

**DETEKSI KONTAMINAN DNA BABI PADA SAMPEL PENGGILINGAN
DAGING DI PASAR SURYA KOTA SURABAYA MENGGUNAKAN
*REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION***

SKRIPSI



**UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A**

Disusun Oleh:

**TRI SUSILOWATI
NIM: H71215034**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL**

**SURABAYA
2019**

**DETEKSI KONTAMINAN DNA BABI PADA SAMPEL PENGGILINGAN
DAGING DI PASAR SURYA KOTA SURABAYA MENGGUNAKAN
*REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION***

SKRIPSI

**Diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar
sarjana sains (S.Si.) pada program studi Biologi**



**UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A**

Disusun Oleh:

**TRI SUSILOWATI
NIM: H71215034**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL**

**SURABAYA
2019**

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Tri Susilowati
Nim : H71215034
Program Studi : Biologi
Angkatan : 2015

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: **“DETEKSI KONTAMINAN DNA BABI PADA SAMPEL PENGGILINGAN DAGING DI PASAR SURYA KOTA SURABAYA MENGGUNAKAN *REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION*”**. Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 20 Juni 2019

Yang menyatakan



(Tri Susilowati)

NIM. H71215034

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi oleh:

Nama : Tri Susilowati
NIM : H71215034
Judul : DETEKSI KONTAMINAN DNA BABI PADA SAMPEL
PENGGILINGAN DAGING DI PASAR SURYA KOTA SURABAYA
MENGUNAKAN *REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION*

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 20 Juni 2019

Dosen Pembimbing I



(Yuanita Rachmawati, M.Sc.)
NIP. 198808192019032009

Dosen Pembimbing II



(Saiku Rokhim, M.KKK.)
NIP. 198612212014031001

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Tri Susilowati ini telah dipertahankan di depan tim penguji skripsi di
Surabaya, 24 Juni 2019

Mengesahkan,
Dewan Penguji

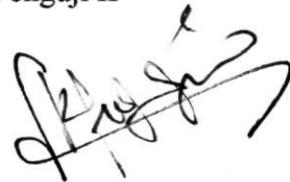
Penguji I



(Yuanita Rachmawati, M.Sc.)

NIP. 198808192019032009

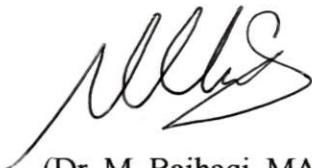
Penguji II



(Saiku Rokhim, M.KKK.)

NIP. 198612212014031001

Penguji III



(Dr. M. Baihaqi, MA, Ph.D.)

NIP. 197402202003121004

Penguji IV



(Esti Novi Andyarini, M.Kes.)

NIP. 198411172014032003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Ampel Surabaya



Dr. Eni Purwati, M.Ag.
NIP. 196512211990022001



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : TRI SUSILOWATI
NIM : H71215034
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI/BIOLOGI
E-mail address : trisusilowati232@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Skripsi Tesis Desertasi Lain-lain (.....)
yang berjudul :

DETEKSI KONTAMINAN DNA BABI PADA SAMPEL PEGGILINGAN

DAGING DI PASAR SURYA KOTA SURABAYA MENGGUNAKAN REAL TIME

POLYMERASE CHAIN REACTION

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/formatkan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara **fulltext** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 19 Juli 2019

Penulis



(TRI SUSILOWATI)

babi yang sering bocor, sehingga urin babi merembes ke dalam dagingnya. (Hilda, 2013).

Selain tertera di dalam Al-Quran, terdapat hadist nabi yang menjelaskan tentang haramnya babi. Berikut adalah hadits nabi yang diriwayatkan oleh Abu Daud yang artinya “*Dari Abu Hurairah bahwasanya Rosulullah shallallahu ‘alaihi wasallam bersabda: “Sesungguhnya Allah telah mengharamkan khamr dan hasil penjualannya dan mengharamkan bangkai dan hasil penjualannya dan mengharamkan babi dan hasil penjualannya.”* (HR. Abu Daud No. 3488 dan Ahmad 1/247. Ibnu Hazm menyatakan bahwa hukum ini merupakan *ijma’* dalam kitab *Al Muhalla* 7/390-430.

Ajaran Islam menjelaskan bahwa makanan harus bersih dan bebas dari unsur produk babi. Sedikit apapun kandungan lemak atau daging babi yang terdapat di dalam makanan, akan menyebabkan makanan menjadi haram karena telah terkontaminasi dengan sesuatu yang tidak halal. Saat ini, usaha makanan dengan produk olahan berbahan dasar daging tersebar luas di Indonesia, salah satunya adalah Kota Surabaya. Pengusaha makanan seperti pedagang bakso keliling dan warung-warung makanan dengan skala menengah ke bawah masih belum sadar akan pentingnya sertifikasi halal. Hal ini didasarkan pada banyaknya penjual makanan yang menggunakan bahan dasar daging namun belum memiliki label halal. Sertifikasi halal sendiri digunakan untuk menjamin kehalalan suatu produk makanan. Karena masyarakat berhak tau produk yang akan dibeli. Sertifikasi halal masih menjadi hal yang kurang diperhatikan karena kurangnya pengawasan dari pemerintah terhadap produsen-produsen yang memiliki usaha baik di bidang pengolahan maupun di bidang pengadaan bahan/pangan (Hilda, 2013).

Suatu produk olahan yang berlabel halal harus diuji mulai dari bahan hingga proses pengolahan daging seperti tempat penggilingan. Para pelaku usaha yang belum memiliki penggilingan daging, akan menggunakan jasa penggilingan daging di pasar-pasar atau tempat yang menyediakan jasa penggilingan daging seperti di Pasar Surya Surabaya Kota Surabaya. Pasar Surya Kota Surabaya sendiri masih belum memiliki aturan yang jelas mengenai sertifikasi halal untuk penggilingan daging. Hal ini dikhawatirkan bahwa jasa penggilingan daging yang

terdapat di Pasar tersebut menerima konsumen yang menggilingkan daging non halal.

Sertifikasi halal untuk pengusaha makanan dan prosesnya seperti penggilingan daging yang tersebar di PDPS Kota Surabaya ini perlu diatur, sehingga kedepannya pemerintah dapat menerbitkan regulasi, khususnya tentang penggilingan daging yang tersertifikasi halal. Berdasarkan Pasal 23 Undang-Undang Nomor 33 Tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal yang menyebutkan bahwa, pelaku usaha berhak memperoleh informasi, edukasi, dan sosialisasi mengenai sistem Jaminan Produk Halal (JPH) serta memperoleh pembinaan dalam memproduksi produk halal. Aturan mengenai pelaku usaha di atas sejalan dengan hak yang dimiliki oleh konsumen yang tertera dalam pasal 4 Undang-Undang Perlindungan Konsumen (UUPK) No. 8 Tahun 1999 yang menyatakan bahwa konsumen berhak menerima atas kenyamanan, keamanan, dan keselamatan dalam mengkonsumsi barang dan/atau jasa; hak untuk memilih barang dan/atau jasa serta mendapatkan barang dan/atau jasa tersebut sesuai dengan nilai tukar dan kondisi serta jaminan yang dijanjikan; serta hak atas informasi yang benar, jelas, dan jujur mengenai kondisi dan jaminan barang dan/atau jasa. Faktanya, selama kegiatan produksi, proses yang dilakukan oleh pelaku usaha tidak dapat sepenuhnya dikendalikan. Khususnya yang banyak terjadi pada pelaku usaha makanan. Oleh karena itu, campuran daging halal dengan daging non halal ini merupakan isu yang penting untuk dapat membantu memberikan informasi dan mengontrol makanan agar memiliki kejelasan mengenai halal dan haramnya suatu produk makanan.

