

Pig DNA identification as a validation method for halal authentication using polymerase chain reaction

Identifikasi DNA babi sebagai metode validasi untuk autentikasi halal menggunakan *polymerase chain reaction*

Mariyani^{1*)}, Ni nyoman Yuvita Yani^{1*)}, Ikhsan Hi. Amir Sené²

¹⁾Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Pelita Mas Palu, Kota Palu, Sulawesi Tengah, Indonesia.

²⁾Akademi Farmasi Tadulako Farma Palu, Kota Palu, Sulawesi Tengah, Indonesia.

*e-mail author: mariyani3190@gmail.com

ABSTRACT

To protect consumers from fake halal labelling on food products, cosmetics and medicines, a method is needed to guarantee a product's Halal. Pork is one type that is often used to mix with beef because the two types of meat have physical similarities if not carefully considered. DNA-based analysis, often used for halal authentication, is the real-time PCR method, so this study aims to prove that conventional PCR methods can detect DNA at the same concentration. This study uses two parameters: the specificity test carried out using pig DNA samples and cow and chicken DNA as a comparison. The second parameter is the detection limit test on absolute DNA carried out at 4 concentrations, namely 50, 5, 0.5 and 0.05 ng/μL, while the relative detection limit test (pork-cow mixture) with variations in pork concentration, namely 100%, 5%, 3%, 1%, and 0.5%. The analysis showed that the primers were specific to pig DNA with an absolute detection limit of 0.05 ng/μL and a relative detection limit of 0.5%. This PCR method meets the validation requirements for identifying target species so that it can be used for halal authentication of various products.

Keywords: *Pig DNA; Halal authentication; PCR method*

ABSTRAK

Sebagai upaya untuk melindungi konsumen dari pelabelan halal palsu pada produk makanan, kosmetik maupun obat-obatan maka dibutuhkan suatu metode yang mampu menjamin kehalalan dari suatu produk. Daging babi menjadi salah satu jenis yang sering digunakan untuk mencampur dengan daging sapi dikarenakan kedua daging tersebut memiliki kemiripan secara fisik apabila tidak diperhatikan secara seksama. Analisis berbasis DNA yang sering digunakan untuk autentikasi halal yaitu metode real time PCR, sehingga pada penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa metode PCR konvensional mampu mendeteksi DNA pada konsentrasi yang sama. Penelitian ini menggunakan dua parameter yaitu uji spesifitas dilakukan menggunakan sampel DNA babi serta DNA sapi dan ayam sebagai pembanding. Parameter kedua yaitu uji batas deteksi pada DNA absolut dilakukan pada 4 konsentrasi yaitu 50; 5; 0,5 dan 0,05 ng/μL, sedangkan uji batas deteksi relative (campuran daging babi-sapi) dengan variasi konsentrasi daging babi yaitu 100%, 5%, 3%, 1%, dan 0,5%. Hasil analisis menunjukkan primer spesifik terhadap DNA babi dengan hasil batas deteksi absolut yaitu 0,05 ng/μL dan batas deteksi relative yaitu 0,5%. Metode PCR ini memenuhi persyaratan validasi untuk mengidentifikasi spesies target sehingga dapat digunakan untuk autentikasi halal pada berbagai produk.

PENDAHULUAN

Produk berbahan dasar daging paling rentan terkait dengan isu kehalalan, menentukan apakah produk daging dari spesies halal tidak dicampur atau terkontaminasi dari bahan non halal seperti babi (Nakyinsige, Man and Sazili, 2012), karena maraknya pemalsuan daging sapi yang ditemukan (Aina *et al.*, 2019) sehingga memberikan perhatian khususnya umat Muslim untuk meningkatkan kesadaran terhadap pentingnya status halal yang beredar di Indonesia. Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya campuran daging yang tidak diinginkan seperti spektroskopi FTIR (Guntarti *et al.*, 2015) dan analisis berbasis protein ELISA. Namun metode ini tidak dapat digunakan untuk produk yang telah mengalami proses pemanasan karena protein akan terdenaturasi pada suhu yang tinggi. Oleh karena itu pemilihan metode analisis berbasis DNA menjadi metode yang tepat karena DNA relatif stabil pada suhu yang tinggi dan sampel yang digunakan hanya sedikit.

