

Penentuan Sensitivitas dan Spesifisitas Kit PRIME-CYTO untuk Deteksi Kandungan Babi dengan Metode Polymerase Chain Reaction

Aulia Syalwa Iskandar, Dina Safitri, Bevi Lidya, Sinta Setyaningrum*

Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Bandung, 40559, Indonesia

ABSTRAK

Indonesia merupakan negara dengan mayoritas penduduk beragama Islam. Dalam syariat Islam, terdapat larangan mengkonsumsi produk non-halal, di antaranya produk yang mengandung babi. Gen *cytochrome b* pada babi terpilih sebagai gen pengkode spesies babi dengan bantuan metode analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui sensitivitas dan spesifisitas kit PRIME-CYTO (Gabungan antara *Green Master Mix* dan primer *CYTB-Full* untuk PCR konvensional; gabungan qPCR *Master Mix* dan primer *CYTB-Full* untuk *real-time* PCR) untuk deteksi kandungan gen *cytochrome b* (*cyt b*) babi. Hasil penelitian menunjukkan kit PRIME-CYTO sensitif terhadap gen *cyt b* babi pada metode PCR konvensional dan *real-time* PCR. Persentase sensitivitas dan spesifisitas kit dengan metode PCR konvensional berturut-turut adalah 100% dan 100%; pada *real-time* PCR adalah 85% dan 10%. PCR konvensional dapat mendeteksi isolat DNA daging babi hingga kadar minimal 3 ng/ μ L; pada isolat DNA sosis babi hingga kadar minimal 10^{-7} ng/ μ L. Penggunaan *Master Mix* dengan *probe* disarankan untuk meningkatkan spesifisitas pada metode *real-time* PCR.

Keywords: Sensitivitas, spesifisitas, kit, *real-time* PCR, PCR konvensional, *cyt b*

© 2023 Pusat Kajian Halal ITS. All rights reserved.

1 Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang mayoritas penduduknya beragama Islam. Indonesia bahkan menduduki peringkat ke-1 sebagai negara dengan penduduk beragama Islam terbanyak berdasarkan *Muslim Population by Country 2021* dalam *World Population Review*. Berdasarkan data Direktorat Jenderal Kependudukan dan Pencatatan Sipil (Dukcapil) Kementerian Dalam Negeri, sebanyak 236,53 juta (86,88%) dari 272,23 juta penduduk Indonesia (Juni 2021) beragama Islam. Terdapat beberapa larangan bagi umat Islam, salah satunya adalah bahwa umat Islam dilarang mengonsumsi daging babi [1]. Hal ini dijelaskan dalam Fatwa Majelis Ulama Indonesia (MUI) tentang Penetapan Produk Halal. Selain itu, pemerintah Indonesia juga mengupayakan perlindungan terhadap masyarakat muslim terkait peredaran produk yang tidak halal dengan adanya Undang-Undang Nomor 33 Tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal. Hasil dari penerapan Undang-Undang ini adalah BPJPH (Badan Penyelenggara Jaminan Produk Halal) menerbitkan Sertifikat Halal terhadap suatu produk berdasarkan keputusan Penetapan Halal Produk dari MUI.

*Corresponding author. Tel: 081809004024; Fax:

Email address: sinta.setyaningrum@polban.ac.id

Dalam daging babi pun terdapat sejenis cacing berbahaya *Taenia solium* dan *Trichinella spiralis* yang dapat menimbulkan penyakit parasit pada manusia. *Taenia solium* dapat menyebabkan dua infeksi, yakni taeniasis yang disebabkan oleh cacing dewasa, serta siterkosis yang disebabkan oleh larva cacing[3]. Sedangkan *Trichinella spiralis* merupakan cacing yang menyerang otot manusia dan dapat menyebabkan beberapa penyakit, *encephalopathy*, gangguan *neuromuscular*, serta lesi okuler [4].

Terdapat beberapa metode analisis untuk mendeteksi adanya kandungan babi, baik berupa lemak, protein, dan *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) [5]. Metode analisis berdasarkan pada DNA dapat dilakukan dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Metode ini banyak digunakan untuk mendeteksi cemaran daging babi pada suatu produk pangan karena dinilai lebih stabil [6]. Untuk mengoptimalkan sensitivitas dan spesifisitas, gen pengkode yang digunakan harus dapat dengan spesifik membedakan spesies satu dengan yang lainnya. Gen *cyt b* dapat membedakan DNA yang berasal dari jenis hewan yang berbeda [7]. Hal ini dikarenakan gen *cyt b* terdapat pada mitokondria hampir seluruh mamalia dan bersifat polimorfik, walaupun terkait erat, tetap dapat dibedakan [8]. Beberapa penelitian telah menggunakan gen *cyt b* untuk mendeteksi kandungan babi ([9]; [10], dan [11]).

