

---

---

## VERIFIKASI METODE DETEKSI PORCINE BERDASARKAN SNI ISO/TS 20224-3: 2020 PADA MATRIKS GELATIN

### *Verification of Porcine Detection Method Based On SNI ISO/TS 20224-3:2020 On The Gelatin Matrix*

Anna Safarrida<sup>1</sup>, Auraga Dewantoro<sup>1</sup>, Dianti Rahmasari<sup>2</sup>, Umi Nuraeni<sup>3</sup>, Rika Dwi Susmiarni<sup>3</sup>,  
Dini Apriori<sup>3</sup>, Rosalin Damacena<sup>3</sup>, Muhammad Malhan Amin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pusat Riset Rekayasa Genetika, Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan, Badan Riset dan Inovasi Nasional

<sup>2</sup> Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kobe University

<sup>3</sup>Laboratorium Standar Nasional Satuan Ukuran Biologi, Direktorat Standar Nasional Satuan Ukuran Mekanika, Radiasi, dan Biologi, Badan Standardisasi Nasional

E-mail: [anna003@brin.go.id](mailto:anna003@brin.go.id)

Diterima: 25 November 2022, Direvisi: 29 maret 2023 Disetujui: 3 Oktober 2023

#### Abstrak

Kebutuhan gelatin untuk memenuhi bahan baku pada produk pangan, farmasi, dan kesehatan terus meningkat. Namun, tingginya impor gelatin yang didominasi membuat kekhawatiran terkait status kehalalan produk gelatin. Salah satu metode deteksi *porcine* secara molekuler adalah teknik amplifikasi DNA menggunakan *qPCR* (*quantitative polymerase chain reaction*). Badan Standardisasi Nasional (BSN) telah mengadopsi salah satu metode potensial terkait deteksi molekuler identifikasi *porcine* (babi), yaitu SNI ISO/TS 20224-3:2020 dengan lingkup spesies *Sus sucrofa* dan *Sus sucrofa domesticus*. Penggunaan metode tersebut belum teridentifikasi untuk penggunaan pada sampel gelatin, sehingga kebutuhan verifikasi metode SNI ISO/TS 20224-3:2020 diperlukan sebagai metode acuan yang terstandar dalam deteksi *porcine*. Penelitian ini berhasil memverifikasi metode SNI ISO/TS 20224-3:2020 pada sampel gelatin berat 200mg. Kurva amplifikasi *real time PCR* menggunakan primer spesifik babi menunjukkan bahwa matriks standar gelatin babi teramplifikasi dengan nilai Cq rata-rata  $34.56 \pm 0.53$ , dan sampel daging babi teramplifikasi dengan nilai Cq sebesar  $18.79 \pm 0.28$ , sedangkan kontrol negatif (daging sapi) tidak menunjukkan kurva amplifikasi. Korelasi data konsentrasi DNA matriks standar gelatin babi, daging babi, dan daging sapi dengan data hasil amplifikasi *real time PCR*, menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi DNA maka semakin kecil nilai Cq. Sebaliknya, semakin kecil konsentrasi DNA maka semakin besar nilai Cq. Dengan demikian, kandungan DNA porcine semakin tinggi dengan semakin rendahnya nilai Cq.

**Kata kunci:** qPCR, halal, Hydrolysis Probe, Cq

#### Abstract

Gelatin demands as raw material for food, pharmaceutical, and health increased significant in last five years. The fulfillment of national needs is still met by imported products, while the world's source of gelatin production is still dominated by pork skins. The high import of gelatin raises concerns regarding the halal status of gelatin products. One of the molecular detection methods for porcine is DNA amplification technique using qPCR (quantitative polymerase chain reaction). DNA amplification requires a pair of specific primers taken from the mitochondrial DNA of the cytochrome B region and hydrolysis of the probe as a fluorescent dye. The National Standardization Agency (BSN) has adopted one of the potential methods related to molecular detection of porcine identification, namely SNI/ISO 20224-3: 2020 with the scope of species *Sus sucrofa* and *Sus sucrofa domesticus*. The use of this method has not been identified for use on gelatin samples, therefore the need for verification of the ISO 20224-3:2020 method is needed on gelatin samples to identify the suitability of the method on gelatin products as a standardized reference method in porcine detection. This study succeeded in verifying the ISO 20224-3:2020 method on 200mg gelatine samples. Real time PCR amplification curves using pig-specific primers showed that the standard porcine gelatin matrix was amplified with Cq values  $34.56 \pm 0.53$ , and pork fresh meat was amplified with Cq  $18.79 \pm 0.28$ , while the negative control (beef) did not show a curve amplification. The correlation of the DNA concentration matrix of standard gelatine pork, pork, and beef with the amplified data from real time PCR is that the greater the DNA concentration, the smaller the Cq value, and conversely the smaller the DNA concentration, the greater the Cq value. So, the porcine DNA content is higher with decreasing Cq value.

**keywords:** qPCR, halal, Hydrolysis Probe, Cq

## 1. PENDAHULUAN

Kebutuhan akan gelatin terus meningkat untuk memenuhi bahan baku pada produk pangan, farmasi dan kesehatan. Pemenuhan kebutuhan nasional masih didominasi dari impor. Impor gelatin terus meningkat dalam 5 tahun terakhir dari sekitar 40.000 kg pada tahun 2017 menjadi sekitar 1,9 juta kg pada tahun 2021 (Badan Pusat Statistik, 2022).