Teknologi deteksi yang saat ini banyak digunakan dan menawarkan hasil cepat terus dikembangkan, salah satunya adalah metode berbasis DNA dengan menggunakan *Real Time* PCR. Alat ini lebih canggih dibandingkan dengan alat PCR lainnya karena mampu mendapatkan hasil yang cepat dan efisien (Yanti, 2017). *Real Time* PCR memiliki keunggulan untuk memonitor progres reaksi PCR pada waktu yang sama dan dapat mengetahui jumlah produk PCR yang diekspresikan. PCR biasa memiliki tahap yang lebih panjang, salah satunya dengan memerlukan gel elektroforesis untuk deteksi produk amplifikasi PCR pada fase akhir (Rachmawati, 2014).

Lanjutan Tabel 2.1.

No.	Nama Pasar	Alamat
38.	Banjar Sugihan	Jl. Banjar Sugihan
39.	Sukodono	Jl. Sukodono
40.	Ampel	Jl. Ampel
41.	Bangkingan	Jl. Bangkingan
42.	Bendul Merisi	Jl. Bendul Merisi
43.	Wonokromo Lama	Jl. Wonokromo
44.	Gayungsari	Jl. Gayungan
45.	Blauran Baru	Jl. Kranggan
46.	Dukuh Kupang	Jl. Dukuh Kupang Barat
47.	Genteng Baru	Jl. Genteng Besar 62
48.	Karang Pilang	Jl. Raya Mastrip
49.	Lakarsantri	Jl. Lakar Santri
50.	Hewan Karang Pilang	Jl. Kolong Marinir
51.	Kedungsari	Jl. Kedungsari
52.	Keputran Utara	Jl. Keputran 12
53.	Keputran Selatan	Jl. Keputran/Dinoyo
54.	Dinoyo Tangsi	Jl. Dinoyo Gg Tangsi
55.	Kupang	Jl. Pasar Kembang 131
56.	Kupang Gunung	Jl. Putat
57.	Krukah	Jl. Krukah Selatan
58.	Bunga Kayoon	Jl. Kayoon
59.	Pakis	Jl. Raya Dr. Soetomo
60.	Kalianyar	Jl. Pecindilan
61.	Jagalan	Jl. Jagalan Gg. Pasar
62.	Gembong Tebasan	Jl. Gembong Tebasan
63.	Tidar	Jl. Tidar
64.	Kedungdoro	Jl. Kedungdoro
65.	Darurat Wonokromo	Jl. Stasiun Wonokromo
66.	Wonokitri	Jl. Brawijaya 46
67.	Tunjungan	Jl. Embong Malang
68.	Panjang Jiwo	Jl. Raya Rungkut
69.	Kertopaten	Jl. Kertopaten
70.	Indrakila Darurat	Jl. Indrakila
71.	Pesapen Cikar	Jl. Pesapen Cikar
72.	Kebalen Barat	Jl. Kebalen Barat
73.	Jl. Dukuh	Jl. Dukuh Gili
74.	Bangkingan	Jl. Bangkingan
75.	Pandegiling	Jl. Pandegiling
76.	Simo Gunung	Jl. Banyu Urip
77.	DRT. Gemb. Tebasan	Jl. Gembong Tebasan
78.	Dukuh Kupang Barat	Jl. Dukuh Kupang Barat
79.	Rungkut Baru	Jl. Rungkut Alang-Alang
80.	Paing	Jl. Zamhuri
81.	Sikatan	Jl. Manukan Madya
82.	Pecindian	Jl. Pecindilan
83.	Sidotopo	Jl. Sidotopo Wetan
84.	Pecindilan	Jl. Pecindilan
85.	Kembang	Jl. Pasar Kembang

Sumber: (Perda, 2008).

Jumlah pasar (Tabel 2.1) tersebut tersebar di 17 kecamatan dan terbagi atas wilayah Selatan, Barat, Utara, dan Timur Kota Surabaya.

2.2.2 Penggilingan Daging

Penggilingan daging merupakan sarana yang digunakan oleh konsumen atau masyarakat pada umumnya untuk menggiling daging. Kebanyakan dari konsumen yang menggunakan jasa ini adalah mereka yang biasanya memiliki usaha kecil dan menggunakan daging sebagai bahan dasarnya.

Menurut Saputra (2017), pelayanan jasa penggilingan daging ini dinilai baik oleh konsumen. Penggilingan daging menjadi semakin berkembang seiring dengan besarnya kesadaran konsumen akan pentingnya sumber protein hewani. Protein hewani sendiri sangat baik untuk kecerdasan otak dan daya ingat. Selain itu, hal-hal yang perlu diperhatikan dalam mengembangkan usaha penggilingan daging ini adalah proses yang dilakukan dalam penggilingan daging, ketersediaan sumber daya manusia (SDM), dan peralatan yang menunjang. Penggilingan daging di PDPS Kota Surabaya sendiri masih belum memiliki aturan yang jelas terkait dengan pemisahan penggilingan daging halal dan non-halal. Salah satu contohnya adalah penggilingan khusus babi.

2.3. Sertifikasi Halal

Sertifikasi halal merupakan pengakuan kehalalan suatu produk yang dikeluarkan oleh Badan Penyelenggara Jaminan Produk Halal (BPJPH) berdasarkan fatwa tertulis yang dikeluarkan oleh Majelis Ulama Indonesia (MUI) (Adam, 2017). Regulasi mengenai sertifikasi halal diatur dalam UU Nomor 33 Tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal (JPH). UU ini merupakan peraturan yang paling konkrit dan komprehensif mengenai sertifikasi halal dan merupakan era baru dalam penanganan sertifikasi halal di Indonesia. UU Nomor 33 Tahun 2014 memiliki ketentuan antara lain yang terdapat dalam pasal 4 yang menyatakan bahwa produk yang masuk, beredar, dan diperdagangkan di Indonesia wajib memiliki sertifikat halal. BPJPH sendiri memiliki wewenang untuk merumuskan dan menetapkan kebijakan JPH (Aminuddin, 2016). Pada tahun 2019, sertifikasi halal ini akan dilaksanakan oleh BPJPH, Lembaga Pemeriksa Halal (LPH), dan MUI untuk fatwa halal (Sukoso, 2018).

2.4. Pengujian Daging Babi

2.4.1 Non Molekular

a. Morfologis

Pengujian morfologis dapat dilakukan melalui pengamatan secara fenotipik yang bersifat poligenik dan ekspresinya dipengaruhi oleh lingkungan. Penentuan menggunakan cara konvensional ini membutuhkan waktu yang lama dan tidak akurat/spesifik karena terbatas dan tidak konsisten (Zulfahmi, 2013). Proses pengamatan dilakukan dengan melihat sifat organoleptik dari daging babi itu sendiri menggunakan indra penglihatan terhadap penampilan fisik otot dan lemak. Kemudian dilakukan penentuan alat standar mutu sesuai SNI. Parameter yang diamati meliputi warna daging dan lemak serta tekstur otot. Daging babi memiliki warna merah hati cerah, teksturnya kenyal, berserat, memiliki lapisan lemak, dan berbau amis darah.

b. Biokimia

Pengujian secara biokimia dapat dilihat dengan mempelajari biomolekul (senyawa kimia) serta rangkaian reaksinya yang mencakup protein, karbohidrat, lemak, dan asam nukleat seperti DNA dan RNA (Dewi, 2013). Adanya komponen maupun kandungan babi dalam produk olahan makanan dapat diidentifikasi dengan berbagai macam metode, seperti pengujian lemak, karbohidrat, protein, maupun DNA. Pengujian yang selama ini dikembangkan melalui identifikasi protein meliputi *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) seperti penelitian yang dilakukan oleh Widyaninggar, *et al.*, (2012), yang membahas tentang perbedaan komposisi asam amino dalam yang terdapat pada gelatin babi dan sapi. Selain HPLC, uji keberadaan daging babi dapat dilihat dari adanya lemak melalui uji *Gas Chromatography* (GC). Berbagai macam identifikasi secara kimiawi ini masih memiliki banyak kekurangan, salah satunya adalah dibutuhkan jumlah sampel yang relatif banyak dan teknik tersebut masih

Pemisahan DNA dari komponen sel maupun kontaminan yang tidak diinginkan dapat dilakukan dengan sentrifugasi. Polisakarida merupakan kontaminan yang dapat mengganggu proses PCR yang akan dilakukan. Proses selanjutnya adalah presipitasi DNA dengan isopropanol. Semua bahan selain DNA akan larut bersama isopropanol atau etanol dingin, oleh karena itu, DNA akan mengendap dan terpisah dengan senyawa-senyawa lain ketika disentrifugasi.

