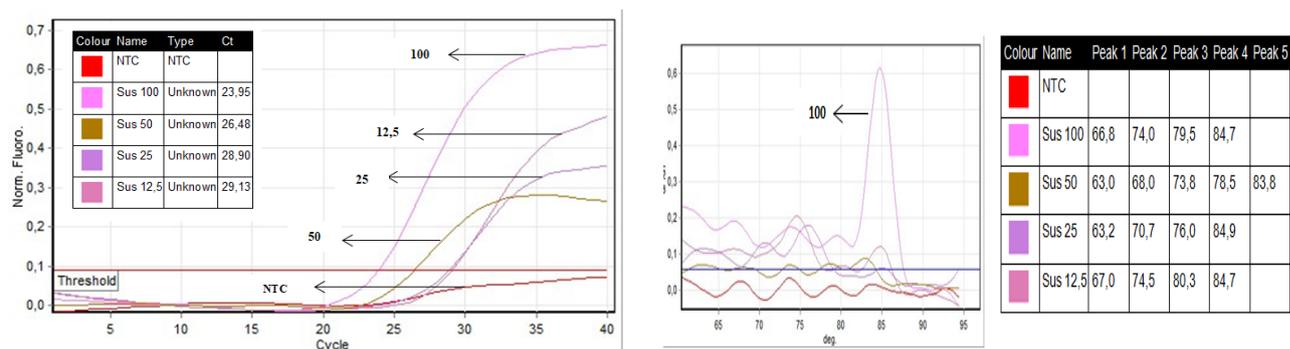
Optimasi Konsentrasi DNA *Template*



Gambar 3. Variasi Konsentrasi DNA *Template Bos taurus* 100-12,5 ng/μl

Berdasarkan analisis hasil amplifikasi DNA yang dilihat dari nilai Ct memperlihatkan bahwa keempat variasi konsentrasi DNA *template* masih dapat mendeteksi gen target *ND5 Bos taurus* ditandai dengan naiknya kurva amplifikasi dan munculnya nilai Ct. Namun, konsentrasi DNA *template* yang paling optimum terlihat pada konsentrasi 100 ng/μl dengan nilai Ct 19,48. Semakin rendah nilai Ct semakin tinggi jumlah DNA target, sebaliknya semakin tinggi nilai Ct semakin rendah jumlah DNA target (Wijayanti, 2022). Berdasarkan hal tersebut maka untuk reaksi *Real Time* PCR selanjutnya menggunakan konsentrasi DNA yang sudah optimum yaitu 100 ng/μl untuk DNA *Bos taurus*.

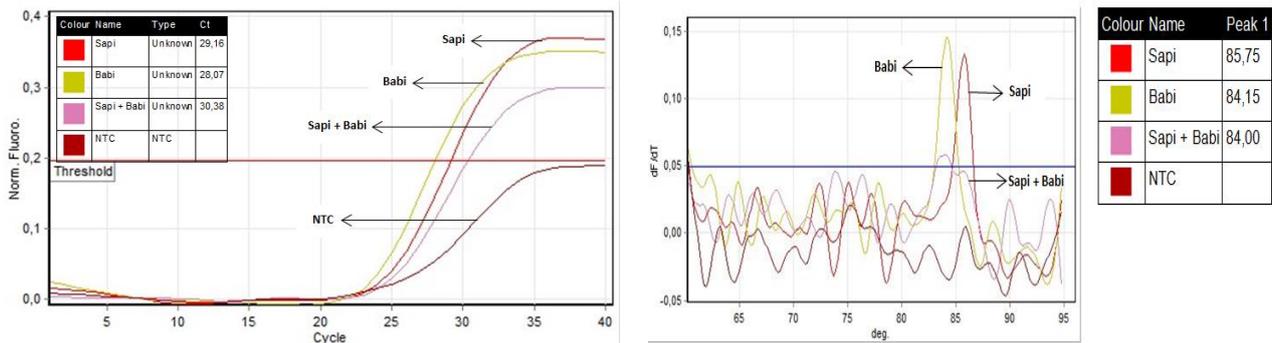
Analisis kurva *Tm* sangat disarankan untuk metode *Real Time* PCR karena dapat mengidentifikasi adanya amplifikasi nonspesifik maupun primer-dimer. Analisis amplifikasi DNA hasil *running Real Time* PCR berdasarkan nilai *melting temperature Tm* (suhu leleh), pada DNA *Bos Taurus* dengan konsentrasi 100-25 ng/μl menghasilkan amplikon dengan peak disuhu 86°C, sementara pada konsentrasi DNA 12,5 ng/μl menghasilkan amplikon dengan peak pada suhu 74,7°C, hal tersebut menunjukkan terjadinya primer dimer ataupun mis-priming. Primer dimer adalah terbentuknya struktur sekunder yang disebabkan karena menempelnya sesama primer sejenis ataupun primer yang tidak sejenis seperti antara primer *forward* dengan komplemen primer *reverse*. Sementara itu, mis-priming adalah penempelan primer diluar sekuen DNA target (Maulani, 2020).