Gelatin merupakan senyawa yang didapatkan dari ekstraksi hewan yang banyak mengandung kolagen. Bahan ini banyak digunakan pada industri pangan sebagai pengemulsi, pengikat dan pengendap makanan (Hastuti & Sumpe, 2007). Sumber produksi gelatin dunia masih didominasi dari kulit babi karena harganya yang relatif murah. Tingginya impor gelatin di Indonesia membuat kekhawatiran terkait status kehalalan produk gelatin karena besarnya jumlah umat muslim di Indonesia. Hal ini juga didukung dorongan dari pemerintah melalui Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 2021 Tentang Penyelenggaraan Bidang Jaminan Produk Halal yang mewajibkan kejelasan status halal pada produk yang beredar di Indonesia. Oleh karena itu, status kehalalan produk berdasar gelatin menjadi penting terutama terhadap gelatin berasal dari babi.

Status kehalalan produk gelatin dapat dianalisis melalui pendekatan pengujian amplifikasi asam nukleat, salah satunya, yaitu dengan PCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*). Metode ini telah banyak digunakan untuk deteksi DNA (*Deoxyribose Nucleic Acid*) *porcine* dalam gelatin pada *soft candy* (Fadhlurrahman *et al.*, 2015), gelatin murni (Demirhan, *et al.*, 2012), dan gelatin dalam kapsul (Mohammad NA, *et al.*, 2018). Namun, saat ini masih ditemukan perbedaan hasil pengujian karena primer yang digunakan dalam metode qPCR bervariasi, diantaranya primer *cyt b* (Fadhlurrahman *et al.*, 2015) atau primer *beta-actin* (ISO, 2020). Selain itu, dengan sifat gelatin yang diperkirakan memiliki konsentrasi DNA (yang rendah akibat telah melalui proses pengolahan yang kompleks, menyebabkan ekstraksi DNA dari sampel gelatin menjadi tantangan tersendiri (Fadhlurrahman *et al.*, 2015). Oleh karena itu, diperlukan pengembangan metode yang terstandar terutama dalam memastikan hasil uji *porcine* untuk sertifikasi halal.

Badan Standardisasi Nasional (BSN) telah mengadopsi salah satu metode potensial terkait deteksi molekuler identifikasi *porcine* (babi) yaitu,

SNI/ISO 20224-3: 2020. Metode ini digunakan untuk identifikasi kandungan *porcine* pada makanan dan pakan dengan lingkup spesies *Sus scrofa* dan *Sus scrofa domesticus*. Penggunaan metode tersebut belum teridentifikasi untuk penggunaan pada sampel gelatin yang merupakan sampel proses tingkat tinggi. Penggunaan metode SNI/ISO 20224-3: 2020 memiliki potensi yang besar jika akan digunakan sebagai metode baku untuk identifikasi *porcine* pada produk gelatin. Oleh karena itu, kebutuhan verifikasi metode ISO 20224-3:2020 diperlukan pada sampel gelatin untuk mengidentifikasi kesesuaian metode pada produk gelatin sebagai metode acuan yang terstandar dalam deteksi *porcine*.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### Gelatin dan produk mengandung gelatin

Gelatin merupakan polimer alami yang terbuat dari hidrolisis protein kolagen. Berdasarkan pembuatannya, gelatin dapat dikategorikan menjadi dua tipe, yaitu gelatin tipe A dan gelatin tipe B. Tipe A adalah gelatin yang dibuat dengan perlakuan asam, paling sering digunakan pada kulit babi. Tipe B adalah gelatin dengan perlakuan alkali yang dapat diterapkan pada kolagen yang lebih kompleks seperti pada kulit sapi (Narayanawamy *et al.*, 2016).

Gelatin merupakan salah satu komponen penting dalam industri makanan modern karena fungsinya sebagai *gelling agent*. Kemampuan ini digunakan untuk memberikan tekstur dan menstabilkan struktur makanan (Alipal *et al.*, 2021). Penggunaan gelatin pada produk daging kalengan berfungsi untuk menahan sari daging dan menjadi media perpindahan panas yang baik selama memasak (Mariod & Adam, 2013). Gelatin juga dapat digunakan sebagai *gelling agent* untuk kosmetik dan produk kesehatan, seperti sampo, tabir surya, *body lotion*, *hair spray* dan krim wajah. Berbagai makanan fungsional dan nutrisi yang terbuat dari produk kolagen dan gelatin telah banyak digunakan di bidang perawatan kulit. Dalam industri farmasi, gelatin juga digunakan untuk pembuatan kapsul obat yang aman bagi pasien (Al-Nimry *et al.*, 2021).