Metode analisis berbasis DNA yang sering digunakan yaitu real time PCR karena dianggap memiliki tingkat akurasi dan sensitivitas yang tinggi seperti yang telah dilakukan sebelumnya (Maryam *et al.*, 2016a) yang berhasil melakukan identifikasi DNA babi menggunakan primer *cytb* dan mampu mengidentifikasi target pada konsentrasi terkecil dari rangkaian konsentrasi yang dibuat.

Pada penelitian kali ini akan digunakan Polymerase Chain Reaction yang dikombinasikan dengan primer spesifik spesies babi yang hasilnya didasarkan pada analisis end-point melalui elektroforesis gel agarose (Che Man *et al.*, 2012), meskipun tidak seperti metode real time PCR yang hasilnya dapat dilihat secara langsung melalui monitoring amplifikasi tiap siklusnya karena adanya intensitas sinyal fluoresensi yang secara langsung berkorelasi terhadap akumulasi produk PCR (IkaWidyasa, . and Rohman, 2015; Sepminarti *et al.*, 2015), namun penggunaan PCR konvensional kali ini untuk membuktikan bahwa dengan konsentrasi minimal yang sama pada real time PCR (campuran 0,5% daging babi dalam 99,5% daging sapi) juga mampu terdeteksi pada

PCR konvensional seperti yang dilakukan Maryam (Maryam *et al.*, 2016b).

Karena hal itu, maka penelitian ini dilakukan untuk membuktikan bahwa metode PCR konvensional mampu memberikan hasil yang baik terhadap spesifitas dan batas deteksi dengan mengacu primer, jenis sampel dan konsentrasi yang sama dilakukan pada penelitian Maryam (2016), sehingga metode dapat diandalkan untuk autentikasi halal pada berbagai macam produk yang beredar

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini melibatkan gel agarose (CBS Scientific), ultrapure agarose (Roche), aqua bidestillata steril, aqua bebas nuclease, dapar lisis, dapar pemuat, dapar TE, dapar TBE (Roche), DNA ladder (Vivantis), enzim Taq green, etanol absolut, etanol 70%, etidium bromide (EtBr), fenol, kloroform, proteinase K (Roche), dan primer cytochrome b yang telah dirancang oleh Maryam (2016).

Deskripsi Jalannya Penelitian

Sampel daging babi (spesies target), daging sapi dan daging ayam (spesies pembanding) sampel referensi (campuran daging babi-daging sapi). diberi label dan disimpan pada suhu -20°C sampai isolasi DNA dilakukan.

1. Isolasi DNA

Pada penelitian ini, isolasi DNA dilakukan dengan menerapkan metode ekstraksi menggunakan Fenol-Kloroform. Sejumlah 0.2 gram sampel dihancurkan secara halus dan digerus sebelum tahap isolasi DNA dimulai. DNA yang berhasil diisolasi disimpan pada suhu -20°C hingga siap untuk digunakan.

2. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA

Sebanyak 2 µL DNA ditambahkan ke dalam tube yang berisi 998 µL aqua bidestillata steril, kemudian dihomogenkan. Selanjutnya, dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 dan 280nm. Konsentrasi DNA hasil isolasi dihitung

dengan mengalikan nilai A260 dengan faktor pengenceran serta konstanta serapan DNA, di mana serapan DNA murni pada panjang gelombang 260 nm dengan 1 unit absorbansi mengandung 50 µg/mL DNA.