Gambar 4. Variasi Konsentrasi DNA *Template Sus scrofa* 100-12,5 ng/μl

Berdasarkan analisis hasil amplifikasi DNA yang dilihat dari nilai Ct terlihat bahwa keempat variasi konsentrasi DNA *template* dapat mendeteksi gen target *ND5 Sus scrofa* yang ditandai dengan naiknya kurva amplifikasi dan munculnya nilai Ct. Konsentrasi DNA optimum terlihat pada konsentrasi DNA yang memiliki nilai Ct terendah dimana dalam optimasi DNA *Sus Scrofa* ini terdapat pada konsentrasi 100 ng/μl dengan nilai Ct 23,96. Analisis hasil amplifikasi DNA hasil *running qPCR* menggunakan pewarna *SYBR Green* berdasarkan nilai *Tm* pada DNA *Sus scrofa* menghasilkan amplikon dengan nilai peak pada kisaran suhu 83,8°C-84,9°C dengan suhu optimum 84,7°C.

Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction



Gambar 5. Kurva Amplifikasi dan Melt Curve Multiplex Real Time PCR

Hasil amplifikasi *Multiplex Real Time PCR* secara *singleplex* dan *multiplex* memperlihatkan bahwa DNA teramplifikasi dengan baik terlihat dari kurva amplifikasi yang naik dan munculnya nilai Ct. nilai Ct antara metode *singleplex* dan *multiplex* memperlihatkan angka yang tidak berbeda signifikan. Hal ini terlihat dari nilai Ct yang di hasilkan pada sample sapi, babi, serta sapi dan babi memiliki nilai Ct berkisar antara 28-30. Analisis hasil amplifikasi DNA hasil *running* qPCR menggunakan pewarna *SYBR Green* berdasarkan nilai *melting temperature* T_m (suhu leleh), pada DNA sapi menghasilkan satu amplicon dengan peak pada suhu 85,7°C; pada DNA babi menghasilkan satu amplicon dengan peak disuhu 84,15 °C; dan pada DNA campuran sapi dan babi terlihat terbentuknya dua amplicon dengan peak disuhu 84,00 °C.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian diatas, diperoleh kesimpulan bahwa konsentrasi primer yang optimum untuk pasangan primer Bos dan Sus adalah 0,4 μM . Hal tersebut dilihat berdasarkan nilai Ct pada primer dengan konsentrasi 0,4 μM menghasilkan nilai Ct paling rendah dan pita hasil visualisasi elektroforesis yang tebal dibandingkan dengan konsentrasi primer lainnya. Konsentrasi DNA yang optimum untuk mengamplifikasi DNA *Bos taurus* dan *Sus scrofa* yaitu pada konsentrasi 100 ng/ μl yang menghasilkan amplicon dengan nilai peak 86,3°C untuk *Bos taurus* dan 84,7 °C pada *Sus scrofa*.