Penggunaan gelatin pada berbagai produk menimbulkan perhatian khusus pada umat muslim terkait asal usul sumber gelatin. Sumber gelatin yang berasal dari babi tidak dapat dikonsumsi oleh umat muslim sehingga kejelasan status halal menjadi penting yang sejalan dengan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 39 Tahun

2021 Tentang Penyelenggaraan Bidang Jaminan Produk Halal terkait setiap kejelasan produk yang beredar di Indonesia.

#### Verifikasi Metode

Laboratorium pengujian direkomendasikan untuk melakukan validasi ulang ataupun memverifikasi suatu metode pengujian untuk memastikan metode yang digunakan tepat. Verifikasi mengaitkan lebih sedikit parameter percobaan dibanding validasi. Verifikasi metode ialah seperangkat standar eksperimental uji yang menciptakan informasi yang berkaitan dengan akurasi, presisi dsb. Prosedur yang direkomendasikan wajib dilakukan sedekat mungkin. Apabila terjadi perubahan yang signifikan, perlu dilakukan validasi secara penuh. Apabila metode dimodifikasi ataupun diterapkan pada matriks sampel yang berbeda, dibutuhkan validasi ulang ataupun verifikasi tergantung pada metode dan matriks yang digunakan. Parameter yang dilakukan dalam pengujian verifikasi metode kuantitatif untuk yaitu menurut Riyanto (2014) sebagai berikut:

1. Kekhususan/ selektivitas serta LOD (*Limit of Detection*) bila matriks sampel berbeda dari yang digunakan dalam pengembangan tata cara.
2. Akurasi (bias) (dalam keadaan pengulangan atau *reproducibility*)
3. Presisi (dalam keadaan pengulangan atau *reproducibility*)

#### Metode Deteksi DNA Babi Berdasarkan SNI ISO/TS 20224 – 3:2020

Metode ini digunakan untuk pendeteksian DNA *porcine* (babi) yang berisifat kualitatif yang terkandung pada makanan dan pakan dengan menggunakan *real-time Polymerase Chain Reaction* (*real-time PCR*). Pengujian ini membutuhkan ekstraksi DNA (*Deoxyribose Nucleic Acid*) yang dapat diamplifikasi dengan menggunakan PCR dalam jumlah yang cukup. Target yang digunakan dalam metode ini gen *beta actin* dan memiliki batas deteksi mutlak lima *copy* per reaksi, dengan *replicability*  $\geq 95\%$ . Dalam metode standar ini telah dijelaskan mengenai protokol essai pengujian dan protokol pengaturan siklus pengujian pada *real-time PCR*.

Urutan target dianggap terdeteksi jika:

1. primer spesifik babi *Porcine-97bp-F* dan *Porcine-97bp-R* dan probe *Porcine97bp-P* menghasilkan kurva amplifikasi berbentuk

sigmoid dan nilai Ct atau nilai Cq dapat dihitung;

2. Reaksi kontrol PCR tanpa DNA tambahan (kontrol reagen PCR, blangko ekstraksi kontrol) tidak menghasilkan amplifikasi;
3. kontrol amplifikasi (kontrol target DNA positif, kontrol penghambatan PCR) menghasilkan amplifikasi yang diharapkan dan nilai Ct (atau nilai Cq).

#### Metode qPCR untuk deteksi *porcine* pada matrik produk gelatin

Secara umum, deteksi *porcine* banyak menggunakan desain dari Tanabe *et al.*, (2007) dengan markah molekuler *cytochrome b*. Gen tersebut merupakan bagian dari mitokondria yang bersifat multikopi sehingga diharapkan hasil pengujian lebih sensitif. Pengembangan terkait markah molekuler *cytochrome b* terus berlanjut seperti pada daging segar (Cammà & Domenico, 2012), gelatin (Shabani *et al.*, 2015), kapsul obat (Nikzad *et al.*, 2017) dan berbagai macam pangan olahan (Ulca *et al.*, 2013). Penggunaan gen di mitokondria seperti *D-loop* juga telah digunakan untuk deteksi *porcine* (Sudjadi *et al.*, 2016). Penggunaan markah molekuler dari mitokondria masih dominan digunakan untuk autentikasi halal hingga saat ini.

Penggunaan marka molekuler yang bersifat *single copy gene* seperti *beta actin* mulai direkomendasikan karena memiliki keakuratan yang lebih tinggi dalam identifikasi spesies terutama untuk pengujian yang bersifat kuantitatif (ISO, 2020). Standar SNI ISO 20224-3:2020 menggunakan gen *beta-actin* sebagai markah molekulernya. Belum ada laporan atau hasil pengujian lebih lanjut terkait penggunaan metode ini pada produk gelatin. Penggunaan markah molekuler *single copy gene* memiliki tingkat sensitivitas yang lebih rendah jika dibandingkan gen multikopi seperti mitokondria, sehingga ada kemungkinan terjadinya *false negative* pada sampel yang mengalami tingkat proses tinggi. Oleh karena itu, percobaan metode ISO menggunakan *beta actin* perlu dikaji lebih lanjut terkait penerapannya jika akan dijadikan metode standar.

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium SNSU, Direktorat Standar Nasional Satuan Ukuran Mekanika, Radiasi, dan Biologi Badan

Standardisasi Nasional. Waktu pelaksanaan bulan Agustus hingga September 2022.

### 3.2. Alat dan Bahan

#### 3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikropipet ukuran 10 µl, 200 µl, 1000 µl, tips 10 µl, 200 µl, 1000 µl, tube dan mikrotube, timbangan digital [Mettler Toledo], spektrofotometer nano drop (BioDrop), *sentrifuge* (Thermo Fisher), dan mesin *real-time* PCR (CFX Opus 96 Real-Time PCR System).