3) Uji Kuantitatif DNA

Uji Kuantitatif DNA dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang tersedia dan merupakan salah satu teknologi nano. DNA yang telah diekstraksi kemudian dilakukan uji untuk melihat kemurniannya. DNA yang murni akan menyerap cahaya ultraviolet pada saat panjang gelombang mencapai 260 nm, hal ini terjadi karena DNA murni terdapat basa purin dan pirimidin, sedangkan kontaminan akan menyerap dengan panjang gelombang 280 nm. Oleh karena itu, untuk mengukur kemurnian DNA dapat dihitung dengan nilai absorbansi 260 nm dan kemudian dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm ($\frac{A_{260}}{A_{280}}$), sehingga didapatkan hasil nilai dari kemurnian DNA tersebut berkisar antara 1,8-2,0 (Yanti, 2017).

b. Konvensional PCR

Aflanie (2017) mengungkapkan bahwa, PCR merupakan suatu metode untuk memperbanyak fragmen DNA tertentu secara *in vitro* dengan menggunakan enzim polimerase DNA. Ditemukannya metode PCR sangat membantu mengungkap sesuatu yang jumlahnya sangat minim dan terbatas, PCR ini memiliki kemampuan untuk memperbanyak DNA jutaan sampai milyaran kali, memungkinkan dianalisisnya sampel yang sangat minim sekalipun. PCR ini dikenalkan oleh Kary B. Mullis pada tahun 1985.

Reaksi amplifikasi melalui metode PCR mampu mengubah molekul kecil asam nukleat menjadi sangat banyak dalam waktu yang

relatif singkat dengan tiga tahapan dalam metode PCR. Tiga tahapan ini akan diulang berdasarkan siklus yang ditentukan yang bertujuan untuk memperbanyak dengan pengaturan suhu yang berbeda (Novianasari, 2018).

Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) mampu menggandakan DNA dengan bantuan *Taq DNA polymerase*, yang tahan suhu tinggi dan sepasang primer oligonukleotida yang komplementer dengan ujung 3' dari salah satu untai DNA target. PCR memiliki prinsip kerja yaitu reaksi enzimatik dari proses polimerisasi DNA untuk memperbanyak bagian spesifik DNA yang kemudian diinisiasi dengan pelekatan primer. Proses PCR merupakan suatu siklus berulang yang meliputi denaturasi, annealing, dan ekstensi oleh enzim DNA polimerase. Sepasang primer oligonukleotida spesifik digunakan untuk membuat hibrid dengan ujung 5' menuju 3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan (Yanti, 2017).

PCR memiliki beberapa tahap dalam satu siklus, yang pertama adalah denaturasi. Denaturasi merupakan tahap yang sangat kritis selama proses PCR berlangsung dan merupakan tahap awal untuk merusak untai ganda DNA. Suhu yang tinggi diawal proses PCR akan menyebabkan untai ganda terpisah, sehingga DNA akan menjadi dua untai tunggal. Suhu yang digunakan pada tahap denaturasi ini yakni 92-95°C dengan waktu 30-60 detik. Tahap kedua adalah *annealing* yang merupakan proses dimana terjadi pengenalan dan penempelan primer cetakan DNA. Pada tahap ini, suhu ditentukan oleh susunan primer. Keoptimalan suhu pada tahap *annealing* akan dimulai dengan cara menghitung *melting temperature* (T_m) menggunakan rumus $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ dari ikatan primer dan cetakan DNA, untuk suhu annealing (T_A) yaitu 5°C yang lebih kecil dari T_m primer yang sebenarnya. Suhu *annealing* yang kurang dari 37°C akan menyebabkan amplifikasi menjadi efisien dan tidak terjadi *mispriming*. Pada suhu 55 °C akan dihasilkan produk amplifikasi

2) RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

PCR-RFLP merupakan amplifikasi suatu fragmen DNA tertentu menggunakan primer spesifik/universal untuk menghasilkan fragmen yang diinginkan (Erwanto, 2012). RFLP memanfaatkan enzim restriksi yang akan membedakan antara DNA babi dengan DNA homolog babi berdasarkan sisi restriksi dari enzim yang digunakan. Tujuan dari penggunaan enzim restriksi ini adalah untuk memotong hasil amplifikasi PCR sehingga sekuen yang dihasilkan spesifik (Fadlurrahman, 2015). Penelitian sejenis mengenai deteksi kontaminan DNA babi menggunakan PCR-RFLP telah banyak dilakukan, salah satunya adalah Erwanto (2012) dengan judul *identification of pork contamination in meatballs of Indonesia local market using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis*.

3) *Duplex* PCR

Deteksi spesies dalam daging berdasarkan asam deoksiribonukleat (DNA) menggunakan PCR telah berhasil dilakukan untuk mengidentifikasi DNA yang berasal dari daging segar maupun daging olahan. Salah satu contoh kongkrit dari analisis *duplex* PCR yang telah dilakukan adalah deteksi cemaran daging babi pada daging ayam segar yang dilakukan oleh Hartanto *et al.*, (2017). *Duplex* PCR merupakan variasi pendekatan PCR yang menggunakan teknik molekular yang terdiri dari dua lokus sekaligus secara bersamaan dalam satu reaksi (Ni'mah *et al.*, 2016).

4) *Multiplex* PCR

Deteksi berbagai macam spesies daging seperti babi, kucing, anjing, dan tikus menggunakan *multiplex* PCR sudah banyak dikembangkan. Salah satunya adalah penelitian yang dilakukan oleh Ali (2015) tentang deteksi daging haram dalam makanan halal. Selain itu, Almira (2011) telah mengembangkan *Multiplex* PCR dengan melakukan penelitian tentang deteksi kontaminan tikus dalam produk daging di pasaran. *Multiplex* PCR merupakan salah satu metode

Real Time PCR memiliki prinsip kerja yaitu mendeteksi serta kuantifikasi reporter fluoresen. Seiring dengan bertambahnya produk PCR dalam reaksi, maka sinyal fluoresen akan meningkat. Peningkatan yang signifikan pada saat fase eksponensial akan berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Reaksi pada saat fase eksponensial, dapat dipantau dengan mencatat jumlah emisi fluoresen dari tiap siklus. Tingkat ekspresi gen akan berpengaruh terhadap emisi fluoresen, yaitu semakin tingginya tingkat ekspresi gen, akan menyebabkan deteksi dari emisi fluoresen cepat terjadi.

Real Time PCR menghilangkan kebutuhan pemrosesan pasca-PCR seperti pembacaan menggunakan *geldoc* yang memerlukan pengerjaan kembali dan membutuhkan waktu yang lama untuk *running*. *Real Time* PCR mampu meminimalkan waktu yang diperlukan untuk mendapatkan hasil yang maksimal, dan mencegah kontaminasi laboratorium dari penanganan ampikon. Namun, sensitivitas *Real Time* PCR membuat tes ini lebih sensitif terhadap inhibitor PCR itu tidak dapat dipisahkan dengan langkah ekstraksi asam nukleat dan membutuhkan validasi prosedur ekstraksi yang hati-hati sebagai serangkaian uji pada *Real Time* PCR.

Perbedaan utama antara *Real Time* PCR dengan PCR konvensional adalah, PCR konvensional biasanya bersifat kualitatif, dan hanya menghasilkan hasil positif dan negatif. Sedangkan *Real Time* PCR menambahkan potensi untuk analisis kuantitatif. Saat amplifikasi berlangsung selama beberapa siklus, fluoresensi yang dihasilkan oleh pewarna atau *probe* meningkat sampai fluoresensi ini naik secara signifikan di atas *baseline*. Hal ini dicatat sebagai siklus *threshold* atau *Cycle Threshold* (CT); semakin besar kuantitas awal DNA target, maka akan menurunkan nilai CT. Prinsip ini merupakan dasar untuk analisis *Real Time* PCR secara kuantitatif (Loftis, 2012).

