



Deteksi Kontaminasi Babi pada Olahan Daging dengan Metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Fajriana S. Nurruasyda*, Safri Ishmayana, Muhammad Fadhlillah, Agus Safari,
Salma Zamzahra, Reysha A.Q.A. Septiana, Fadilla Wiliandini, Najwa Nabila,
Husain A. Sumeru, Rina G. Latifah

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran,
Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21, Jatinangor, 45363, Jawa Barat, Indonesia.

*Alamat email penulis koresponden: fajriana@unpad.ac.id

Abstrak

Kontaminasi daging babi pada produk olahan daging menjadi masalah yang sering terjadi, terutama bagi konsumen yang memerhatikan keyakinan agama atau budaya mereka. Oleh karena itu, deteksi keberadaan kontaminasi daging babi dalam produk olahan daging menjadi penting untuk memastikan keaslian dan keamanan produk tersebut. Dalam beberapa penelitian sebelumnya, metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dengan primer *cytochrome b* banyak digunakan untuk mendeteksi DNA babi karena memiliki kepekaan yang tinggi dalam identifikasi kontaminasi DNA babi pada bahan pangan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji metode PCR dalam mendeteksi kontaminasi daging babi pada olahan daging. Sampel yang digunakan adalah bakso sapi dan bakso babi dengan tiga tahapan utama yaitu isolasi DNA, amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR, dan visualisasi produk PCR dengan elektroforesis. Berdasarkan hasil yang didapatkan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa metode PCR dengan primer *cytotochrome b* merupakan metode yang efektif untuk mendeteksi kontaminasi babi pada olahan daging dapat dilakukan karena metode ini sensitif, spesifik, dan relatif mudah untuk dilakukan.

Kata kunci: Kontaminasi daging babi, PCR, DNA babi, olahan daging

PENDAHULUAN

Pangan merupakan kebutuhan dasar manusia sehingga kualitas serta keamanan pangan menjadi aspek yang sangat penting dalam industri pangan. Permintaan konsumsi produk daging yang berkembang pesat di seluruh dunia dapat menyebabkan masalah pemalsuan dan penipuan dalam industri pangan seiring dengan perkembangannya (Akbar *et al.*, 2021). Sehingga daging babi yang dianggap sebagai alternatif yang lebih terjangkau daripada daging lainnya sering digunakan sebagai pengganti daging mahal. Kontaminasi daging dengan berbagai bahan seperti babi adalah permasalahan yang sering menjadi perhatian utama dalam industri pangan karena etika pangan yang religius, tujuan medis, dan pemalsuan yang disengaja untuk menurunkan biaya produksi (Ha *et al.*, 2017).

Daging babi merupakan salah satu hewan ternak yang dikembangkan untuk menghasilkan daging. Daging babi memiliki ciri-ciri bau yang khas, dagingnya lebih

kenyal, mudah diregangkan, berair, berwarna lebih pucat dibandingkan sapi, serat yang lebih halus, elastis, dan sangat basah sehingga sulit dipisahkan dari dagingnya (Kumari, 2009). Daging babi mengandung vitamin, dan mineral penting seperti tiamin, selenium, zinc, vitamin B12, dan juga zat besi (Sri & Elvy, 2022). Meskipun memiliki kandungan vitamin dan mineral, daging babi dianggap tidak boleh dikonsumsi. Hal ini disebabkan oleh beberapa alasan seperti risiko penyakit yang dapat ditularkan dari hewan ke manusia (zoonosis), pertimbangan agama, potensi toksisitas makanan, dan kemungkinan adanya pemalsuan label pada produk daging yang mungkin tidak sesuai dengan kandungannya (Zia *et al.*, 2020). Kontaminasi daging babi pada bahan pangan dapat menimbulkan masalah terhadap kehalalan yang terkait dengan keyakinan agama dan budaya yang memandang daging babi tidak boleh dikonsumsi (Aida *et al.*, 2005). Oleh karena itu, deteksi kontaminasi babi pada olahan daging menjadi hal yang sangat penting.