#### 3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging sapi, daging babi, standar gelatin babi pro analisa (Sigma Aldrich), klorofom (Merck), satu set DNeasy® mericon Food Kit, kontrol positif plasmid pUC57 yang sudah terinsersi gen target *beta actin porcine* sesuai SNI/ISO 20224-3:2020, TagMan Probe Master (*iTaq Universal Probes Supermix*), dan primer-probe seperti pada Tabel 1.

Tabel 1 Susunan basa primer dan probe untuk DNA babi (SNI/ISO/TS 20224-3).

|         |   |
|---------|---|
| Forward | 5'-CGTAGGTGCACAGTAGGTCTGAC-3'           |
| Reverse | 5'-GGCCAGACTGGGGACATG-3'                |
| Probe   | 5'-[FAM]-CCAGGTCCGGGGAGTC-[NFQ-MGB]b-3' |

### 3.3. Prosedur kerja

Proses isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan Qiagen DNeasy® mericon Food Kit.

#### 3.3.1. Isolasi DNA

Sampel yang digunakan untuk bubuk gelatin babi murni (Sigma-Aldrich) sebanyak 200 mg dengan 30 ulangan. Sampel daging babi dan sapi digunakan sebesar 100 mg sebanyak 8 ulangan sebagai pembanding. Semua sampel dimasukkan masing-masing ke dalam *microcentrifuge tube*. Selanjutnya, ditambahkan 1 mL food lysis buffer dan 2,5 µl proteinase K solution. Vortex campuran sampel hingga sampel tersuspensi dengan sempurna. Inkubasi pada suhu 60°C selama 45 menit untuk sampel gelatin dan 30 menit pada sampel daging menggunakan *heat block*. Setelah sampel larut, didiamkan pada suhu ruang sampai suhunya turun. Setelah itu, campuran disentrifuse pada 2.500 g selama 5 menit. Lalu, 700 µl supernatan ditransfer dengan hati hati ke dalam *microcentrifuge tube* baru yang sebelumnya sudah di tambahkan klorofom sebanyak 500 µl. Vortex campuran sampel hingga sampel tersuspensi dengan sempurna. Setelah itu, campuran disentrifus pada 14.000 g selama 15

menit. Disiapkan 1 ml *buffer* PB di dalam *microcentrifuge tube* baru, kemudian dipindahkan 250 µl fase atas secara perlahan dari campuran yang sudah disentrifuse. Selanjutnya, campuran sampel divortex hingga sampel tersuspensi dengan sempurna. Disiapkan kolom *QIAquick spin* ke dalam *Collection tube* (2 mL). 600 µl supernatant campuran dipindahkan ke dalam kolom, dan dilakukan sentrifuse 17.900 g selama 1 menit. *Filtrate* yang tertampung dalam *collection tube* dibuang dan ditempatkan kembali kolom ke dalam *collection tube*. Kemudian, ditambahkan 500 µL *Buffer AW2* ke kolom *QIAquick spin*. Dilakukan *sentrifuge* pada 17.900 g selama 1 menit. *Filtrate* yang tertampung dalam *collection tube* dibuang kembali dan ditempatkan kembali kolom ke dalam *collection tube*. Dilakukan *sentrifuge* kembali pada 17.900 g selama 1 menit. Kolom *QIAquick spin* dipindahkan ke dalam 1,5 mL *microcentrifuge tube* baru dan ditambahkan 50 µL *Buffer EB* ke dalam kolom. Tutupnya dibuka dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang, tutup dan disentrifuge pada 17.900 g selama 1 menit untuk melarutkan DNA. DNA disimpan pada suhu -20°C. Kemurnian dan konsentrasi DNA diukur menggunakan spektrofotometer Nano Drop (BioDrop).

#### 3.3.2. Amplifikasi *Real-Time* PCR

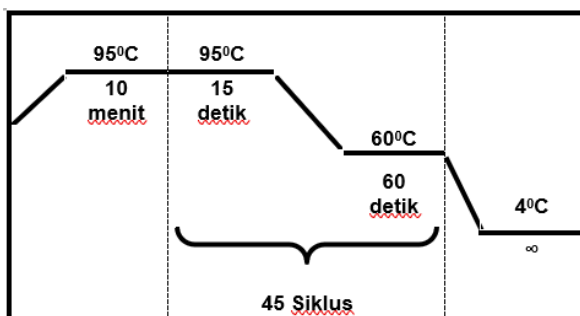
Metode PCR dan komposisi mengikuti SNI/ISO 202234-3:2020 yang terdapat pada Tabel 2. Campuran master mix dimasukkan ke dalam *multiwell plate* pada *well* yang diinginkan dan ditambahkan sampel DNA. Selanjutnya, *multiwell plate* yang sudah siap ditutup menggunakan *sealing foil*, dan siap dimasukkan ke dalam mesin *real time PCR*.