Dalam metode PCR, dibutuhkan suatu primer yang dapat mengamplifikasi DNA spesies yang dituju secara spesifik dan sensitif. Pada penelitian [11], dihasilkan suatu rancangan primer yang dapat mengamplifikasi gen *cyt b* babi secara spesifik, yaitu primer *CYTB-Full*. Primer yang dikombinasikan dengan *Green Master Mix* untuk PCR konvensional ini secara spesifik hanya dapat mengamplifikasi gen *cyt b* babi dan tidak dapat mengamplifikasi DNA ayam dan sapi. Setelah diketahui bahwa primer *CYTB-Full* spesifik terhadap gen *cyt b* babi, perlu diketahui juga besaran sensitivitas dan spesifisitas dari kit deteksi gen *cyt b* babi (PRIME-CYTO) yang merupakan kombinasi antara primer *CYTB-Full* perancangan dari [11] dengan *Green Master Mix* untuk PCR konvensional dan qPCR *Master Mix* untuk pengujian dengan Real Time PCR. Besaran spesifisitas menunjukkan proporsi subjek yang negatif menurut standar yang diidentifikasi sebagai negatif benar (*true negative*). Sedangkan sensitivitas ini menunjukkan proporsi subjek yang positif menurut standar yang diidentifikasi sebagai positif benar (*true positive*) [12].

Selain dilakukan menggunakan metode PCR konvensional, deteksi gen *cyt b* babi dapat dilakukan juga menggunakan metode *real-time* Polymerase Chain Reaction (*real-time* PCR), primer *CYTB-Full* ini dikombinasikan dengan qPCR *Master Mix*. Salah satu keunggulan metode *real-time* PCR, DNA yang teramplifikasi dapat diamati secara langsung tanpa perlu dilakukan analisis menggunakan gel elektroforesis [13]. Terdapat beberapa penelitian yang menggunakan metode *real-time* PCR untuk analisis kandungan babi dalam sampel produk industri ([13]; [14]; [15]; dan [16]). Dalam penelitian [16] metode *real-time* PCR spesifik terhadap gen *cyt b* babi, serta memiliki batas deteksi absolut sebesar 0,05 ng/ μ L. *real-time* PCR digunakan pula untuk menguji banyak sampel dengan waktu yang singkat pada penelitian [14].

Berdasarkan pemaparan di atas, dilakukan penentuan sensitivitas dan spesifisitas kit deteksi kandungan babi PRIME-CYTO yang merupakan kombinasi antara primer *CYTB-Full* dengan *Green Master Mix* (untuk PCR konvensional) dan qPCR *Master Mix* (untuk *real-time* PCR).

2 Bahan dan Metode

2.1 Alat dan Bahan

Persiapan alat dalam penelitian ini meliputi alat gelas dan alat instrumen, yakni gelas kimia, gelas ukur, mortar dan alu, spatula, neraca analitik, lemari pendingin, *stopwatch*, *microwave*,

Quantus™ Fluorometer, *microcentrifuge tube* 1,5 mL, PCR tube 0,5 mL, vortex, sentrifuge, mikropipet, tip, *comb* elektroforesis, *tray* elektroforesis, tangki elektroforesis, UV *transilluminator*, mesin PCR (miniPCR), Mesin *real-time* PCR (MyGo Pro), serta *Bio Safety Cabinet level 2*.

Pada penelitian ini, bahan yang digunakan adalah daging babi, daging sapi, daging ayam, sosis sapi, sosis ayam, sosis babi, Wizard® *Genomic DNA Purification Kit* (Promega), Primer *Forward* dan *Reverse* CYTB-Full, aquades, agarosa bubuk, larutan *buffer* TAE 1X, etanol 70%, isopropanol, pewarna DNA *blue/orange loading dye*, *Diamond Nucleic Acid Dye*, DNA ladder 1 kb, kertas parafilm, GoTaq® *Green Master Mix*, GoTaq® *qPCR Master Mix*, QuantiFluor® ONE dsDNA *Dye*, QuantiFluor® ONE *Lambda DNA Standard* (400 µg/mL), *nuclease free water*, tisu, label, masker, dan sarung tangan lateks.

2.2 Metode

Isolasi DNA Sampel

Sebanyak 100 mg sampel dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 mL serta ditambah 600 µL *nuclei lysis solution*, lalu dihomogenkan dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 65°C. Sampel yang telah diinkubasi ditambahkan 3 µL larutan RNase dan dihomogenkan dengan cara dibolak-balik selama 3 menit. Sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Sampel didiamkan sampai mencapai suhu kamar. Masing-masing *tube* sampel ditambahkan 200 µL *protein precipitation solution* lalu dihomogenkan menggunakan vortex selama 20 detik. Sentrifugasi pada 13.000 rpm selama 4 menit. Supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke *tube microcentrifuge* 1,5 mL bersih yang sebelumnya sudah diisi dengan isopropanol sebanyak 600 µL. Tabung disentrifugasi selama 1 menit pada suhu kamar dengan kecepatan 13.000 rpm. Supernatan dari tabung dibuang dengan hati-hati lalu *pellet* yang terdapat di dasar *tube* ditambahkan 600 µL etanol 70%. Sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13.000 rpm pada suhu kamar. Ambil etanol dari *tube* dengan hati-hati, sisa etanol dikeringkan dengan cara membalikkan *tube* di atas tisu bersih. *Pellet* dikeringkan di udara selama 15 menit. Kemudian tambahkan 100 µL DNA *Rehydration Solution* dan inkubasi pada 4°C semalaman. Isolat DNA disimpan pada suhu 2-8°C.