Daftar Pustaka

- Achyar, A., Putri, D.H. dan Handayani, D., 2023. Studi PCR In Silico Amplifying Mitochondrial ND5 Gene untuk Mendeteksi Pemalsuan Makanan. Dalam *Konferensi Internasional ke-3 tentang Biologi, Sains dan Pendidikan (IcoBioSE 2021)* (hlm. 538-543). Atlantis Press.
- Achyar, A. dan Chatri, M., 2023. Optimalisasi multiplex PCR untuk deteksi produk makanan berbasis daging sapi yang terkontaminasi daging tikus. Dalam *Konferensi Internasional ke-3 tentang Biologi, Sains dan Pendidikan (IcoBioSE 2021)* (hlm. 531-537). Atlantis Press.
- Chatri, M., Achyar, A., Putri, C.K. 2023. Optimalisasi *Multiplex* PCR untuk Deteksi Produk Makanan Berbasis Daging Sapi yang Terkontaminasi Babi. *Proceeding 4th ICOMSET in conjunction 3rd IcoBioSE 2021*. Atlantis Press.
- Chatri, M., Putri, D.H., Handayani, D., Achyar, A. 2023. Desain Primer dan Probe Multiplex qPCR Untuk Deteksi Otentikasi Makanan. *Proceeding 4th ICOMSET in conjunction 3rd IcoBioSE 2021*. Atlantis Press.
- Mardhotillah, I., Achyar, A., Chatri, M., Putri, D.H., Ahda, Y. 2023. Optimalisasi Isolasi DNA pada Sampel Pangan Berbahan Dasar Daging Menggunakan Metode Fenol-Kloroform untuk Pengembangan Deteksi Halal Menggunakan Analisis Metode In-House. *Proceeding 4th ICOMSET in conjunction 3rd IcoBioSE 2021*. Atlantis Press.

- Maulani, T. R., Susilo, H., Indriati, M., & Suhaemi, A. (2020). Deteksi Cemaran DNA Babi Dengan RT-PCR Pada Sosis Tanpa Logo Halal MUI Dari Empat Kecamatan di Kabupaten Pandeglang Banten. *Gorontalo Agriculture Technology Journal*, 3(2), 72-80.
- Mustaqimah, D.N., Septiani, T. and Roswiem, A.P., 2021. DETEKSI DNA BABI PADA PRODUK SOSIS MENGGUNAKAN *REAL TIME-POLYMERASE CHAIN REACTION* (RT-PCR). *Indonesia Journal of Halal*, 3(2), pp.106-111.
- Rahmania, Y.L., Widayat., Agustini, T.W., Suzery,M., Albaari, A.N. 2021. Pengukuran Kandungan Dna Babi Dalam Berbagai Produk Pangan Dengan Metode *Real TimePolymerase Chain Reaction* (RTPCR). *Indonesia Journal of Halal*, 3(2), pp.129-133.
- Roswiem, A.P. and Septiani, T., 2018. Identifikasi Daging Tikus Pada Produk Bakso Dengan Metode Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *Jurnal Kedokteran YARSI*, 26(2), pp.058-065.
- Undang-Undang No. 33 Tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal (Lembaga Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 295 dan Tambahan Lembaga Republik Indonesia Nomor 5604).
- Widayat, W., Agustini, T.W., Suzery, M., Al-Baarri, A.N.M., Putri, S.R. and Kurdianto, K., 2019. Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sebagai Alat Deteksi DNA Babi dalam Beberapa Produk Non-Pangan. *Indonesia Journal of Halal*, 2(1), pp.26-33.
- Widayat, W., Hadiyanto, H., Al-Baarri, A.N.M. and Putri, S.R., 2020. Pendampingan Sertifikasi Laik Sehat Makanan Bagi Restoran Selaras Dalam Rangka Persiapan Sertifikasi Halal. *Indonesia Journal of Halal*, 2(2), pp.58-63.
- Wijayanti, L. E., Aryani, D., & Wahyu, S. (2022). HUBUNGAN NILAI CT PADA PASIEN TERKONFIRMASI COVID-19 DENGAN HASIL PEMERIKSAAN D-DIMER. *Jurnal Kesehatan Tambusai*, 3(1), 96-103.
- Zilhadia, Z., Adhiyanto, C., Gustida, A. and Khairunnisa, N., 2020. Analisis Cemaran Daging Babi pada Bakso Sapi yang Dijual di Tanjung Priok menggunakan Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 7(1), pp.83-91.