Deteksi kontaminasi babi dalam olahan daging memerlukan metode yang andal, sensitif, dan canggih. Berbagai metode analisis telah dikembangkan untuk mendeteksi pemalsuan daging atau makanan yang terdapat dalam produk olahan daging seperti tes sensorik, analisis kromatografi, *immunoassay*, teknologi penginderaan cerdas, metode kolorimetri optik, teknologi deteksi cepat optik modern, dan teknologi analisis DNA (Xiubai *et al.*, 2023). Salah satu metode yang telah berkembang pesat dalam beberapa tahun terakhir adalah metode pendekatan berbasis DNA, yaitu PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Muflihah *et al.*, 2023). Primer *cytochrome b* seringkali digunakan dalam analisis deteksi DNA babi dengan menggunakan PCR karena memiliki kepekaan yang tinggi dalam mendeteksi DNA babi (Effendi *et al.*, 2020). Sehingga dalam penelitian ini digunakan menggunakan metode berbasis PCR dengan primer *cytochrome b* untuk menganalisis kontaminasi DNA babi pada sampel daging olahan yang didapatkan dari berbagai lokasi di kota Bandung.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, inkubator, mortar dan alu, mikropipet, *vortex*, *centrifuge*, spatula, penangas listrik, PCR (miniPCR®), elektroforesis (blueGel™) dan UV transilluminator. Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakso babi dan bakso sapi yang berasal dari pasar swalayan, bakso pedagang kaki lima, kit ekstraksi dan purifikasi GenJET Genomic DNA Purification Thermo Fisher Scientific, 1Kb DNA Plus Ladder Thermo Fisher Scientific, PCR Master Mix Thermo Fisher Scientific, Primer Forward dan Primer Reverse gen *cytochrome-b*, *nucleae-free water*, agarose 2%, TAE Buffer 0.5x, loading dye, dan tube sentrifugasi.

Preparasi Sampel

Sampel bakso sapi (BS) dan bakso babi (BB) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari pasar swalayan. Sedangkan sampel bakso (BA) yang akan dianalisis berasal dari pedagang kaki lima di sekitar Bandung. Seluruh sampel bakso dipisahkan

dalam wadah steril yang terpisah agar tidak terjadi kontaminasi dan disimpan pada suhu -4°C hingga dilakukan pengujian di laboratorium. Dalam penelitian ini juga dilakukan analisis terhadap bakso babi dan bakso sapi (BC) yang digabungkan menjadi satu sampel yang sama sebagai konfirmasi kontaminasi. Masing-masing sampel kemudian dihancurkan dengan menggunakan mortar dan alu hingga hancur, serta di timbang seberat 20 mg untuk selanjutnya dilakukan isolasi DNA.

Isolasi DNA

Ekstraksi dan isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan kit GenJET Genomic DNA Purification (*Thermo Fisher Scientific*). Sampel yang telah dihancurkan dalam tahap sebelumnya kemudian ditimbang sebanyak 20 mg dan dimasukkan kedalam tube sentrifugasi kapasitas 1,5 mL. Ekstraksi dimulai dengan penambahan 180 μL Digestion Solution kedalam sampel. Setelah diresuspensi, sampel kemudian ditambahkan 20 μL Proteinase K Solution, dihomogenisasi, dan diinkubasi pada suhu 56°C selama 3 jam. Sebanyak 20 μL RNase A Solution ditambahkan kedalam sampel, dihomogenisasi, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Sampel kemudian ditambahkan 200 μL Lysis Solution, dihomogenisasi selama 15 detik, ditambahkan 400 μL etanol 50% dan dihomogenisasi kembali. Lisat yang terbentuk dipindahkan kedalam DNA Purification Column yang berada dalam *collection tube*. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan $6000 \times g$ selama 1 menit. Larutan yang berada di *collection tube* dibuang, ditambahkan 500 μL Wash Buffer I dan disentrifugasi dengan kecepatan $8000 \times g$ selama 1 menit. Larutan yang berada di *collection tube* dibuang, ditambahkan 500 μL Wash Buffer II dan disentrifugasi dengan kecepatan $12.000 \times g$ selama 1 menit. DNA Purification Column dipindahkan kedalam tube sentrifugasi, ditambahkan 200 μL Elution Buffer untuk mengelusi DNA, diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit, dan disentrifugasi dengan kecepatan $8000 \times g$ selama 1 menit. Sampel DNA kemudian disimpan pada suhu -20°C untuk dilakukan analisis (Effendi *et al.*, 2020).