3. Analisis DNA dengan PCR

Amplifikasi melalui metode PCR dilakukan dengan menggunakan campuran reaksi sebanyak 20 µL, yang terdiri dari 2 µL isolat DNA (50 ng), 1 µL primer forward, 1 µL primer reverse, dan 6 µL aqua bebas nuclease. Pengujian dilakukan dengan mengikuti kondisi suhu tertentu, yaitu 95°C untuk aktivasi enzim/denaturasi awal selama 30 detik, diikuti oleh 30 siklus amplifikasi dengan tahapan 95°C selama 5 detik (tahap denaturasi), 61°C selama 45 detik (tahap *annealing*), dan 72°C selama 30 detik (tahap lanjutan/*extension*). Setelah itu, dilanjutkan dengan elektroforesis pada gel agarose..

4. Elektroforesis gel agarose

Sebanyak 10 µL DNA hasil isolasi dianalisis setelah ditambahkan 2 dapar pemuat. Analisis dilakukan melalui elektroforesis pada gel agarose 0.8% (w/v) menggunakan dapar TBE dan pewarna etidium bromide (EtBr), dengan penerapan arus sebesar 100 Volt selama 60 menit. Gel agarose yang telah mengalami elektroforesis divisualisasikan menggunakan UV-transluminator, dan gambar hasilnya didokumentasikan.

5. Validasi Metode Analisis

Uji Spesifitas

Spesifitas diuji pada DNA yang telah diisolasi dari sampel (daging babi, daging sapi, dan daging ayam) untuk memvalidasi spesifitas primer. Langkah selanjutnya melibatkan pencampuran DNA genom dengan DNA primer *forward* dan *reverse* yang telah disediakan..

Uji Sensitivitas

Sensitivitas diuji dengan membuat rangkaian pengenceran DNA template yang berasal dari daging babi yang digunakan sebagai sampel. Pengenceran ini terbagi menjadi empat deret konsentrasi, yaitu 1:10, 1:102, 1:103, dan 1:104. Selain itu, dilakukan pembuatan cecair tiruan dengan memasukkan DNA daging babi ke dalam daging sapi dengan rasio berikut: 0.05% (b/b), 1% (b/b), 3% (b/b), dan 5%

(b/b). Eksperimen ini bertujuan untuk mengevaluasi kepekaan dalam mendeteksi pemalsuan daging.

HASIL DAN DISKUSI

Pada penelitian ini, DNA sampel yang diisolasi bertujuan untuk memperoleh DNA template dari masing-masing sampel yang akan dianalisis menggunakan PCR. Sebelum dilakukan pengujian menggunakan PCR, masing-masing DNA sampel diuji kemurnian dan konsentrasinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi DNA dinyatakan dalam satuan massa/volume, pembacaan absorbansi DNA dilakukan pada panjang gelombang 260nm (A260) dimana DNA menyerap cahaya yang paling kuat, namun pada panjang gelombang 260nm RNA juga memiliki absorbansi yang besar dan asam amino pada protein menyerap di panjang gelombang 280nm sehingga perhitungan tingkat kemurnian DNA dibaca pada rasio absorbansi 260 nm dibagi dengan 280 nm (A260/A280) (Winaya *et al.*, 2014; Marín *et al.*, 2021).

Hasil pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA disajikan pada tabel 1 dan 2, dari hasil tersebut diperoleh kemurnian DNA <1,8, hal ini menandakan bahwa isolate DNA tersebut masih terkontaminasi oleh protein yang ada pada sampel, dimana syarat indeks kemurnian DNA yaitu 1,8 hingga 2.0. DNA yang diperoleh, akan dilakukan analisis menggunakan PCR dengan konsentrasi optimal template yaitu 50 ng/µL, karena pada konsentrasi ini (Wahyuni, Maryam and Aminah, 2019) akan menghasilkan pita yang tebal apabila amplifikasi pada 30 siklus.