Karakterisasi Isolat DNA Menggunakan Elektroforesis

Sebanyak 0,5 g serbuk agarosa ditimbang dalam gelas kimia. Kemudian ditambahkan 50 mL larutan *buffer* TAE 1x, lalu dipanaskan dengan *microwave* selama 2 menit sampai padatan agarosa larut dan bening. Larutan agarosa yang sudah larut sempurna kemudian didiamkan di suhu ruang sampai suhu ± 60°C. *Tray* dan *comb* dibersihkan terlebih dahulu menggunakan larutan etanol 70%. Larutan agarosa dituangkan ke dalam *tray*, lalu dipasang *comb* untuk pembentukan 'sumur' pada gel agarosa. Gel dibiarkan hingga mengeras (25-30 menit), kemudian lepas *comb* secara perlahan.

Tray yang berisi gel agarosa ditempatkan dalam tangki elektroforesis. Larutan *buffer* TAE 1x dimasukkan ke dalam tangki setinggi ± 1 mm di atas permukaan gel atau sampai permukaan gel tenggelam. Sebanyak 5 µL DNA hasil isolasi diletakkan di atas kertas parafilm dan dicampur dengan 1 µL *blue/orange loading dye* lalu dihomogenkan. Kemudian, campuran larutan dimasukkan ke dalam 'sumur' gel agarosa, setiap sumur berisi larutan DNA hasil isolasi. Selanjutnya, dimasukkan sebanyak 5 µL DNA ladder 1 kb ke dalam salah satu 'sumur' gel agarosa. Setelah semua 'sumur' terisi, tangki elektroforesis ditutup. Pada proses karakterisasi ini digunakan gel agarosa 1% menggunakan buffer Tris Asetat EDTA (TAE) 1X pada tegangan 100 V selama 25 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, padamkan listrik dan *tray*

dikeluarkan dari tangki elektroforesis. Lakukan pewarnaan gel dengan 7,5 μ L DNA *Diamond Nucleic Acid Dye* menggunakan 75 mL *buffer* TAE 1X dengan proses perendaman selama satu jam. Selanjutnya elektroforegram divisualisasi menggunakan alat *UV transilluminator* kemudian didokumentasikan.

Penentuan Konsentrasi Isolat DNA

Pengukuran konsentrasi DNA sampel daging babi dilakukan menggunakan *Quantus™ Fluorometer*. Sebelum melakukan pengukuran konsentrasi sampel, alat dikalibrasi dengan larutan blanko yang berisi 200 μ L *QuantiFluor® ONE dsDNA Dye* dalam *PCR tube* 0,5 mL. Selanjutnya, alat distandarisasi dengan 200 μ L *QuantiFluor® ONE dsDNA Dye* dan 1 μ L *QuantiFluor® ONE Lambda DNA Standard* (400 μ g/mL). Kemudian sampel sebanyak 2 μ L dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 0,5 mL yang sebelumnya sudah diisi dengan 200 μ L *QuantiFluor® ONE dsDNA Dye*.

Penentuan Batas Deteksi

Pada penentuan batas deteksi, isolat DNA sampel diencerkan dengan aquadest pada faktor pengenceran sebesar 10, 100, 1.000, 10.000 untuk penentuan sensitivitas dan batas deteksi. Selanjutnya lakukan lagi pengenceran pada batas deteksi yang didapatkan dari pengenceran sebelumnya dengan variasi konsentrasi yang lebih rapat. Perbanyak seri pengenceran ini dapat meningkatkan ketelitian batas deteksi.

Analisis Sampel dengan PCR Konvensional

Dibuat komposisi untuk 25 μ L reaksi PCR yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Persiapan komponen PCR konvensional

Komponen	Volume (μ l)
<i>Nuclease Free Water</i>	7,5
<i>GoTaq® Green Master Mix</i>	12,5
<i>Primer Reverse</i> 100 μ M	1,25
<i>Primer Forward</i> 100 μ M	1,25
<i>DNA Template</i>	2,5
Volume Total	25

Komponen yang telah dicampur kemudian ditempatkan dalam alat PCR konvensional lalu proses PCR dijalankan dengan menggunakan program berdasarkan literatur [11]. Program PCR ini dijalankan sebanyak 30 siklus yang meliputi tahap denaturasi, *annealing*, dan elongasi. Pengaturan untuk program PCR disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Pengaturan program PCR konvensional

Tahapan	Suhu ($^{\circ}$ C)	Waktu (s)
Pra-Denaturasi	93	180
Denaturasi	93	60
<i>Annealing</i>	46	30
Elongasi	72	90
Elongasi Final	72	180

<i>Number of cycles 30</i>

Identifikasi hasil PCR konvensional dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%, lalu didokumentasikan.