Amplifikasi DNA dengan Menggunakan PCR

Sekuen primer gen *cytochrome b* untuk amplifikasi PCR yaitu urutan basa *forward* 5'-GCC TAA ATC TCC CCT CAA TGG TA-3' dan urutan basa *reverse* 5'-ATG AAA GAG AAT AGA TTT TCG-3' (Shabani *et al.*, 2015). 12,5 μL PCR mix solution (MgCl_2 , dNTPs, Taq DNA Polymerase, dan loading) dimasukkan kedalam tube PCR, kemudian ditambahkan 7,5 μL DNA sampel, 2,5 μL masing-masing primer *reverse* dan *forward* serta ditambahkan *nuclease-free water* lalu dihomogenisasi.

Sampel yang akan diamplifikasi kemudian dimasukkan kedalam PCR kondisi denaturasi awal yaitu suhu 94°C selama 4 menit, dilanjutkan dengan denaturasi sebanyak 35 siklus pada temperatur 94°C selama 30 detik, penempelan awal (*annealing*) pada suhu 56°C selama 40 detik, extension pada 72°C selama 30 detik, serta final extension pada suhu 72°C selama 5 menit.

Elektroforesis Produk PCR

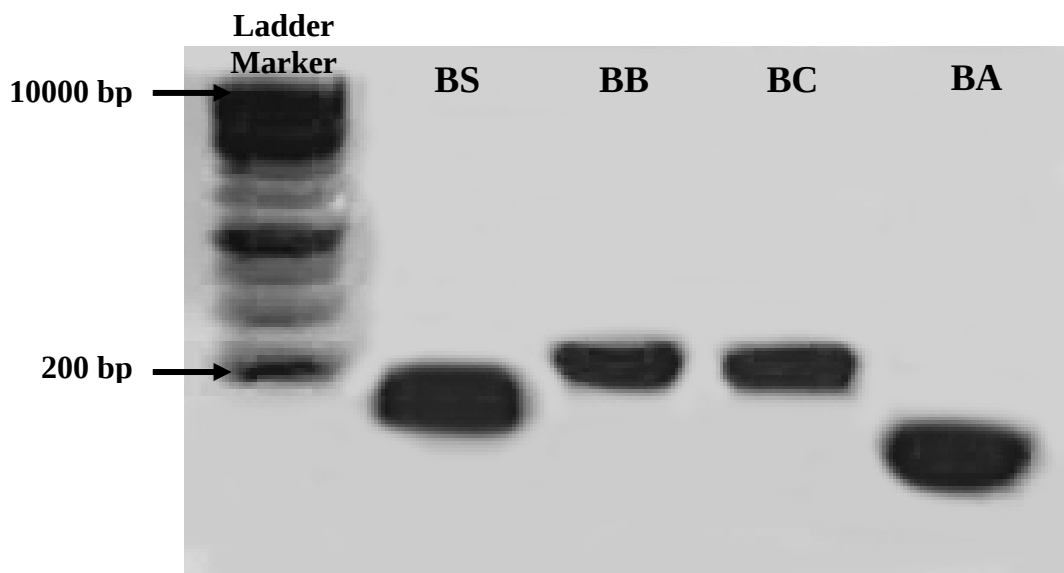
Hasil amplifikasi produk PCR kemudian di analisis dengan 2% gel agarosa dalam TAE buffer 0,5x. Sebelum di masukan kedalam sumur gel, hasil amplifikasi ditambahkan dengan loading dye. DNA ladder 100 bp dimasukan kedalam sumur sebagai marker. Elektroforesis dilakukan selama 40 menit dengan voltase 100V. Hasil elektroforesis berupa keberadaan DNA *band* (pita DNA) diamati dengan menggunakan UV *transilluminator*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemajuan teknologi pengolahan pangan saat ini menjadikan keamanan sebagai masalah utama di seluruh dunia. Negara-negara seperti AS, UE, Kanada, Jepang, Austria, Brasil, dan Argentina telah memberlakukan persyaratan ketertelusuran pangan sebagai alat keamanan pangan yang dapat secara efektif melacak kualitas dan mengurangi informasi palsu pada label (Nakyinsige *et al.*, 2012). Metode analisis yang saat ini digunakan untuk mendeteksi kontaminasi ataupun penambahan produk pangan dengan daging babi umumnya dilakukan dengan analisis protein atau DNA.