Running PCR yang dilakukan pada seluruh isolate DNA menggunakan primer spesifik babi dimana primer ini hanya mampu mengamplifikasi DNA target yaitu babi dan menghasilkan satu pita pada elektroforegram. Hal ini bertujuan untuk mengetahui apakah sampel tersebut mengandung babi atau tidak, bahkan jika terjadi kontaminasi DNA babi dalam produk karena PCR merupakan metode yang akurat dan sensitive dalam mendeteksi DNA target (Mariyani, Sismindari, and Rumiyati, 2021).

Analisis DNA menggunakan PCR mengacu pada protocol PCR yang telah ditetapkan yaitu sebanyak 30 siklus, suhu *annealing* 61°C sesuai dengan hasil optimasi

yang dilakukan Maryam. *Annealing temperature* sebagai suhu agar primer dapat berikatan dengan *template* (DNA) secara stabil sehingga membentuk untaian DNA yang baru (Sasmito, Kurniawan and Izzati, 2014)

Molekul DNA memiliki muatan negatif, sehingga apabila dikenai medan listrik pada kedua ujung gel, DNA yang bersifat negatif tersebut akan mengalami pergerakan dari kutub negatif (katoda) menuju kutub positif (anoda) (Sismindari, 2012), ini dilakukan pada tahapan elektroforesis gel agarose terhadap DNA sampel yang telah di *running* menggunakan PCR, sebelum elektroforesis dijalankan, terlebih dahulu DNA dictambahkan deng *loading dye* yang berfungsi sebagai pemberat agar DNA tidak keluar dari sumuran dan sebagai penanda laju migrasi DNA (Amresco, 1998). Hasilnya ditunjukkan sebagai elektroforegram seperti pada gambar 1 yang merupakan uji spesifitas primer. Berdasarkan elektroforegram pada nomor 11 dan 12 (DNA daging sapi dan DNA daging ayam) tidak menunjukkan adanya pembentukan pita DNA yang menandakan bahwa primer tersebut tidak mampu mengamplifikasi yang bukan DNA targetnya. Sedangkan pada nomor 10 (DNA babi) terbentuk pita DNA, hal ini menandakan bahwa primer spesifik babi yang digunakan mampu mengamplifikasi DNA babi yang berarti memiliki spesifitas yang baik karna hanya mampu mengamplifikasi DNA target.

Dasar dari pengujian batas deteksi pada sampel referensi (campuran daging babi-sapi)

adalah hasil uji spesifisitas primer sebelumnya. Elektroforegram uji batas deteksi DNA absolut dilakukan melalui serangkaian pengenceran 10 kali lipat dengan empat seri konsentrasi isolat DNA daging babi (lihat gambar 2), dimulai dari konsentrasi terkecil 0,05 ng/μL. Batas deteksi absolut menggambarkan kemampuan untuk mengidentifikasi jumlah template dari spesies target (Li et al., 2021). Pada pengujian batas deteksi relatif (campuran daging babi-sapi), tujuannya adalah mengenali rasio terendah spesies target dalam campuran (daging babi-daging sapi), dengan mensimulasikan kemungkinan penambahan spesies yang tidak diinginkan atau adanya kontaminasi silang (Skouridou et al., 2019). Hasilnya menunjukkan bahwa konsentrasi terkecil campuran daging babi, yakni 0,5% dalam 99,5% daging sapi, masih dapat terdeteksi.