Real Time PCR memiliki kurva amplifikasi yang terdiri dari tiga fase. Fase yang pertama merupakan inisiasi. Fase inisiasi terjadi selama siklus PCR yang pertama kali ketika pancaran fluoresens tidak dapat dibedakan dari *baseline*. Sedangkan selama fase log/eksponensial akan

terjadi peningkatan secara eksponensial dari fluoresensi, sebelum fase plateu tercapai. Pada fase terakhir, reagen berhenti bereaksi, dan sudah tidak ada peningkatan fluoresensi yang teramati. Sehingga Fase eksponensial akan sangat memungkinkan untuk dilakukan kuantifikasi (Lazaro & Hernandez, 2013). Penggunaan *Real Time* PCR terdapat dua komponen bahan kimia untuk mendeteksi sampel yang umum digunakan, antara lain sebagai berikut:

1) Pewarna fluoresensi non-spesifik

Pewarna fluoresensi non-spesifik berinterkalasi dengan *double stranded* DNA, untuk contoh pewarna pada metode yang menggunakan pewarna fluoresensi non-spesifik ini adalah *SYBR Green Dye*. Pewarna DNA ini digunakan sebagai reporter fluoresensi untuk memonitor reaksi *Real Time* PCR. Penghitungan secara kuantitatif dilihat dari pancaran fluoresensi setiap siklus PCR. Grafik yang digambarkan antara log jumlah awal template dan hubungan peningkatan fluoresensi reporter selama proses *Real Time* PCR akan didapatkan suatu garis hubungan yang menunjukkan kuantitas gen yang diekspresikan (Rachmawati, 2014).

2) Probe *sequence-specific*

Metode pewarna probe *sequence-specific* DNA yang terdiri atas oligonukleotida yang dilabeli dengan *reporter* fluoresensi yang dapat mendeteksi hanya setelah hibridisasi probe dengan *sequence* yang sesuai/komplementer, contohnya adalah *TaqMan Probe*. Probe dilabeli dengan dua molekul yakni *reporter* pada ujung 5' probe sebagai pewarna fluoresensi dan *quencher* pada ujung 3' probe sebagai molekul penerima sinyal fluoresensi. Metode ini memiliki tingkat spesifitas yang tinggi (Pelosi *et al.*, 2013).

probe *sequence-specific/Hydrolysis Probe* memiliki prinsip kerja yakni pada saat probe belum berkomplementasi dengan DNA yang akan diamplifikasi, molekul *reporter* mengeksitasi sinyal fluoresensi ke molekul *quencher* dikarenakan jarak antara kedua molekul berdekatan. Probe ini akan komplemen dengan DNA target

umumnya. Tahap yang dilakukan adalah dengan mengeluarkan DNA dari mitokondria atau nukleus dengan cara melisiskan DNA dari kontaminan yang lain. Isolasi DNA pada sampel penggilingan dimulai dengan diberi *aqua bidest* (ddH₂O) yang berfungsi agar endapan DNA yang dihasilkan mendapatkan konsentrasi yang tinggi. Selanjutnya divortex hingga homogen, kemudian dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan DNA dari presipitat protein. Sentrifugasi memiliki prinsip yang didasarkan pada fenomena bahwa partikel yang tersuspensi di dalam wadah akan mengendap ke dasar suatu wadah karena adanya pengaruh dari gravitasi. Setelah proses sentrifugasi selesai, langkah selanjutnya adalah menambahkan 200 µl supernatan ke dalam *tube* baru dan ditambahkan 200 µl kit *Instagene matrix* yang kemudian diinkubasi pada suhu 58°C selama 15 menit dan pada suhu 100°C selama 8 menit untuk optimalisasi presipitasi dan untuk mendapatkan konsentrasi yang diharapkan. Suhu inkubasi yang terlalu tinggi akan mengakibatkan DNA menjadi rusak, sedangkan suhu yang rendah akan mengakibatkan membran serta jaringan sel tidak dapat hancur (Yanti, 2017).

Isolasi DNA yang baik didukung dengan hasil kualitas (kemurnian) dan kuantitas (konsentrasi) dari ekstrak DNA yang didapatkan. Selain itu, metode yang digunakan saat isolasi DNA sangat berperan penting dalam menghasilkan kemurnian DNA. Sehingga DNA yang didapatkan terbebas dari protein maupun oligopeptida. Konsentrasi dan kemurnian DNA dianalisis menggunakan spektrofotometer UV/VIS DNA (Bio-drop). Pengukurannya didasarkan pada penyinaran sinar UV (ultra violet) yang dapat diserap oleh protein serta nukleotida dalam suatu larutan (Harisah, 2017).

Uji kuantitatif DNA ini dapat menyerap cahaya UV karena keberadaan basa purin dan pirimidin. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada panjang gelombang (λ) 260 nm, sedangkan protein dan fenol menyerap cahaya pada λ 280 nm. Sehingga kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi λ 260 dibagi dengan nilai absorbansi λ 280 nm ($\frac{A_{260}}{A_{280}}$) dan kemurnian berkisar antara 1,8-2,0 (Fachtayah *et al.*, 2011).

Kemurnian dan konsentrasi DNA sangat sensitif untuk proses amplifikasi karena akan berpengaruh terhadap sensitivitas pengujian *Real Time PCR* (Pratama, 2015). Sampel DNA yang tidak murni atau memiliki kemurnian yang rendah menunjukkan adanya kontaminasi yang membuat uji amplifikasi tidak spesifik. Hal ini dapat terjadi karena proses ekstraksi yang tidak sempurna (Rasyid, 2015). Hasil instrumentasi yang didapatkan dari spektrofotometri memunculkan data berupa konsentrasi DNA dalam $\mu\text{g/ml}$ serta data kemurnian DNA dengan perbandingan rasio $\text{\AA}260/\text{\AA}280$. Berikut merupakan hasil yang diperoleh dari pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dengan spektrofotometri UV/VIS DNA.

Tabel 4.1 Hasil Kemurnian dan Konsentrasi Isolat DNA

Wilayah	Kode Sampel	Panjang Gelombang (nm)				Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Kemurnian ($\text{\AA}260/\text{\AA}280$)	Absorbansi ($\text{\AA}260/\text{\AA}230$)
		$\text{\AA}230$	$\text{\AA}260$	$\text{\AA}280$	$\text{\AA}320$			
Surabaya Timur	S10/1	1,495	0,855	0,455	0,152	35,14	2,321	0,532
	S10/4	1,143	0,687	0,345	0,084	30,13	2,312	0,569
	S14/2	1,216	0,592	0,298	0,049	27,15	2,181	0,465
	S15/4	1,608	0,709	0,270	0,044	37,25	3,296	0,476
	S58/1	1,555	0,991	0,472	0,134	42,86	2,259	0,476
	S58/2	1,039	0,546	0,243	0,040	25,30	2,492	0,507
	S82/1	1,154	0,565	0,321	0,063	25,12	1,944	0,460
	S82/2	1,818	0,996	0,595	0,168	41,41	1,939	0,502
	S43	0,981	0,673	0,388	0,089	29,19	1,954	0,655
	S46	0,790	0,673	0,388	0,089	17,58	2,260	0,496
Surabaya Selatan	S56	1,036	0,737	0,400	0,085	32,60	2,070	0,686
	S57	0,429	0,249	0,134	0,031	10,90	2,117	0,548
	S60	0,581	0,268	0,136	0,035	11,65	2,308	0,427
	S67	1,182	0,692	0,320	0,106	29,31	2,736	0,545
	S68	1,131	0,610	0,296	0,100	25,52	2,598	0,495
	S86	0,777	0,394	0,168	0,027	18,34	2,606	0,489
	S87/1	0,736	0,394	0,168	0,027	19,57	2,655	0,563
	S87/2	0,685	0,389	0,163	0,037	17,59	2,796	0,543
	S87/3	0,776	0,529	0,207	0,038	24,57	2,900	0,666
	S87/4	0,902	0,560	0,244	0,038	26,11	2,532	0,604
Surabaya Utara	S18	0,149	0,076	0,049	0,019	2,828	1,913	0,437
	S21	1,573	0,912	0,465	0,142	38,49	2,385	0,538
	S23	0,798	0,400	0,261	0,132	13,79	1,141	0,414
	S25	0,705	0,302	0,189	0,080	11,11	2,036	0,355
	S26/1	1,014	0,567	0,280	0,058	25,46	2,291	0,533
	S26/2	1,004	0,490	0,216	0,040	22,51	2,555	0,467
Surabaya Barat	S28/1	1,050	0,510	0,277	0,054	22,78	2,047	0,458
	S28/2	1,126	0,634	0,276	0,049	29,25	2,577	0,543
	S28/3	0,674	0,352	0,137	0,018	16,68	2,813	0,509
	S29	1,061	0,625	0,242	0,047	28,89	2,966	0,575