Analisis Sampel dengan *Real-time* PCR

Komposisi untuk *real-time* PCR disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Persiapan komponen *real-time* PCR

Komponen	Volume (μ l)
GoTaq [®] qPCR Master Mix	10
Primer Reverse 100 μ M	0,5
Primer Forward 100 μ M	0,5
Nuclease Free Water	9,0
Volume Total	20

Kemudian tambahkan 2,5 DNA *template*. *Well* ditutup menggunakan *sealing plastic* atau *caps* untuk PCR *tube*, kemudian *spin down* untuk menurunkan larutan di bawah *tube*. *Well* PCR *tube* dimasukkan ke dalam mesin *real-time* PCR dan atur penamaan sampel serta semua parameter yang diperlukan. Pengaturan program *real-time* PCR dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaturan program *real-time* PCR

Tahapan	Suhu ($^{\circ}$ C)	Waktu (s)
GoTaq [®] Hot Start Polymerase activation	95	120
Denaturasi	95	15
Annealing- extention	60	60
<i>Number of cycles 40</i>		

3 Hasil dan Pembahasan

Isolasi DNA Sampel

Isolasi DNA adalah serangkaian proses yang dilakukan untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel seperti lipid, protein, dan RNA [17]. Isolasi DNA bertujuan untuk mengambil DNA dari sampel yang dituju. Pada penelitian ini, dilakukan isolasi DNA pada sampel daging dan sosis dari sapi, ayam, dan babi. Pemilihan jenis sampel berupa daging dilakukan karena jumlah mitokondria yang terdapat pada jaringan otot lebih banyak daripada jaringan yang lain. Otot merupakan komponen utama dalam daging. Besarnya jumlah mitokondria pada otot berkaitan dengan tingkat aktivitas gerak pada jaringan otot yang lebih tinggi daripada jaringan lainnya karena diperlukan suplai energi yang besar. Suplai energi yang besar ini mampu disokong oleh jumlah mitokondria yang banyak. Jumlah mitokondria yang banyak dapat mempermudah proses isolasi DNA [18].

Prinsip dalam proses isolasi DNA meliputi proses lisis pada sel, ekstraksi, dan pengendapan [19]. Seiring dengan perkembangan teknologi, saat ini sudah beredar berbagai kit pengisolasi DNA, di antaranya pada penelitian ini digunakan kit komersial Wizard[®] Genomic DNA

Purification Kit (Promega). Wizard® *Genomic DNA Purification Kit* (Promega) yang digunakan memiliki prinsip *salting out* (penambahan garam), yaitu dapat mengganggu ikatan hidrogen molekul DNA [20].

Dalam penelitian ini, jenis sampel yang digunakan adalah daging sapi, daging ayam, daging babi, sosis sapi, sosis ayam, dan sosis babi. Daging yang akan diisolasi dihaluskan terlebih dahulu untuk memperkecil ukuran serta membantu proses penghancuran jaringan sel dan lisis. Proses lisis kemudian dilanjutkan dengan penambahan larutan *nuclei lysis solution* yang berfungsi untuk menghancurkan membran nukleus sel, sehingga DNA keluar dari dalam inti sel.

Selanjutnya, dilakukan penambahan RNase yang bertujuan untuk mempercepat proses penghilangan RNA yang terkandung di dalam sampel. RNase merupakan enzim yang memiliki sifat menghidrolisis ikatan diester yang menghubungkan residu fosfat dan ribosa. Aktivasi RNase ini terjadi pada suhu 37°C [21].

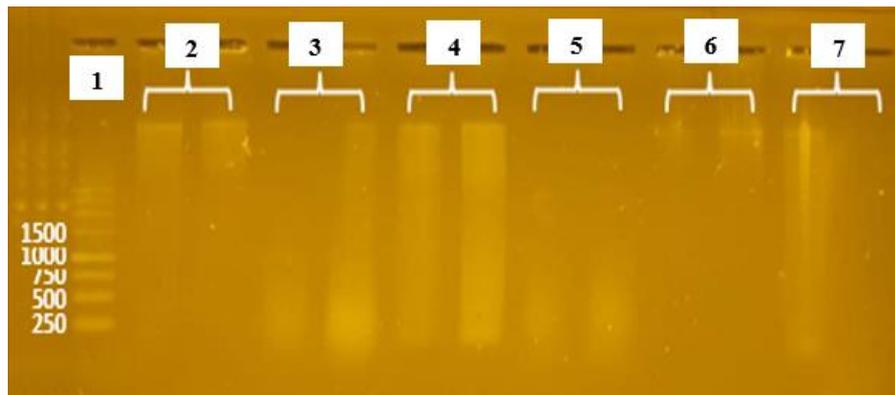
Kemudian, dilakukan penambahan *protein precipitation solution*. Larutan ini berfungsi untuk mengendapkan dan memisahkan senyawa protein [20]. Lalu, dilakukan sentrifugasi yang memiliki prinsip memisahkan molekul berdasarkan massa jenisnya. Pemisahan ini menghasilkan dua bagian pada tabung sentrifugasi di antaranya supernatan dan *pellet*. Supernatan merupakan bagian yang berada di atas dan berbentuk cairan, sedangkan *pellet* merupakan endapan yang terdapat pada dasar tabung sentrifugasi [22]. Pada proses ini, DNA berada dalam bentuk supernatan, sedangkan *pellet* merupakan kumpulan dari lemak, protein, dan senyawa lain yang ada di dalam sel.