Tabel 2 Komposisi *Real-Time* PCR.

| No.                 | Reagen                                | Konsentrasi akhir  | Volume (µl) |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------|-------------|
| 1.                  | <i>iTaq Universal Probes Supermix</i> | 1 X                | 12,5        |
| 2.                  | <i>Primer Forward</i>                 | 10 µM              | 1           |
| 3.                  | <i>Primer Reverse</i>                 | 10 µM              | 1           |
| 4.                  | <i>Template DNA</i>                   | 20 ng/µl–200 ng/µl | 5           |
| 5.                  | <i>Probe</i>                          | 10 µM              | 0,5         |
| 6.                  | <i>Nuclease free water (NFW)</i>      |                    | 5           |
| <b>Total Volume</b> |                                       |                    | <b>25</b>   |

Pengaturan program mesin *real-time* PCR (CFX Opus 96 *Real-Time* PCR System) pada penelitian ini, yaitu tahap predenaturasi diatur pada suhu 95° C selama 10 menit, dilanjutkan dengan tahap denaturasi yang diatur pada suhu yang sama dengan suhu sebelumnya selama 15 detik. Tahap *annealing* dan *elongation* diatur pada suhu 60°C selama 60 detik. Proses PCR ini diatur sebanyak 45 siklus. Tahap

penyimpanan diatur pada suhu 4°C selama tak terhingga. Setelah setiap tahap telah diatur suhu dan waktunya, tekan tombol PCR untuk memulai proses amplifikasi dan tunggu hingga mesin PCR selesai beroperasi (Gambar 1).



Gambar 1. Siklus Real Time PCR.

### 3.3.2 Pengujian Konsentrasi DNA

Hasil ekstraksi DNA diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan alat spektrofotometer BioDrop. Konsentrasi DNA rata-rata yang diuji dengan Spektrofotometer Nanodrop sebesar 60,304 ng/μl. DNA berkualitas baik memiliki kemurnian antara 1,8 – 2,0 dan konsentrasi di atas 100 ng/μl (Dewanta dan Mushlih, 2021).

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Analisis konsentrasi dan kemurnian genom DNA

Proses ekstraksi DNA (*Deoxyribose Nucleic Acid*) genom merupakan tahap awal yang penting karena merupakan awal dari semua proses

verifikasi data ini. Ekstraksi ini merupakan proses untuk mendapatkan genom DNA dengan konsentrasi tinggi dan kemurnian antara 1.8 – 2.0. Ada 3 (tiga) tahapan dalam proses ekstraksi DNA, yaitu proses perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari makromolekul sel, dan pemurnian DNA. Prinsipnya asam nukleat akan teradsorpsi oleh matriks silika pada kolom filter dengan adanya garam *chaotropic* (natrium asetat, atau guanidine tiosianat). Adsorpsi asam nukleat dengan kolom matriks silika disebabkan adanya afinitas tinggi antara rantai asam nukleat yang bermuatan negatif dengan kolom matriks silika yang bermuatan positif. Kekuatan adsorpsi matriks silika terhadap genom bergantung kepada pH lingkungan dan kekuatan ion. Asam nukleat yang teradsorpsi oleh matriks silika akan mudah dibersihkan dari pengotor lainnya menggunakan proses sentifuse. Asam nukleat yang sudah teradsorpsi pada matriks silika dapat dielusi dengan menambahkan larutan rendah garam (Kamaliah, 2017). Sampel dilisiskan terlebih dahulu menggunakan 1 mL *food lysis buffer* dan 2,5 μl proteinasi K solution. Larutan *lysis buffer* mengandung reagen yang mengikat ion magnesium pada dinding sel, sedangkan proteinase K berfungsi sebagai pendegradasi protein yang terikat pada DNA. Berdasarkan hasil pengujian ini, dilakukan modifikasi inkubasi pada suhu 60°C selama 45 menit (berdasarkan optimasi sampel) agar sampel gelatin dapat larut sempurna. Hal ini dikarenakan sampel gelatin mudah menggumpal sehingga membutuhkan inkubasi yang lebih lama. Data konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 3 Konsentrasi (ng/μl) dan kemurnian (260/280) DNA gelatin babi.

| No. | Kode | (ng/μl) | [260/280] | No. | Kode | (ng/μl) | [260/280] |
|-----|------|---------|-----------|-----|------|---------|-----------|
| 1.  | G 1  | 4       | 2,00      | 16. | G 16 | 4       | 1,33      |
| 2.  | G 2  | 4       | 2,00      | 17. | G 17 | 5       | 1,25      |
| 3.  | G 3  | 3       | 1,50      | 18. | G 18 | 6       | 1,50      |
| 4.  | G 4  | 4       | 1,33      | 19. | G 19 | 6       | 1,50      |
| 5.  | G 5  | 4       | 2,00      | 20. | G 20 | 5       | 1,25      |
| 6.  | G 6  | 4       | 1,33      | 21. | G 21 | 6       | 1,50      |
| 7.  | G 7  | 4       | 1,33      | 22. | G 22 | 6       | 1,20      |
| 8.  | G 8  | 4       | 1,33      | 23. | G 23 | 7       | 1,40      |
| 9.  | G 9  | 4       | 1,33      | 24. | G 24 | 6       | 1,50      |
| 10. | G 10 | 5       | 1,67      | 25. | G 25 | 6       | 1,50      |
| 11. | G 11 | 5       | 1,67      | 26. | G 26 | 7       | 1,40      |

| No. | Kode | (ng/μl) | [260/280] | No. | Kode | (ng/μl) | [260/280] |
|-----|------|---------|-----------|-----|------|---------|-----------|
| 12. | G 12 | 6       | 1,50      | 27. | G 27 | 6       | 1,50      |
| 13. | G 13 | 5       | 1,25      | 28. | G 28 | 7       | 1,40      |
| 14. | G 14 | 6       | 1,50      | 29. | G 29 | 6       | 1,50      |
| 15. | G 15 | 5       | 1,25      | 30. | G 30 | 7       | 1,20      |

Ket : G adalah sampel gelatin babi sebanyak 200 mg.