PCR (*Polymerase Chain Reactions*) merupakan salah satu metode yang banyak dikembangkan dalam pendeteksian kontaminasi DNA babi pada produk pangan. Beberapa penelitian mengenai analisis kontaminasi DNA babi dilakukan dengan menggunakan pengembangan PCR seperti multipleks PCR, *real time* PCR, dan PCR-*southern hybridization* (Hossain *et al.*, 2017; Mutalib *et al.*, 2015; Sultana *et al.*, 2018). Dalam analisisnya, gen mitokondria yang mengkodekan antara lain gen 12S rRNA, 16S rRNA, 18S rRNA, *cytochrome b*, *cytochrome oxidase II*, dan *NAD dehydrogenase* banyak digunakan dalam identifikasi kontaminasi DNA babi karena menghasilkan jumlah salinan yang tinggi dibandingkan dengan DNA inti (Lee *et al.*, 2016). Selain itu, amplifikasi dengan menggunakan primer gen mitokondria juga dapat dilakukan untuk menganalisis DNA yang terkandung pada bahan pangan yang telah diproses seperti daging olahan yang akan terdegradasi menjadi fragmen berukuran kecil (Lee *et al.*, 2016; Shabani *et al.*, 2015). Sehingga dalam penelitian ini amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer *cytochrome b* yang berasal dari bagian *conserved* dari gen mitokondria dan secara spesifik menghasilkan satu pita dengan ukuran tertentu dan hanya mengamplifikasi DNA babi yang terkandung didalam sampel (Shabani *et al.*, 2015). Primer yang digunakan akan menghasilkan fragmen DNA sebesar 212 bp (Nikzad *et al.*, 2017).

Analisis kontaminasi DNA babi dilakukan pada sampel daging olahan yaitu bakso yang didapatkan dari beberapa tempat di Bandung untuk mengkonfirmasi sampel bakso sapi kemasan (BS) yang berasal dari pasar swalayan dan bakso sapi yang berasal dari pedagang kaki lima (BA) tidak terkontaminasi oleh daging babi. Selain itu, dalam penelitian ini juga dianalisis bakso babi kemasan (BB) yang berasal dari pasar swalayan sebagai kontrol positif dan campuran dari BS dan BB (BC) untuk pengujian sensitivitas.



Gambar 1. Hasil visualisasi PCR

Setelah dilakukan isolasi DNA dan amplifikasi dengan menggunakan PCR, hasil amplikon sampel dianalisis dengan menggunakan elektroforesis. Elektroforesis gel sering digunakan sebagai analisis akhir dimana produk PCR divisualisasikan pada gel agarosa berdasarkan ukurannya, sehingga tidak memberikan hasil kuantitatif (Mohamad *et al.*, 2013). Berdasarkan hasil visualisasi pita DNA dengan menggunakan elektroforesis pada agarosa 2% yang ditunjukkan pada Gambar 1, pita DNA pada sampel yang mengandung daging babi yaitu BB dan BC menghasilkan pita dengan ukuran sekitar 200 bp yang merupakan fragmen dari gen *cyt b*. Sementara itu, sampel BS dan BA yang merupakan daging olahan bakso sapi kemasan dan bakso sapi pedagang kaki lima menghasilkan pita dengan ukuran yang berbeda dengan BB dan BC dengan ukuran dibawah 200 bp. Hasil ini menunjukkan pita yang terbentuk kemungkinan besar berasal dari primer serta komponen PCR lain yang tidak teramplifikasi.

Berdasarkan hasil identifikasi kontaminasi dengan menggunakan teknik PCR pada beberapa sampel daging olahan ini diketahui bahwa bakso kemasan yang berasal dari pasar swalayan dan pedagang kaki lima tidak terkontaminasi dengan DNA babi. Sedangkan seluruh sampel baik sampel bakso babi maupun bakso campuran daging sapi dan babi terdeteksi memiliki gen *cyt b*. Sehingga deteksi dengan menggunakan metode PCR ini dapat dilakukan untuk pengembangan analisis kontaminasi DNA babi selanjutnya karena dapat menghasilkan hasil identifikasi yang spesifik dan sensitif (Shabani *et al.*, 2015)