Berdasarkan hasil uji kuantitatif menggunakan spektrofotometri UV/VIS DNA didapatkan rasio kemurnian DNA dengan nilai berkisar antara 1,141 hingga 3,296 (Tabel 4.1). Data tersebut cukup bervariasi untuk kemudian dilakukan tahap dengan *Real Time* PCR. Rasio yang menunjukkan nilai antara 1,8-2,0 pada perbandingan $\lambda 260/280$ dapat diterima sebagai DNA murni. Data dengan nilai dibawah 1,8 (kode sampel 23) dengan nilai 1,141 masih dapat dilanjutkan dengan proses selanjutnya menggunakan *Real Time* PCR. Berdasarkan Priyanka (2017), kemurnian DNA diatas 1,0 masih bisa diterima. Nilai pada panjang gelombang $\lambda 280$ menandakan adanya kontaminan DNA. Sedangkan nilai $\lambda 260$ menyatakan nilai DNA yang diserap oleh panjang gelombang $\lambda 260$ nm. Sehingga tinggi rendahnya nilai $\lambda 260$ ini akan sangat berpengaruh terhadap nilai konsentrasi dan juga kemurnian DNA. Nilai konsentrasi DNA yang tinggi bukan berarti kemurnian yang diperoleh juga tinggi. Hal ini didasarkan bahwa nilai kemurnian DNA dipengaruhi oleh nilai $\lambda 280$ atau nilai kontaminan (Iqbal, 2016). Selain dalam bentuk tabel di atas, terdapat diagram hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian yang dapat diamati pada gambar 4.1 dan 4.2.

Berdasarkan diagram hasil pengukuran konsentrasi DNA (Gambar 4.1) dan diagram hasil pengukuran kemurnian DNA (4.2) menunjukkan bahwa nilai konsentrasi tertinggi ditunjukkan pada kode sampel 58/1 dengan nilai 42,86 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan konsentrasi terendah pada kode sampel 18 sebesar 2,828 $\mu\text{g/ml}$. Semua konsentrasi DNA yang diperoleh dikatakan memenuhi syarat untuk dilakukan uji menggunakan *Real Time* PCR. Hal ini berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Harisah (2017), yang menyatakan bahwa DNA dengan konsentrasi 0,5 sampai dengan 6,5 $\mu\text{g/mL}$ dikatakan sebagai DNA yang baik dan cukup untuk uji selanjutnya. Konsentrasi yang didapatkan dari analisis isolat DNA dengan spektrofotometri UV/VIS DNA memiliki nilai dengan rata-rata tinggi yakni 23,67. Hal ini karena sampel yang digunakan adalah sampel penggilingan daging. Menurut Zilhadia (2017), daging memiliki jumlah sel yang banyak sehingga konsentrasi DNA yang dihasilkan tinggi.

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA sangat penting dilakukan agar sampel yang telah diekstraksi dapat diketahui derajat kontaminasinya. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Mustafa *et al.*, (2016) terkait tentang Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk *Anopheles barbirostris*. Penelitian tersebut menyatakan bahwa untuk dapat dilakukan proses selanjutnya dengan qPCR, pengukuran kuantitas baik konsentrasi maupun kualitas DNA harus diketahui. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Sholihah (2014) menyatakan bahwa pengukuran menggunakan spektrofotometri akan menghasilkan data secara kuantitatif dengan melihat kemurnian dan konsentrasi DNA yang dapat ditentukan dengan menghitung rasio pada panjang gelombang (λ) 260 nm dan 280 nm pada sampel DNA. DNA dapat menyerap cahaya maksimal pada panjang gelombang 260 nm, nilai 260 nm tersebut dapat dijadikan sebagai perkiraan untuk konsentrasi DNA. Sedangkan untuk panjang gelombang 280 nm merupakan nilai maksimal dari residu protein dapat menyerap cahaya.

Proses isolasi DNA yang tidak sempurna akan berpengaruh terhadap kemurnian DNA. Pada rasio $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ dengan nilai lebih rendah dari 1,8

akan mengindikasikan adanya kontaminasi dari fenol, sedangkan pada nilai absorbansi $\lambda 230$ nm menunjukkan kontaminasi yang berasal dari ikatan peptida. Kontaminasi oleh protein berasal dari komponen sel yang tidak lisis selama proses pengerjaan ekstraksi DNA (Pratama, 2015). Jika nilai rasio yang diperoleh pada $\lambda 260/280$ melebihi angka 2,0 maka DNA yang digunakan masih mengandung kontaminan dari protein membran dan adanya kontaminasi senyawa berat dengan molekul kecil seperti RNA atau senyawa lain sehingga DNA yang diperoleh belum murni (Fachtiyah *et al.*, 2011).

4.3. Amplifikasi DNA dengan *Real Time PCR*

Hasil ekstraksi DNA yang diperoleh kemudian digunakan sebagai *template* untuk tahap selanjutnya yakni amplifikasi menggunakan *Real Time PCR* (qPCR). Sebelum proses qPCR berlangsung, perlu dilakukan pengenceran DNA terlebih dahulu untuk meminimalkan adanya kontaminasi seperti fenol, protein, dan sisa-sisa bahan pada saat ekstraksi berlangsung. Selain untuk meminimalisir adanya kontaminasi, pengenceran DNA berfungsi untuk menentukan volume akhir dari DNA (Sholihah, 2014). Pengenceran DNA dilakukan agar konsentrasi DNA yang diperoleh tidak terlalu tinggi sehingga kurva amplifikasi yang dihasilkan menjadi optimal. Hal ini karena kurva amplifikasi dianggap optimal jika kurva tersebut tidak terlalu cepat mencapai fase plateu diawal siklus (Zilhadia, 2017).

Hasil pengukuran konsentrasi DNA dengan menggunakan spektrofotometri UV/VIS DNA menunjukkan hasil yang berbeda pada tiap sampel, sehingga tidak ada standar dalam menentukan konsentrasi DNA. Pratama (2015) menyatakan bahwa, DNA dengan konsentrasi 10 ng/ μ L sampai dengan 100 ng/ μ L cukup untuk digunakan sebagai proses amplifikasi *Real Time PCR*.

Konsentrasi sampel sangat berpengaruh terhadap pembentukan kurva standar. Hasil pengukuran yang baik untuk konsentrasi DNA dalam penggunaannya untuk amplifikasi *Real Time PCR* adalah berkisar antara 0,5

sampai dengan 6,5 µg/mL, sedangkan batas konsentrasi minimal untuk proses amplifikasi adalah 0,03-0,80 pg (Harisah, 2017). Oleh karena itu, pengenceran DNA sangat perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil amplifikasi yang maksimal (Amalia, 2013). Pada penelitian ini, konsentrasi DNA diencerkan menjadi 1 µg/mL karena konsentrasi tersebut sudah cukup untuk digunakan pada tahap amplifikasi DNA. Selain itu, pengenceran sampel yang rendah akan menghasilkan variasi pengujian yang baik dibandingkan dengan pengenceran yang lebih tinggi. Selain pengaruh pengenceran, kadar konsentrasi dari asam nukleat dalam reaksi qPCR akan berpengaruh terhadap efisiensi amplifikasi, karena efisiensi amplifikasi merupakan faktor yang penting untuk akurasi qPCR (Hewajuli & Dharmayanti, 2014).