Tabel 4 Konsentrasi (ng/μl) dan kemurnian (260/280) genom DNA daging babi dan sapi.

| No. | Kode | (ng/μl) | [260/280] | No. | Kode | (ng/μl) | [260/280] |
|-----|------|---------|-----------|-----|------|---------|-----------|
| 1.  | B1   | 418     | 1.817     | 9.  | S1   | 377     | 1.83      |
| 2.  | B2   | 210     | 1.810     | 10. | S2   | 292     | 1.836     |
| 3.  | B3   | 410     | 1.822     | 11. | S3   | 359     | 1.832     |
| 4.  | B4   | 345     | 1.816     | 12. | S4   | 336     | 1.826     |
| 5.  | B5   | 262     | 1.819     | 13. | S5   | 278     | 1.817     |
| 6.  | B6   | 463     | 1.816     | 14. | S6   | 270     | 1.824     |
| 7.  | B7   | 391     | 1.810     | 15. | S7   | 227     | 1.802     |
| 8.  | B8   | 397     | 1.813     | 16. | S8   | 370     | 1.814     |

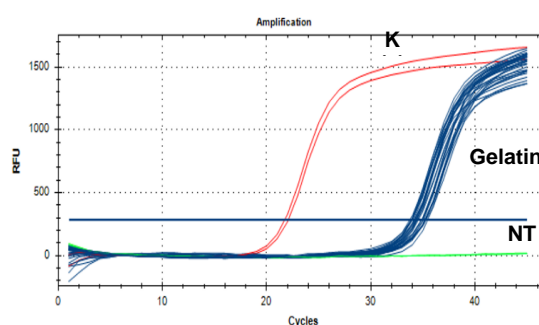
Ket : B adalah sampel daging babi.  
S adalah sampel daging sapi.

Hasil konsentrasi dan kemurnian DNA sampel gelatin babi cenderung lebih kecil dan memiliki kemurnian yang tidak sebaik pada sampel daging segar sebagaimana terlihat pada Tabel 3. Sampel daging segar cenderung menghasilkan konsentrasi DNA lebih tinggi dengan kriteria kemurnian yang baik antara 1.8 - 2.0 seperti tampak pada Tabel 4. Perbedaan ini disebabkan sampel daging belum mengalami proses pengolahan, sedangkan pada sampel gelatin sudah dilakukan proses olahan. Sampel daging memiliki sel yang banyak, sedangkan sampel gelatin memiliki sel lebih sedikit karena merupakan produk hasil hidrolisis dari kolagen yang menyebabkan denaturasi DNA (Cai et al., 2012; Iwobi et al., 2015). Rendahnya kemurnian gelatin babi disebabkan karena adanya kontaminan protein. Tingginya kandungan protein dalam sampel gelatin menyebabkan masih tertinggalnya molekul protein dalam DNA sampel gelatin babi. Menurut Qiagen (2019), uji spektroskopi 260/280 dan 260/230 pada sampel makanan yang kompleks tidak memiliki korelasi terhadap performa PCR (*Polymerase Chain Reaction*) karena adanya pengotor yang tidak

terhindarkan pada sampel sehingga pendekatan evaluasi absorsi DNA dan protein kurang reliabel.

#### 4.2. Amplifikasi DNA pada *real-time* PCR

Hasil kurva amplifikasi *real-time* PCR sebagaimana terlihat pada Gambar 2 menunjukkan bahwa seluruh sampel gelatin babi terlihat tidak adanya perbedaan kenaikan kurva amplifikasi yang signifikan. Nilai Cq sampel gelatin babi menunjukkan nilai rata-rata sebesar  $34.56 \pm 0.53$ .



Gambar 2 Kurva hasil amplifikasi 30 ulangan sampel gelatin babi pada *real time* PCR.

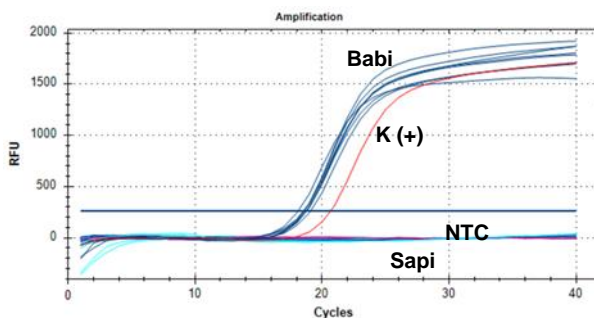
Tabel 5 Nilai Cq hasil amplifikasi *real time* sampel standar gelatin babi.