Tahap selanjutnya, dilakukan proses pengendapan DNA. Proses ini dilakukan dengan cara penambahan larutan isopropanol yang berfungsi untuk menarik air dan membentuk *pellet* DNA. Proses pengendapan ini terjadi karena fenomena penurunan kelarutan DNA di dalam air. Muatan positif yang terdapat pada air berikatan secara kuat dengan muatan negatif yang terdapat pada gugus fosfat DNA sehingga DNA larut dalam air, sedangkan isopropanol lebih tidak polar bila dibandingkan dengan air, maka molekul isopropanol tidak dapat berikatan dengan gugus fosfat DNA. Hal ini menyebabkan isopropanol tidak dapat melarutkan DNA [23]. Kemudian, dilakukan sentrifugasi dan menghasilkan dua bagian pada tabung *centrifuge*, yaitu supernatan dan *pellet*. Pada proses ini, DNA terpisah menjadi *pellet*.

Supernatan dibuang, kemudian *pellet* DNA dimurnikan dengan menggunakan larutan etanol 70%. Setelah disentrifugasi dan dikeringkan, *pellet* DNA kemudian dihidrasi dengan DNA *rehydration Solution*. Isolat DNA disimpan pada suhu 4°C untuk selanjutnya dikarakterisasi dengan menggunakan elektroforesis.

Karakterisasi Isolat DNA Menggunakan Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik analisis pemisahan DNA atau protein berdasarkan pergerakan molekul-molekul bermuatan di dalam suatu medan listrik. Pergerakan molekul pada medan listrik dipengaruhi oleh ukuran, bentuk, dan besar muatan dari molekul DNA atau protein. Pada analisis ini digunakan *marker* atau penanda untuk mengetahui ukuran DNA hasil amplifikasi. *Marker* yang digunakan, yaitu BenchTop 1 kb DNA *Ladder*. *Marker* ini merupakan fragmen DNA yang ukurannya telah diketahui dengan jelas, yaitu 1 kb (kilobase) dengan ukuran pita yang dihasilkan berkisar 100 – 10.000 bp (*base pair*).



Gambar 1. Elektroforegram DNA hasil isolasi.

Keterangan:

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 1. Marker (1kb) | 5. DNA Sosis Ayam |
| 2. DNA Daging Sapi | 6. DNA Daging Babi |
| 3. DNA Sosis Sapi | 7. DNA Sosis Babi |
| 4. DNA Daging Ayam | |

Elektroforegram hasil isolasi DNA (Gambar 1) menunjukkan terdapat pita-pita DNA, namun beberapa masih tampak *smear*. Pada daging sapi, daging ayam, dan daging babi diperoleh kedua hasil isolasi menghasilkan pita DNA yang cukup jelas. Sedangkan pada hasil isolasi sosis sapi dan sosis babi pita hanya muncul di salah satu hasil isolasi. Pada sosis ayam, tidak terbentuk pita yang jelas. Keseluruhan hasil elektroforesis ini menghasilkan pita yang *smear*. Pita *smear* dihasilkan karena terdapat residu dari senyawa lain yang masih terbawa selama proses isolasi. Pita pada elektroforegram ini menunjukkan bahwa isolasi DNA dari daging dan sosis sudah berhasil [24].