Tingginya konsentrasi DNA yang diekstrak akan menentukan kecepatan untuk mencapai garis *basement-threshold* pada saat amplifikasi berlangsung. Analisis kurva amplifikasi pada *Real Time* PCR dilakukan dengan melihat kenaikan kurva amplifikasi dan nilai CP (*crossing point*) yakni siklus dimana *fluorescent* mencapai *threshold* (ambang batas), sehingga terjadi peningkatan yang signifikan saat pertama kali terdeteksi. Nilai CP ini berhubungan dengan jumlah DNA yang terdapat pada sampel (Yanti, 2017). Penyebutan CP dalam beberapa penelitian berbeda. Seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Aristya dkk., (2014), yang menggunakan nilai CP ini sebagai nilai Cq (*quantification cycle*), keduanya didapatkan dari jumlah siklus pada proses *Real Time* PCR yang berpotongan dengan garis *threshold*.

Analisis data pada *Real Time* PCR memungkinkan untuk dilakukan pembacaan hasil pada waktu reaksi berlangsung. Sehingga keberadaan DNA pada sampel yang telah diamplifikasi dapat diamati seiring dengan proses munculnya kurva sebagai hasil dari akumulasi fluoresensi penanda (*probe*). Ketika *probe* pecah, reporter tidak lagi berdekatan dengan *quencher*, sehingga dapat mengemisikan cahaya *fluorescent* yang akan dibaca oleh detektor. Prinsipnya adalah, ketika *fluorescent* yang dipancarkan semakin tinggi dari *reporter*, maka akan langsung berkorelasi dengan akumulasi

Lanjutan Tabel 4.2

Wilayah	Kode Sampel	Nilai Cq	
		FAM	VIC
Surabaya Barat	S28/3	N/A	20,20
	S29	N/A	31,63
	EPC	32,00	32,44
	NTC	N/A	N/A

Hasil pengujian sampel pada penggilingan daging, menunjukkan adanya sampel yang teramplifikasi ditunjukkan dengan adanya nilai *Quantification cycle* (Cq) dan sampel yang tidak teramplifikasi (N/A). Dari hasil uji sebanyak 30 sampel penggilingan daging beserta EPC dan NTC, didapatkan setidaknya 5 sampel menunjukkan adanya kenaikan kurva amplifikasi. Sampel yang teramplifikasi tersebut memiliki nilai Cq yang berbeda antara satu dengan yang lainnya. Sampel dengan nilai Cq tertinggi pada deteksi FAM ditunjukkan pada sampel kode 87/3 dengan nilai Cq mencapai 39,04. Sedangkan untuk nilai Cq terendah ditunjukkan pada sampel kode 14/2 dengan nilai Cq mencapai 34,82. Nilai tersebut mendekati kontrol positif (EPC) yang teramplifikasi dengan nilai 32,00. Sedangkan tes validasi untuk NTC apabila nilai Ct untuk FAM dan VIC diatas 38,00.

Real Time PCR menggunakan pewarna fluoresensi dan *probe* fluoresensi. Pada penelitian ini, digunakan pewarna fluoresensi yakni *hydrolysis probe* (TaqMan probe) menggunakan oligonukleotida spesifik yang komplemen dengan DNA yang akan diamplifikasi. *Fluorescent hydrolysis probe* akan berpendar ketika *reporter* dan *quencher* terpisah melalui hidrolisis karena aktivitas nuklease. *Hydrolysis probe* bekerja dengan spesifik dan dapat mencegah terjadinya *primer-dimer* serta *mis-priming* sehingga menyebabkan terjadinya produk amplifikasi yang nonspesifik (Zilhadia, 2017).

Penggunaan *probe* spesifik akan membantu meningkatkan spesifitas pada uji qPCR, namun qPCR membutuhkan peralatan serta *reagent* yang relatif mahal, membutuhkan pemahaman yang baik, dan teknik yang benar untuk mendapatkan hasil yang akurat. *Real Time* PCR memiliki prinsip kerja mendeteksi dan kuantifikasi *reporter fluorescent*. Sinyal dari *fluorescent* akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk amplifikasi DNA dalam reaksi. Reaksi selama fase eksponensial dapat

Gambar 4.32 merupakan kurva amplifikasi pada sampel penggilingan dengan kode 29. Dari grafik diatas, dapat dilihat bahwa Sampel dengan kode 29 menunjukkan adanya kenaikan kurva secara signifikan pada VIC (deteksi vertebrata) namun tidak ada kenaikan pada deteksi FAM (deteksi babi). Hal ini menunjukkan bahwa DNA yang diuji negatif babi, namun terdapat hewan vertebrata di dalamnya.

Dari total 30 yang diuji, 5 di antaranya mengalami kenaikan kurva hingga melewati ambang batas atau *crossing point* (Cp) dan membentuk fase log. Cp merupakan nilai yang dihasilkan dimana *fluorescent* pada sampel meningkat melebihi fase lag. Cp juga diartikan sebagai jumlah siklus dimana sampel mulai terbaca diatas *Arbitrary Fluorescence Level* (AFL) yang menunjukkan awal terjadinya fase pertumbuhan eksponensial. Semakin rendah nilai Cp, maka semakin tinggi tingkat konsentrasi DNA target (Harisah, 2017). Selain itu, seperti yang terlihat bahwa EPC mengalami kenaikan kurva amplifikasi secara signifikan, hal ini menunjukkan bahwa *primer* dan *probe* serta *reagent Real Time PCR* sesuai untuk mengamplifikasi DNA babi (FAM) dan vertebrata (VIC) sekaligus secara spesifik. Konsentrasi untuk kontrol positif harus memberikan hasil positif yang konsisten. Selain EPC, terdapat NTC yang menunjukan tidak adanya kenaikan kurva. Penggunaan kontrol negatif dipakai untuk menunjukkan bahwa *reagent* yang digunakan tidak terkontaminasi dengan DNA target yang akan diamplifikasi. Jaminan mutu ini sangat penting untuk memastikan berhasilnya suatu pengujian dalam *Real Time PCR*.

Penggunaan kontrol negatif dan positif (kontrol spesifik) serta pengendalian mutu *reagent* merupakan salah satu pelaksanaan program jaminan mutu yang sangat diperlukan untuk mendukung hasil pengujian sehingga mendapat hasil akurat. NTC yang teramplifikasi dan tidak melebihi nilai dari *threshold cycle* (Ct) menandakan bahwa hasil pembacaan qPCR menunjukkan tidak adanya sampel yang terdeteksi. Sehingga penelitian ini dianggap layak dan dapat dipercaya (Pratama, 2015). *Real Time PCR* (qPCR) memiliki sensitivitas tinggi dan memiliki kelebihan dibandingkan dengan PCR konvensional. qPCR dinilai lebih dinamis,

memiliki kemampuan aplikasi penggunaannya untuk pengujian lebih banyak, dan memiliki resiko kontaminasi yang lebih sedikit.

Hasil amplifikasi dengan primer *probe* babi sesuai dengan protokol *Progenus Easyfast™ Pig/Suidae Detection & Quantification Kit* akan menjawab inti permasalahan dari penelitian ini, apakah terdapat cemaran DNA babi pada sampel penggilingan daging di Pasar Surya Kota Surabaya. Selain itu, hasil amplifikasi DNA dengan *Real Time* PCR ini dapat dijadikan sebagai analisis untuk mendeteksi keberadaan DNA selain babi, yakni vertebrata. Hal ini karena penggunaan *hydrolysis probe* dapat digunakan untuk multiplex qPCR dengan menggunakan DNA target serta pasangan lebih dari satu dalam suatu reaksi karena probe akan berikatan secara spesifik dengan beberapa DNA target yang berbeda (Harisah, 2017). Kurva kenaikan amplifikasi menunjukkan adanya kenaikan konsentrasi dari DNA yang bebasangan dengan primer dan probe yang diuji. Kenaikan kurva ini terjadi karena peningkatan dari *fluorescent* yang berpendar ketika adanya ikatan dengan *double stranded* DNA. Fluoresensi yang dihasilkan sesuai dan sebanding dengan jumlah DNA *template* yang teramplifikasi (Rasyid, 2015).