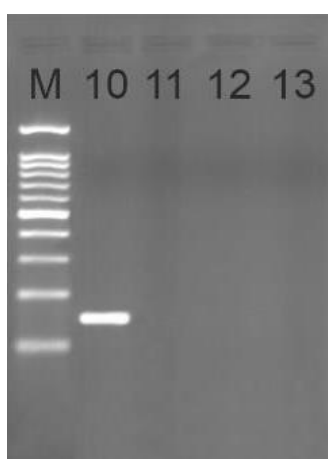
Dari analisis yang telah dilakukan, menandakan bahwa metode *Polymerase Chain Reaction* merupakan metode yang akurat dan spesifik seperti yang telah dilakukan (Maryam et al., 2016b) menggunakan *real time* PCR. Metode ini memenuhi persyaratan validasi yaitu uji spesifitas memberikan hasil yang positif terhadap spesies target dan memiliki sensitivitas yang tinggi yaitu mampu mendeteksi pada konsentrasi terkecil dari rangkaian konsentrasi yang ada (FDA, 2019; ICH, 2022) sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi DNA target pada produk yang beredar dipasaran sebagai langkah untuk autentikasi halal.

Tabel 1. Hasil Kemurnian dan Konsentrasi DNA Absolut

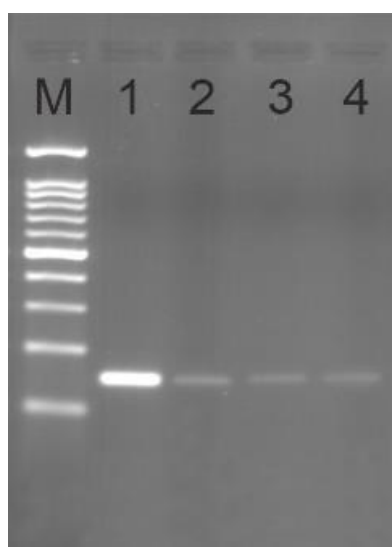
No.	Sampel	Konsentrasi DNA ng/μl	Indeks Kemurnian (A260/A280)
1	Daging Sapi	87,050	1,39
2	Daging Babi	87,050	1.34
3	Daging Ayam	86,425	1.33

Tabel 2. Hasil Kemurnian dan Konsentrasi DNA sampel Sosis Referensi

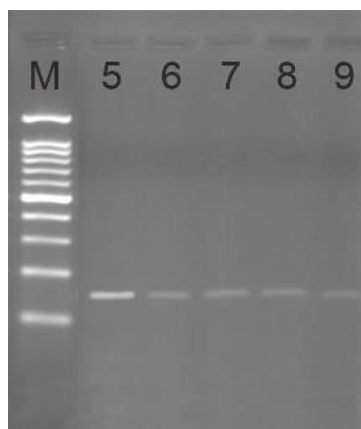
No.	Sampel	Konsentrasi DNA ng/ μ l	Indeks Kemurnian (A260/A280)
1	Sapi 100%	86,375	1,3
2	Babi 100%	83,150	1,29
3	Babi 5%	86,900	1,35
4	Babi 3%	84,200	1,31
5	Babi 1%	87,125	1,35
6	Babi 0,5%	86,075	1,33



Gambar 1. Elektroforegram Hasil PCR Uji Spesifitas
Ket: M (Marker) ; 10.(Spes. DNA Babi); 11. (Spes. DNA Sapi); 12. (Spes. DNA Ayam)



Gambar 2. Elektroforegram Uji Batas Deteksi DNA Absolut
Ket: 1 (DNA Babi 50 ng/ μ L); 2 (DNA Babi 5 ng/ μ L); 3 (DNA Babi 0,5 ng/ μ L); 4 (DNA Babi 0,05 ng/ μ L)



Gambar 3. Elektroforegram Uji Batas Deteksi DNA Referensi (campuran daging babi-sapi)
Ket : M (Marker); 5 (Formula Babi 100%); 6 (Form. Babi 5%); 7 (Form. Babi 3%); 8 (Form. Babi 1%); 9 (Form. Babi 0,5%).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa metode PCR yang menggunakan primer cytb memenuhi kriteria validasi, termasuk uji spesifisitas, dan menunjukkan tingkat sensitivitas yang setara dengan metode real-time PCR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami menyampaikan terima kasih kepada Yayasan Pelita Mas Palu atas pendanaan penelitian, dan terimakasih kepada Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Pelita Mas Palu yang telah memfasilitas penelitian ini.