KESIMPULAN

Teknik PCR yang dilakukan dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan primer spesifik untuk identifikasi kontaminasi DNA babi pada sampel daging olahan. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan didapatkan bahwa deteksi DNA babi menggunakan PCR dengan primer *cyt b* dapat dilakukan karena metode ini sensitif, spesifik, dan relatif mudah dilakukan. Meskipun demikian, visualisasi dengan menggunakan elektroforesis (blueGel™) dapat menggunakan agarosa dengan konsentrasi 1% sehingga pita-pita *ladder marker* dan DNA dapat teridentifikasi dengan lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Aida, A. A., Man, Y. B. C., Wong, C. M. V. L., Raha, A. R., & Son, R. 2005. Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for halal authentication. *Meat Science*, 69(1): 47–52
- Akbar, A., Shakeel, M., Al-Amad, S., Akbar, A., Ali, A. K., Rahmeh, R., Alotaibi, M., Al-Muqatea, S., Areeba, S., Arif, A., Fayyaz, M., Khan, I. A., Ahmed, S., Hussain, A., & Musharraf, S. G. 2021. A simple and sensitive NGS-based method for pork detection in complex food samples. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(5): 103124.
- Bai, Z., Zhu, R., He, D., Wang, S., & Huang, Z. 2023. Adulteration detection of pork in mutton using smart phone with the CBAM-Invert-ResNet and multiple parts feature fusion. *Foods*, 12(19): 3594.
- Effendi, M.H., Afdilah, S.W., Wardhana, D.K., & Kurniawan, F. 2020. The Identification of Pork Contamination on Beef by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(10): 634-637.
- Ha, J., Kim, S., Lee, J., Lee, S., Lee, H., Choi, Y., Oh, H. & Yoon, Y., 2017. Identification of pork adulteration in processed meat products using the developed mitochondrial DNA-based primers. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(3): 464.
- Hossain, M.M., Ali, M.E., Abd Hamid, S.B., Mustafa, S., Desa, M.N.M. & Zaidul, I.S.M., 2017. Targeting double genes in multiplex PCR for discriminating bovine, buffalo and porcine materials in food chain. *Food Control*, 73: 175-184.
- Kumari. 2009. *Waspada Flu Babi*. Penerbit Jala Sutra : Yogyakarta
- Lee, J.-H., Kim, M.-R., Jo, C.-H., Jung, Y.-K., Kwon, K. & Kang, T.S. 2016. Specific PCR assays to determine bovine, porcine, fish and plant origin of gelatin capsules of dietary supplements. *Food Chemistry*, 211: 253–259.
- Lubis, H. N., Mohd-Naim, N. F., Alizul, N. N., & Ahmed, M. U. (2016). From market to food plate: Current trusted technology and innovations in halal food analysis. In *Trends in Food Science and Technology*, 58: 55–68.
- Mohamad, N.A., El Sheikha, A.F., Mustafa, S. & Mokhtar, N.F.K. 2013. Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International*, 50(1): 330–338.
- Muflihah, Hardianto, A., Kusumaningtyas, P., Prabowo, S., & Hartati, Y.W. (2023). DNA-based detection of pork content in food. *Heliyon*, 9(3): e14418.
- Mutalib, S.A., Muin, N.M., Abdullah, A., Hassan, O., Wan Mustapha, W.A., Abdullah Sani, N. & Maskat, M.Y. 2015. Sensitivity of polymerase chain reaction (PCR)-southern hybridization and conventional PCR analysis for Halal authentication of gelatin capsules. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1): 714–719.

- Nakyinsige, K., Man, Y.B.C. & Sazili, A.Q. 2012. Halal authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science*, 91(3): 207–214.
- Nikzad, J., Shahhosseini, S., Tabar zad, 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. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(1): 3.
- Ruslan, A.A.A., Kamarulzaman, N.H., & Sanny, M. (2018). Muslim consumers' awareness and perception of halal food fraud. *International Food Research Journal*, 25: S87-S96.
- Shabani, H., Mehdizadeh, M., Mousavi, S.M., Dezfouli, E.A., Solgi, T., Khodaverdi, M., Rabiei, M., Rastegar, H. & Alebouyeh, M. 2015. Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. *Food Chemistry*, 184: 203–206.
- Sultana, S., Hossain, M.A.M., Zaidul, I.S.M. & Ali, M.E. 2018. Multiplex PCR to discriminate bovine, porcine, and fish DNA in gelatin and confectionery products. *LWT Food Science and Technology*, 92: 169–176.
- Zia, Q., Alawami, M., Mokhtar, N.F.K., Nhari, R.M.H.R. & Hanish, I., 2020. Current analytical methods for porcine identification in meat and meat products. *Food Chemistry*, 324: 126664.