Proses amplifikasi DNA yang dihasilkan berdasarkan hasil Cq, sampel dengan kode 14/2; 15/4; 43; 87/2; 87/3 dapat dikatakan mengandung DNA babi. Nilai Cq yang diperoleh mencapai 34,82; 38,07; 37,27; 38,02; 39,04 secara berturut-turut. Dari kelima nilai Cq diatas, nilai yang paling mendekati Cq dari EPC sebagai kontrol positif adalah sampel dengan kode 14/2 yakni 34,82. Nilai EPC pada penelitian ini adalah 32,00 yang mana nilai tersebut dianggap memiliki kandungan DNA babi dan vertebrata sekaligus. Tes validasi dalam protokol *Progenus Easyfast™ Pig/Suidae Detection & Quantification Kit* dari EPC apabila Ct (babi) dan Ct (vertebrata) memiliki nilai kira-kira 30,00, sedangkan untuk tes validasi NTC apabila Ct (babi) dan Ct (vertebrata) memiliki nilai diatas 38,00 (Progenus, 2017). Sampel dengan kode yang menunjukkan adanya DNA babi dapat diakumulasikan dalam satu kurva amplifikasi (Gambar 4.31) dengan dua deteksi sekaligus (FAM dan VIC) sebagai berikut.

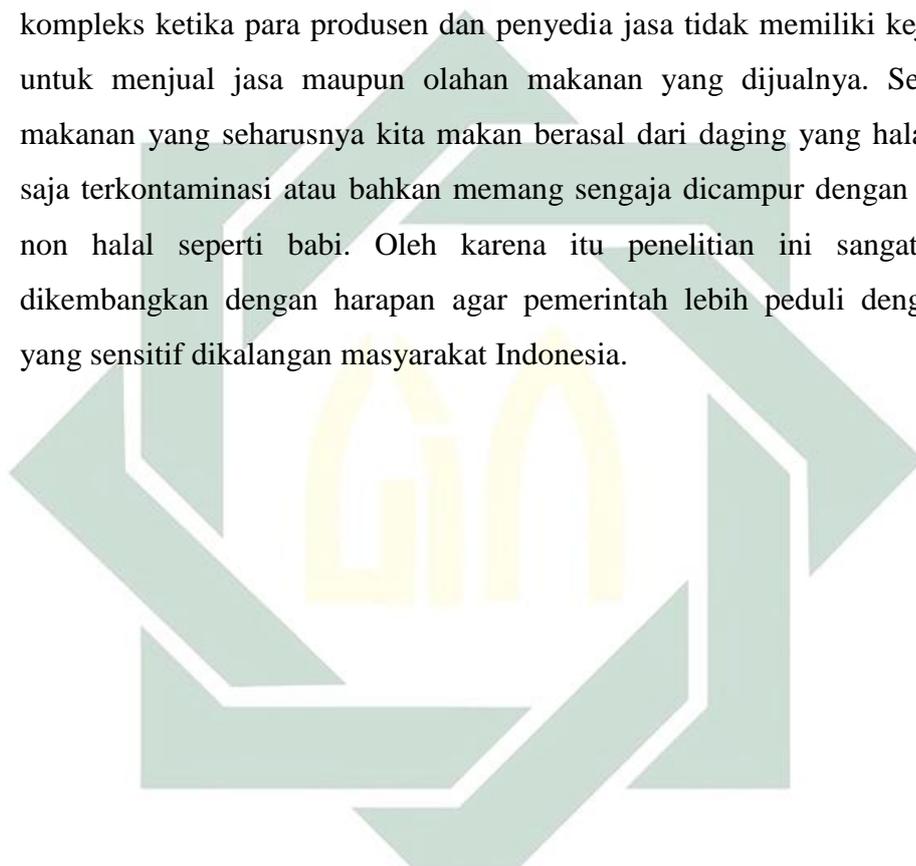
4.4. Urgensitas Penelitian

Penelitian berbasis molekular dengan menggunakan metode *Real Time PCR* telah banyak dilakukan. Berbagai macam penelitian tersebut banyak digunakan untuk memberikan ilmu pengetahuan baru serta membahas tentang sesuatu yang sensitif seperti deteksi kontaminan DNA babi pada sampel penggilingan daging. Penelitian ini menjadi penelitian yang penting karena berkaitan dengan kehalalan suatu produk makanan. Hal ini didasarkan pada masih belum adanya regulasi yang mengatur tentang sertifikasi halal untuk penyedia jasa penggilingan daging yang terdapat di pasar Surya Kota Surabaya. Sertifikasi halal untuk pengusaha makanan beserta prosesnya seperti penggilingan daging ini perlu diatur, sehingga dengan diadakannya penelitian ini, diharapkan pemerintah dapat menerbitkan regulasi, khususnya tentang penggilingan daging yang tersertifikasi halal. Dalam penelitian ini, ditemukan fakta bahwa dari 30 sampel penggilingan daging yang diuji menggunakan metode *Real Time PCR*, 5 diantaranya dinyatakan mengandung DNA babi. Dengan adanya temuan ini, sudah seharusnya pemerintah lebih peduli dengan sesuatu yang menjadi isu sensitif dikalangan masyarakat Indonesia seperti kehalalan suatu produk makanan karena mayoritas penduduk Indonesia adalah muslim.

Tindak lanjut dari penelitian ini dapat dilakukan dengan adanya kerjasama dengan berbagai pihak, terutama pihak yang berwenang atas penjamin kehalalan suatu produk seperti Badan Penyelenggara Jaminan Produk Halal (BPJPH). Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya sebagai salah satu kampus Islam telah ikut andil dalam menjawab kebutuhan masyarakat tentang arti pentingnya pola hidup halal dalam berbagai aspek kehidupan, yakni hadirnya Halal Center UINSA. Halal center ini menjadi salah satu peluang dan memiliki kontribusi dalam pengembangan hasil riset agar bisa sampai kepada pemerintah daerah. Menurut Sukoso (2018), Halal Center perguruan tinggi negeri bergerak dibidang pengabdian masyarakat tentang produk-produk halal yang memiliki beberapa kewenangan antara lain melakukan penelitian terhadap

mereka khamr. Rosulullah berkata: “Jika kamu menemukan yang lain, maka makanlah dan minumlah dari yang lain itu. Jika tidak menemukan kecuali itu, cucilah dengan air lalu makan dan minum. Demikianlah Abu Daud meriwayatkan hadits tersebut di dalam kitab Sunan-nya. Di dalam kitab tersebut juga ada sanad lain dari Muhammad bin Syuaib. (HR. Baihaqi, No. 33).

Di era sekarang ini, permasalahan tersebut menjadi semakin kompleks ketika para produsen dan penyedia jasa tidak memiliki kejujuran untuk menjual jasa maupun olahan makanan yang dijualnya. Sehingga makanan yang seharusnya kita makan berasal dari daging yang halal, bisa saja terkontaminasi atau bahkan memang sengaja dicampur dengan daging non halal seperti babi. Oleh karena itu penelitian ini sangat perlu dikembangkan dengan harapan agar pemerintah lebih peduli dengan isu yang sensitif dikalangan masyarakat Indonesia.