Penentuan Konsentrasi Isolat DNA

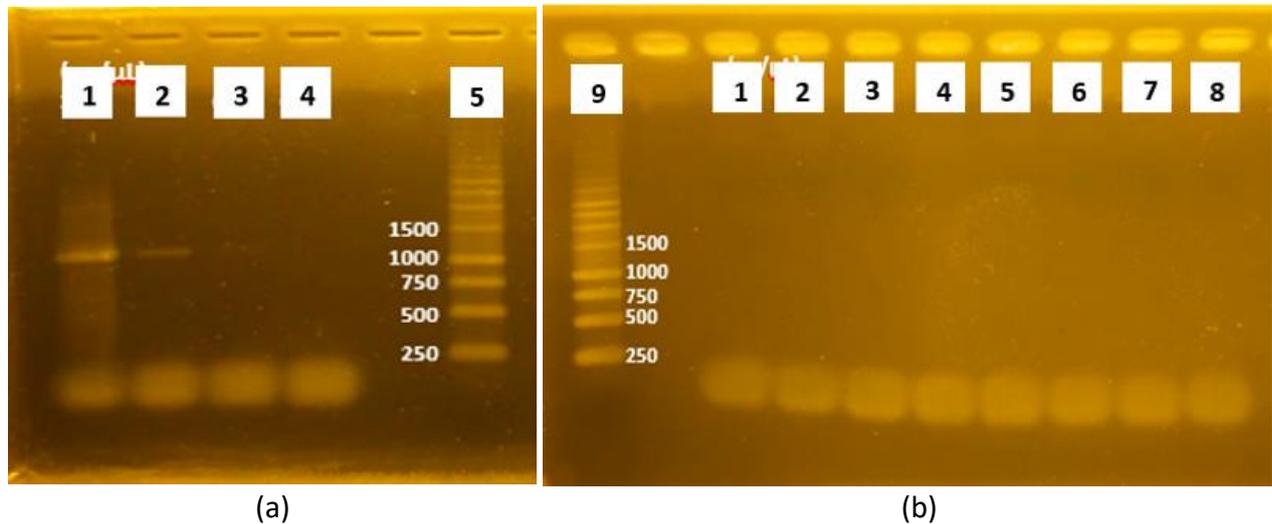
Penentuan konsentrasi DNA dilakukan menggunakan Quantus™ *Fluorometer*. Metode ini sangat sensitif, memberikan deteksi biomolekuler pada sensitivitas hingga 0,0005 nanogram per mikroliter (ng/μL). Fluorometri juga memberikan deteksi eksklusif untuk analit yang diinginkan, menghilangkan ketidakakuratan pengukuran yang disebabkan oleh kontaminan atau elemen yang tidak diketahui dalam sampel. Konsentrasi yang tidak diketahui kemudian dapat dikuantifikasi secara matematis terhadap intensitas fluoresens dari biomolekul [25]. Hasil dari penentuan konsentrasi DNA menggunakan Quantus™ *Fluorometer* ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil penentuan konsentrasi DNA menggunakan Quantus™ *Fluorometer*

No.	Jenis Sampel	Konsentrasi (ng/μL)
1	Daging Sapi	78
2	Sosis Sapi	26
3	Daging Ayam	114
4	Sosis Ayam	27
5	Daging Babi	30
6	Sosis Babi	100

Penentuan Batas Deteksi

Penentuan batas deteksi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terkecil DNA yang dapat terdeteksi oleh kit. Penentuan batas deteksi ini dilakukan terhadap sampel daging babi dan sosis babi. Langkah pertama, dilakukan terlebih dahulu pengenceran pada sampel daging babi dengan variasi konsentrasi 30; 3; 0,3; dan 0,03 ng/ μ L. Tujuan dari pengenceran ini, yaitu untuk mengurangi jumlah kandungan DNA secara bertahap dalam sampel dari variasi konsentrasi yang telah dibuat sehingga dapat diketahui konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi.



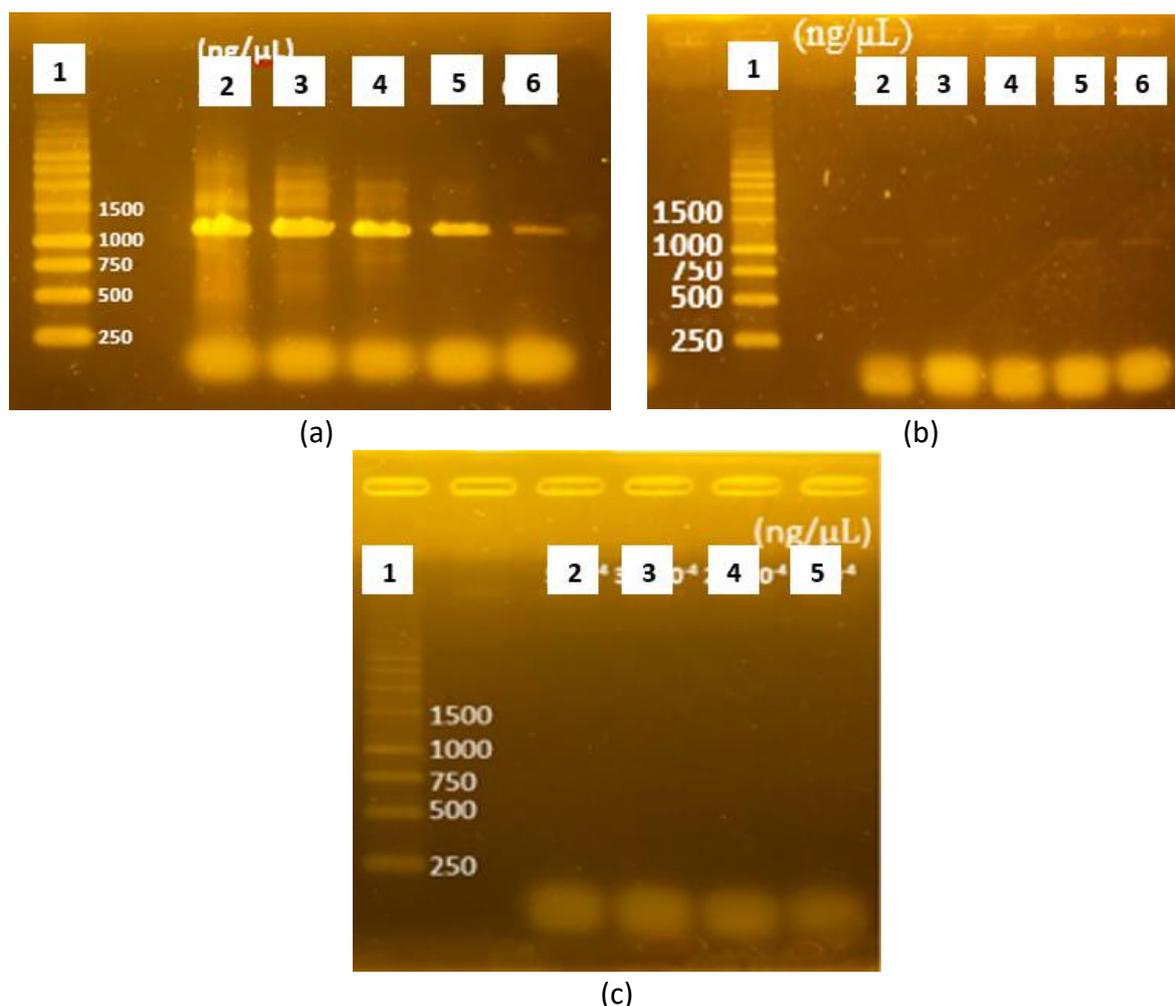
Gambar 2. Deret pengenceran batas deteksi pada isolat DNA dari daging babi (a) pertama, (b) kedua