| No. | Kode | Nilai Cq | No. | Kode | Nilai Cq |
|-----|------|----------|-----|------|----------|
| 1.  | G 1  | 34,33    | 18. | G 18 | 34,36    |
| 2.  | G 2  | 35,46    | 19. | G 19 | 35,06    |

| No. | Kode | Nilai Cq | No. | Kode  | Nilai Cq |
|-----|------|----------|-----|-------|----------|
| 3.  | G 3  | 35,19    | 20. | G 20  | 35,02    |
| 4.  | G 4  | 34,56    | 21. | G 21  | 34,89    |
| 5.  | G 5  | 35,25    | 22. | G 22  | 33,98    |
| 6.  | G 6  | 34,18    | 23. | G 23  | 34,25    |
| 7.  | G 7  | 35,31    | 24. | G 24  | 34,44    |
| 8.  | G 8  | 33,92    | 25. | G 25  | 34,88    |
| 9.  | G 9  | 33,87    | 26. | G 26  | 34,35    |
| 10. | G 10 | 34,47    | 27. | G 27  | 35,25    |
| 11. | G 11 | 33,95    | 28. | G 28  | 34,00    |
| 12. | G 12 | 34,21    | 29. | G 29  | 34,37    |
| 13. | G 13 | 34,12    | 30. | G 30  | 35,22    |
| 14. | G 14 | 35,21    | 31. | K (+) | 22,08    |
| 15. | G 15 | 33,92    | 32. | K (+) | 21,73    |
| 16. | G 16 | 33,75    | 33. | NTC   | 0        |
| 17. | G 17 | 34,90    | 34. | NTC   | 0        |

**Ket :** G adalah sampel gelatin babi sebanyak 200 mg.  
K (+) adalah sampel plasmid pUC57-bopc.  
NTC adalah *non-template control*

Secara perinci, nilai Cq sampel gelatin babi terendah adalah 33.75 dan tertinggi sebesar 35.46 (Tabel 5). Nilai Cq yang cukup besar disebabkan konsentrasi DNA gelatin yang didapatkan cukup rendah dan adanya degradasi DNA menjadi fragmen kecil akibat adanya proses pengolahan pada makanan untuk mendapatkan gelatin murni (Shabani et al., 2015).



Gambar 3. Hasil amplifikasi sampel daging babi dan sampel daging sapi pada *real time PCR*.

Sampel daging babi memiliki rata-rata nilai Cq sebesar  $18.79 \pm 0.28$ . Nilai Cq terendah

sebesar 18.11 dan yang tertinggi bernilai 19.09 seperti terlihat pada Tabel 6. Tidak ditunjukkan adanya kenaikan nilai Cq pada sampel daging sapi dan NTC yang menandakan tidak adanya kontaminasi dan amplifikasi pada reaksi tersebut sesuai Gambar 3. Perbedaan nilai Cq yang signifikan antara sampel daging dan gelatin disebabkan perbedaan konsentrasi DNA yang didapatkan pada hasil ekstraksi DNA, namun masih dapat dideteksi oleh mesin *real-time PCR*. Limit deteksi hasil dari pengujian sampel gelatin adalah 38,95.

Penggunaan metode SNI/ISO 20224-3:2020 menunjukkan hasil yang cukup konsisten pada sampel gelatin murni dengan nilai Cq rata-rata  $34.56 \pm 0.53$ . Tingginya nilai Cq disebabkan konsentrasi DNA yang rendah, namun masih cukup sensitif untuk dapat mendeteksi DNA babi pada sampel gelatin dengan gen target beta actin yang merupakan gen *single copy*. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi DNA maka semakin kecil nilai Cq, dan sebaliknya semakin kecil konsentrasi DNA maka semakin besar nilai Cq.

Tabel 6 Nilai Cq hasil amplifikasi *real time PCR* sampel daging babi dan daging sapi.

| No. | Kode | Nilai Cq | No. | Kode | Nilai Cq |
|-----|------|----------|-----|------|----------|
| 1.  | B1   | 18.11    | 11. | S3   | 0        |
| 2.  | B2   | 18.55    | 12. | S4   | 0        |

| No. | Kode | Nilai Cq | No. | Kode  | Nilai Cq |
|-----|------|----------|-----|-------|----------|
| 3.  | B3   | 18.57    | 13. | S5    | 0        |
| 4.  | B4   | 18.77    | 14. | S6    | 0        |
| 5.  | B5   | 18.72    | 15. | S7    | 0        |
| 6.  | B6   | 18.74    | 16. | S8    | 0        |
| 7.  | B7   | 19.09    | 17. | K (+) | 20.66    |
| 8.  | B8   | 18.53    | 18. | K (+) | 20.54    |
| 9.  | S1   | 0        | 19. | NTC   | 0        |
| 10. | S2   | 0        | 20. | NTC   | 0        |

**Ket :** B adalah sampel daging babi.  
 S adalah sampel daging sapi.  
 K (+) adalah sampel plasmid pUC57-bopc.  
 NTC adalah *non-template control*

## 5. KESIMPULAN

Deteksi *porcine* berdasarkan dokumen ISO 20224-3:2020 dapat diverifikasi pada berat sampel 200 mg matriks standar gelatin babi. Dalam pengujian ini, batas deteksi metode yang digunakan masih berdasarkan kemampuan pengujian. Untuk pengurangan jumlah sampel dan kegiatan *repeatability* serta pengujian pada sampel pasar dapat dijadikan rekomendasi pengujian selanjutnya, sebagai perbaikan (*improvement*). Kurva amplifikasi *real time* PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan matriks gelatin babi teramplifikasi dengan nilai Cq rata-rata  $34.56 \pm 0.53$ . Sampel daging babi memiliki rata-rata nilai Cq sebesar  $18.79 \pm 0.28$ . Penggunaan gen target *beta actin* mampu mengamplifikasi pada sampel pangan yang sudah diproses berupa serbuk gelatin babi. Korelasi data konsentrasi DNA (*Deoxyribose Nucleic Acid*) matriks standar gelatin babi, daging babi, dan daging sapi dengan data hasil amplifikasi *real time* PCR adalah semakin besar konsentrasi DNA maka semakin kecil nilai Cq, dan sebaliknya semakin kecil konsentrasi DNA maka semakin besar nilai Cq.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktur SNSU Mekanika, Radiasi, dan Biologi-BSN, kepala laboratorium SNSU Biologi-BSN yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan kegiatan penelitian di BSN