REFERENSI

- Aina, G. *et al.* (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), p. 300. Available at: <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f348>.
- Amresco (1998) 'Electrophoresis Loading Dyes for Acrylamide and Agarose Electrophoresis (E190, E269, E274)'. Available at: <https://www.interchim.fr/ft/6/662600.pdf> (Accessed: 10 September 2023).
- Che Man, Y.B. *et al.* (2012) 'Porcine-Specific Polymerase Chain Reaction Assay Based on Mitochondrial D-Loop Gene for Identification of Pork in Raw Meat', *International Journal of Food Properties*, 15(1), pp. 134–144. Available at: <https://doi.org/10.1080/10942911003754692>.
- FDA (2019) 'Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis of Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products'. U.S. Food and Drug Administration.
- Guntarti, A. *et al.* (2015) 'FTIR Spectroscopy in Combination with Chemometrics for Analysis of Wild Boar Meat in Meatball Formulation', *Asian Journal of Biochemistry*, 10(4), pp. 165–172. Available at: <https://doi.org/10.3923/ajb.2015.165.172>.
- ICH (2022) 'ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures'. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (Accessed: 9 September 2023).
- IkaWidyasa, Y., . S. and Rohman, A. (2015) 'Detection of Rat Meat Adulteration in Meat Ball Formulations Employing Real-Time PCR', *Asian Journal of Animal Sciences*, 9(6), pp. 460–465. Available at: <https://doi.org/10.3923/ajas.2015.460.465>.
- Li, Jinchun *et al.* (2021) 'Identification of eleven meat species in foodstuff by a hexaplex

- real-time PCR with melting curve analysis', *Food Control*, 121, p. 107599. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107599>.
- Marin, D.V. *et al.* (2021) 'An optimised high-quality DNA isolation protocol for *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)', *MethodsX*, 8, p. 101255. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101255>.
- Mariyani, Sismindari, and Rumiati (2021) 'Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi DNA Babi (*Sus Scrofa Domestica*) dan Celeng (*Sus Barbatus*) pada Sosis Sapi', *Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia*, 6(8). Available at: <https://doi.org/10.36418/syntax-literate.v6i8.3806>.
- Maryam, St. *et al.* (2016a) 'Determination 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), pp. 187–195. Available at: <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1020434>.
- Maryam, St. *et al.* (2016b) 'Determination 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), pp. 187–195. Available at: <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1020434>.
- Nakyinsige, K., Man, Y.B.C. and Sazili, A.Q. (2012) 'Halal authenticity issues in meat and meat products', *Meat Science*, 91(3), pp. 207–214. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.015>.
- Sasmito, D.E.K., Kurniawan, R. and Izzati, M. (2014) 'Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review', *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V* [Preprint].
- Sepminarti, T. *et al.* (2015) 'Real-Time Polymerase Chain Reaction for Halal Authentication of Gelatin in Soft Candy', *Asian Journal of Biochemistry*, 11(1), pp. 34–43. Available at: <https://doi.org/10.3923/ajb.2016.34.43>.
- Sismindari (2012) *Replikasi DNA Dan Mutasi, 1st ed, Seri Biologi Molekuler Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar (1).
- Skouridou, V. *et al.* (2019) 'Duplex PCR-ELONA for the detection of pork adulteration in meat products', *Food Chemistry*, 287, pp. 354–362. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.095>.
- Wahyuni, S., Maryam, S. and Aminah, A. (2019) 'Validasi Metode Analisis Cemaran DNA Babi pada Bakso Sapi Menggunakan Primer Mitokondria D-Loop22 dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR): Analysis Method Validation of Pig DNA Contamination in Cow Meatballs Using Mitochondrial Primer D-Loop22 by Polymerase Chain Reaction (PCR) Method', *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 5(1), pp. 65–72. Available at: <https://doi.org/10.22487/j24428744.2019.v5.i1.12035>.