Keterangan:

(a) Pengenceran pertama (ng/ μ L)	(b) Pengenceran kedua (ng/ μ L)
1. 30	1. 2
2. 3	6. 0,6
3. 0,3	2. 1
4. 0,03	7. 0,5
5. <i>Marker</i> 1kb	3. 0,9
	8. 0,4
	4. 0,8
	9. <i>Marker</i> 1kb
	5. 0,7

Berdasarkan elektroforegram pada Gambar 2. (a), pita pengenceran isolat DNA daging babi hanya muncul pada konsentrasi 30 dan 3 ng/ μ L. Untuk meningkatkan ketelitian batas deteksi dari kit ini, dilakukan pengenceran kembali dengan variasi konsentrasi yang dibuat, yaitu 2; 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; dan 0,4 ng/ μ L. Berdasarkan Gambar 2. (b), pada seluruh deret konsentrasi tidak terbentuk pita DNA. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa kit PRIME-CYTO menggunakan PCR konvensional sensitif mendeteksi kandungan gen *cyt b* babi dalam isolat DNA daging babi hingga konsentrasi 3 ng/ μ L.

Selanjutnya, pada isolat DNA sosis babi dilakukan pengenceran dengan variasi konsentrasi 100; 10; 1; 0,1; dan 0,01 ng/ μ L.



Gambar 3. Deret pengenceran batas deteksi pada isolat DNA dari sosis babi (a) pertama, (b) kedua, dan (c) ketiga

Keterangan:

(a) Pengenceran pertama (ng/μL)	(b) Pengenceran kedua (ng/μL)	(c) Pengenceran ketiga (ng/μL)
1. <i>Marker</i> 1kb	1. <i>Marker</i> 1kb	1. <i>Marker</i> 1kb
2. 100	2. 10^{-3}	2. $5 \cdot 10^{-4}$
3. 10	3. 10^{-4}	3. $3,3 \cdot 10^{-4}$
4. 1	4. 10^{-5}	4. $2,5 \cdot 10^{-4}$
5. 0,1	5. 10^{-6}	5. $2 \cdot 10^{-4}$
6. 0,01	6. 10^{-7}	

Dari Gambar 3. (a), pita DNA masih terbentuk dengan jelas pada isolat DNA sosis babi konsentrasi 0,01 ng/μL. Dari hasil tersebut, maka dapat dilakukan peningkatan ketelitian batas deteksi dengan cara dilakukan pengenceran kembali pada isolat DNA sosis babi dengan variasi konsentrasi, yaitu 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ng/μL. Berdasarkan Gambar 3. (b), pita DNA hanya terbentuk semakin tipis pada konsentrasi 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-6} , dan 10^{-7} ng/μL. Dari hasil tersebut juga menunjukkan bahwa semakin kecil konsentrasi DNA yang telah diamplifikasi,

maka pita yang terbentuk akan semakin tipis. Pada konsentrasi 10^{-5} ng/ μ L, tidak terbentuk pita. Hal ini diduga adanya ketidakstabilan hasil PCR pada konsentrasi yang semakin kecil. Oleh karena itu, untuk memastikan kembali konsentrasi terkecil yang dapat terdeteksi oleh kit PRIME-CYTO secara akurat, dilakukan pengenceran lebih lanjut pada deret konsentrasi $5 \cdot 10^{-4}$; $3,3 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-4}$; dan $2 \cdot 10^{-4}$ ng/ μ L. Berdasarkan elektroforegram pada Gambar 3. (c), dapat dilihat bahwa pita DNA tidak terbentuk pada seluruh variasi konsentrasi. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa kit PRIME-CYTO hanya sensitif dan stabil mendeteksi kandungan gen *cyt b* babi dalam isolat DNA sosis babi minimal pada konsentrasi 10^{-3} ng/ μ L. Pada konsentrasi DNA di bawah 10^{-3} ng/ μ L, hasil yang didapatkan kurang stabil.