## DAFTAR PUSTAKA

- Alipal, J., Pu'Ad, N. M., Lee, T. C., Nayan, N. H. M., Sahari, N., Basri, H., ... & Abdullah, H. Z. (2021). A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*, 42, 240-250. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>
- Al-Nimry, S., Dayah, A. A., Hasan, I., & Daghmash, R. (2021). Cosmetic, biomedical and pharmaceutical applications of fish gelatin/hydrolysates. *Marine drugs*, 19(3), 145. <https://doi.org/10.3390/md19030145>
- Badan Pusat Statistik. (2022). Ekspor dan Impor. <https://www.bps.go.id/exim/>
- Cai, H., Gu, X., Scanlan, M. S., Ramatlapeng, D. H., & Lively, C. R. (2012). Real-time PCR assays for detection and quantitation of porcine and bovine DNA in gelatin mixtures and gelatin capsules. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1), 83-87. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.06.008>
- Cammà, C., Di Domenico, M., & Monaco, F. (2012). Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control*, 23(2), 400-404. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.007>
- Demirhan, Y., Ulca, P., Senyuva, H.Z. (2012). Detection of Porcine DNA in gelatine and gelatin -containing processed food products - Halal/Kosher authentication. *Meat Science*, 90, 686-689. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.014>



- Dewanata, P. A., & Mushlih, M. (2021). Differences in DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15, 10-21070.
- Fadhilurrahman, Wardani, A.K & Widyastuti, E. (2015). Deteksi Gelatin Babi pada Soft Candy menggunakan Metode PCR-RFLP sebagai Salah Satu Pembuktian Kehalalan Pangan. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 16(2),81-88
- Hastuti, D., & Sumpe, I. S. (2007). Pengenalan dan proses pembuatan gelatin. *Mediagro*, 3(1).
- ISO. (2020). ISO/TS 20224-3:2020 Molecular biomarker analysis—Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR — Part 3: Porcine DNA detection method.
- Iwobi, A., Sebah, D., Kraemer, I., Losher, C., Fischer, G., Busch, U., & Huber, I. (2015). A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food chemistry*, 169, 305-313.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.139>
- Kamaliah, K. (2017). Perbandingan metode ekstraksi dna phenol-chloroform dan kit extraction pada Sapi Aceh Dan Sapi Madura. *Biotik: Jurnal Ilmiah Biologi Teknologi dan Kependidikan*, 5(1), 60-65.  
<https://doi.org/10.22373/biotik.v5i1.2975>
- Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 2021 Tentang Penyelenggaraan Bidang Jaminan Produk Halal, (2021).
- Mariod, A. A., & Fadul, H. (2013). Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12(2), 135-147.
- Mohamad, N. A., Mustafa, S., Khairil Mokhtar, N. F., & El Sheikha, A. F. (2018). Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of porcine DNA in gelatin and gelatin capsules. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(12), 4570-4577.  
<https://doi:10.1002/jsfa.8985>
- Narayananaswamy, R., Kanagesan, S., Pandurangan, A., & Padmanabhan, P. (2016). Basics to different imaging techniques, different nanobiomaterials for image enhancement. In *Nanobiomaterials in Medical Imaging* (pp. 101-129). William Andrew Publishing.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-41736-5.00004-2>
- Nikzad, J., Shahhosseini, S., Tabarzad, M., Nafissi-varcheh, N., & Torshabi, M. (2017). Simultaneous detection of bovine and porcine DNA in pharmaceutical gelatin capsules by duplex PCR assay for Halal authentication. 1–11.  
<https://doi.org/10.1186/s40199-017-0171-3>
- Qiagen. (2019, May 25). DNeasy mericon Food Kit. DNeasy Mericon Food Kit For Extraction of High-Quality DNA from Raw or Processed Foods.  
<https://www.qiagen.com/us/products/disco-very-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-mericon-food-kit/>
- Riyanto, P. D. (2014). Validasi & Verifikasi Metode Uji Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi. DEEPUBLISH.
- Shabani, H., Mehdizadeh, M., Mousavi, S. M., Dezfouli, E. A., Solgi, T., Khodaverdi, M., ... & Alebouyeh, M. (2015). Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. *Food chemistry*, 184, 203-206.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.140>
- Sudjadi, Wardani, H. S., Sepminarti, T., & Rohman, A. (2016). Analysis of porcine Gelatin DNA in a commercial capsule shell using real-time polymerase chain reaction for halal authentication. *International Journal of Food Properties*, 19(9), 2127-2134.  
<https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1110164>
- Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., & Akiyama, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(12), 3131-3135.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.70683>
- Ulca, P., Balta, H., Çağın, İ., & Senyuva, H. Z. (2013). Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. *Meat Science*, 94(3), 280-284.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.03.008>