- Erwanto, Y., M.Z. Abidin., A. Rohman., dan Sismindari. 2012. Identifikasi Daging Babi Menggunakan Metode PCR-RFLP Gen Cytochrom b dan PCR Primer Spesifik Gen Amelogenin. Agritech. *Jurnal Teknologi Pertanian*. UGM.
- Erwanto, Y., M.Z. Abidin., dan A. Rohman. 2014. Identification of Pork Contamination in Meatballs if Indonesia Local Market using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Analysis. *Agriculture Technological Journal*. Gadjah Mada University.
- Fadlurrahman., A.K. Wardhani., dan E. Widyastuti. 2015. Deteksi Gelatin Babi pada Soft Candy Menggunakan Metode PCR-RFLP sebagai Salah Satu Pembuktian Kehalalan Pangan. *Jurnal Teknologi Pertanian* Vol. 16 No. 2. 81-88.
- Harisah, S.U. 2017. Analisis Cemaran Daging Babi pada Sosis Sapi yang Beredar di Pasar Parung Menggunakan *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Hartanto, B.S., R.A. Fitra., L.R. Kartika., and M. Cahyadi. 2017. Authentication of Raw Chicken Meat from Pork Contamination using Gene Cyt-B with Duplex-PCR Analysis. *Bulletin of Animal and Science*, DOI. Vol. 41 (2): 113-118.
- Hasan, K.N.S. 2014. Kepastian Hukum dan Labelisasi Halal Produk Pangan. *Jurnal Dinamika Hukum*. Fakultas Hukum Universitas Sriwijaya: Palembang. Vol. 14 No: 2
- Hewajuli, D.A., dan N.L.P.I. Dharmayanti. 2014. *Perkembangan Teknologi Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction dalam Mengidentifikasi Genom Avian Influenza dan Newcastle Diseases*. Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor.
- Hidayat, R. 2015. Perbandingan Metode Kit Komersial dan SDS untuk Isolasi DNA Babi dan DNA Sapi pada Simulasi Cangkang Kapsul Keras untuk Deteksi Kehalalan Menggunakan *Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction)*. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Program Studi Farmasi, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Hilda, L. 2013. Pandangan Sains Terhadap Haramnya Lemak Babi. *Logaritma*. Vol. 1, No. 01.
- Ibnu, Hazm Abi Muhammad Ali bin Ahmad bin Sa'id. *Al-Muhalla, Jilid 8*. Tahqiq Syaikh Ahmad Muhammad Syakir. Dar al-Fikr, Beirut.
- Indrawati, T., dan Y. Indri. 2014. Analisis Sumber Modal Pedagang Pasar Tradisional di Kota Pekanbaru. Fakultas Ekonomi Universitas Riau. *Jurnal Ekonomi*. Volume 22, Nomor 1.

- Iqbal, M., I.D. Buwono., dan N. Kurniawati. Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA untuk Deteksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan Vol. VII No. 1* (54-65).
- Izzah, A.N. 2014. Perbandingan antara Metode *SYBR Green* dan Metode Hydrolysis Probe dalam Analisis DNA Gelatin dan DNA Gelatin Babi dengan Menggunakan *Real-Time PCR*. *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah.
- Karimah, I. 2015. Perubahan Kewenangan Lembaga-Lembaga yang Berwenang dalam Proses Sertifikasi Halal. *Jurnal Syariah 3*. Universitas Indonesia.
- Lazaro and Hernandez. 2013. *Real-Time PCR in Food Science: Introduction*. *Curr Issue Bio*. 15: 25-38.
- Lekagul, B., dan Mcneely. 1988. *Mammals of Thailand*. 2nd. Saha Karn Bhaet Co, Bangkok, Thailand.
- LPPOM, MUI. 2013. "Hukum Penggunaan Alkohol" *Jurnal Halal*, No. 103 Th XVI: Jakarta. Hlm 34-35.
- Loftis, A.D, and W.K. Reeves. 2012. *Principle of Real-Time PCR*. *Veterinary PCR Diagnostic*, 2-17.
- Martida, V., dan M. Pharmawati. 2016. Pemilihan Primer RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) pada PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Tanaman Kamboja (*Plumeria sp.*). *Jurnal Simbiosis IV* (1): 16-18. ISSN: 2337-7224.
- MUI. 2007. Hukum Penggunaan Alkohol. *Jurnal Halal*, No. 103 Th XVI: Jakarta. Hlm 34-35.
- Mustafa, H., I, Rachmawati., dan Y, Udin. 2016. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk *Anopheles barbirostris*. *Jurnal Vektor Penyakit*. Vol. 10 No. 1: 7-10.
- Mu'adz, H., dan Ahmad. 2003. *Syarah 40 Hadits tentang Akhlak*. Pustaka Azam, Jakarta.
- Ni'mah, A., Y. Kartikasari., A.D. Pratama., L.R. Kartikasari., B.S. Hertanto., and M. Cahyadi. Detection of Pork Contamination in Fresh and Cooked Beef using Genetic Marker Mitochondrial-DNA Cytochrome B by Duplex-PCR. *Journal of The Indonesian Tropical Animal Agriculture*. (J. Indonesian Trop. Anim. Agric.). pISSN 2087-8273 eISSN 2460-6278. 41(1): 7-12.

- Novianasari, T. 2018. Uji Komparasi Hasil Ekstraksi DNA Menggunakan Teknik Sederhana dan Teknik Molekuler GAPDH pada Gajah Sumatera Betina di Pusat Latihan Gajah Taman Nasional Way Kambas. *Skripsi*. Jurusan Biologi. FMIPA, Universitas Lampung.
- Pelosi, C.S., M.V. Leurenco., M. Silva., A.Z. Santos., S.C. Franca., and M. Marins. 2013. Developmental of a Taqman *Real-Time* PCR Assay for Detection of *Leifsonia Xyli* Subsp *Xyli*. *Tropical Plant Pathology*. Vol. 38, no. 4, pp. 343-345.
- Puspitaningrum, Y. 2015. Deteksi DNA Gelatin Sapi dan Gelatin Babi pada Simulasi *Gummy* Vitamin C Menggunakan Real-Time PCR untuk Analisis Kehalalan. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Peraturan Daerah Kotamadya Daerah Tingkat II Surabaya Nomor 2 Tahun 1999.
- Peraturan Daerah Kotamadya Tingkat II Surabaya Nomor 10 Tahun 1982 tentang Pembentukan PDPS Kota Surabaya.
- Peraturan Daerah Kotamadya Daerah Tingkat II Surabaya Nomor 2 Tahun 2008.
- Pratama, P. 2015. Aplikasi *Real-Time* PCR untuk Mendeteksi Bakteri *Salmonella* sp. pada Hasil Perikanan. *Skripsi*. Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Priyanka, V.A. 2017. Deteksi Cemaran Daging Babi pada Produk Sosis Sapi di Kota Yogyakarta dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal*. Program Studi Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Progenus Smart DNA Partner. 2017. *Easy Fast Pig/Suidae Detection & Quantification Kit*. Version Easy Fast Pig v2 1.0. 7A rue Camille. Hubert 5032 GEMBLoux Belgium.
- Rachmawati, Y. 2014. Karakter Fenotip dan Molekular Melon (*Cucumis melo* L. "TACAPA") Pada Media Tanam Tanah Karst. *Tesis*. Program Studi Biologi. Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.
- Raph, N., dan H. Leccar. 1991. *Mollecular & Cell Biophisics*. Canada: Addison-Wesley Publishing Company.
- Rasyid, S. 2015. Analisis Cemaran Daging Babi pada Produk Bakso Sapi yang Beredar di Wilayah Ciputat Menggunakan *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan Metode *Hydrolysis Probe*. *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Roostita, L.B., H.A.W. Lengkey., L. Suryaningsih., W.S. Putranto., E. Wulandari., dan G.L. Utama. 2014. Beef Meatballs Adulteration Tests

- Widyaninggar, A., Triwahyusi., K. Triyana., and A. Rohman.,. 2012. *Differentiation between Porcine and Bovine Gelatin in Commercial.*
- Yanti, A. 2017. Uji Autentifikasi Daging Kambing Terhadap Cemaran Daging Babi Menggunakan *Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction)*. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan: Jakarta.
- Yulia, L. 2014. *Bagaimana Biokimia Unsur Babi Pengaruhi Tubuh Manusia*. Pelaksana Direktorat Urais dan Binsyar, Subdit Produk Halal.
- Zilhadia., A.N. Izzah., O.S. Betha. 2017. Perbandingan Metode SYBR Green dan Hydrolysis Probe dalam Analisis DNA Gelatin Sapi dan Babi Menggunakan *Real-Time PCR*. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 4(2), 16-23.
- Zulfahmi. 2013. Penanda DNA untuk Analisis Genetik Tanaman. *Jurnal Agroteknologi*. Vol. 3 No. 2, 41-52.