Analisis Sampel dengan PCR Konvensional

Penentuan sensitivitas dengan PCR konvensional dilakukan untuk memastikan bahwa kit PRIME-CYTO yang merupakan kombinasi antara primer *CYTB-Full* dan *Green Master Mix* dapat mengamplifikasi gen *cyt b* babi atau tidak.

Penentuan spesifisitas dilakukan untuk mengetahui bahwa kit PRIME-CYTO ini hanya dapat mengamplifikasi gen *cyt b* babi saja. Primer *CYTB-Full* yang digunakan adalah dari gen penyandi *cyt b*. Gen ini merupakan salah satu gen penyandi dari 37 jenis gen penyandi yang terdapat pada mitokondria [19]. Gen *cyt b* ini memiliki bagian konsisten pada tiap spesies, sehingga gen ini dapat digunakan untuk membedakan atau mengelompokkan spesies hewan [7]. Hasil penentuan sensitivitas dan spesifisitas kit PRIME-CYTO dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Elektroforegram analisis hasil PCR konvensional pada berbagai isolat DNA.

Keterangan:

- | | |
|------------------------|--------------------|
| 1. <i>Marker</i> (1kb) | 5. DNA Sosis Ayam |
| 2. DNA Daging Sapi | 6. DNA Daging Babi |
| 3. DNA Sosis Sapi | 7. DNA Sosis Babi |
| 4. DNA Daging Ayam | |

Berdasarkan hasil elektroforegram (Gambar 4), hanya isolat DNA dari daging babi dan sosis babi yang menunjukkan pita ukuran 1140 bp. Ukuran ini sesuai dengan ukuran gen *cyt b* dari babi. Hal ini menunjukkan bahwa secara kualitatif kit ini sensitif terhadap gen *cyt b* babi. Sementara itu, pada isolat DNA dari daging sapi, sosis sapi, daging ayam, sosis ayam, dan air tidak terbentuk pita *cyt b* babi. Oleh karena itu, secara kualitatif kit ini hanya spesifik mengamplifikasi gen *cyt b* babi saja.

Penentuan sensitivitas dan spesifisitas kemudian dilanjutkan secara kuantitatif. Didapatkan 76 data yang dihasilkan dari PCR konvensional. Data tersebut dimuat ke dalam tabel 2x2 untuk menentukan persentase tingkat sensitivitas dan spesifisitas kit yang ditampilkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Tabel 2x2 pengukuran sensitivitas dan spesifisitas PCR konvensional

	Standar Emas		Total
	Positif	Negatif	
Hasil Tes			
Positif	33 (<i>True positive</i>)	0 (<i>False positive</i>)	33 (Total hasil positif)
Negatif	0 (<i>False negative</i>)	43 (<i>True negative</i>)	43 (Total hasil negatif)
Total	33 (Total sampel positif)	43 (Total sampel negatif)	76

Pada pengukuran sensitivitas dan spesifisitas dengan PCR konvensional, jumlah sampel yang digunakan yaitu sebanyak 76 sampel. Berdasarkan Tabel 6, terdapat total 33 sampel positif dan 43 sampel negatif. Sampel positif adalah sampel yang teridentifikasi sebagai *true positive* dan *false negative*, sedangkan sampel negatif adalah sampel yang teridentifikasi sebagai *true negative* dan *false positive*. Total sampel positif yang diperoleh digunakan dalam penentuan nilai sensitivitas, sedangkan total sampel negatif digunakan dalam penentuan nilai spesifisitas.

Sensitivitas digambarkan sebagai kemampuan untuk secara tepat mendeteksi sejumlah kecil zat [26]. Sensitivitas ini menunjukkan proporsi subjek yang positif menurut standar yang diidentifikasi sebagai positif benar (*true positive*) [12]. Sensitivitas dapat dihitung menggunakan persamaan 1:

$$Sensitivitas = \frac{True\ Positive}{True\ Positive + False\ Negative} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

[27]

Persentase sensitivitas dihitung menggunakan persamaan 1. Berikut merupakan perhitungan sensitivitas pada PCR konvensional:

$$Sensitivitas = \frac{True\ Positive}{True\ Positive + False\ Negative} \times 100\%$$

$$Sensitivitas = \frac{33}{33 + 0} \times 100\%$$

$$Sensitivitas = 100\%$$

True positive merupakan sampel dengan standar emas dan hasil tes positif. Dalam hal ini, *true positive* berarti bahwa berdasarkan teori sampel tersebut harus menunjukkan hasil yang positif dan terbukti positif. Dalam penelitian ini terdapat 33 sampel yang dinyatakan sebagai *true positive*, meliputi sampel-sampel yang mengandung gen *cyt b* babi, di antaranya yaitu sampel daging babi dan sosis babi. Sedangkan *false negative* merupakan sampel yang dinyatakan sebagai positif oleh standar emas, namun hasil tes yang didapatkan negatif. Dalam

penelitian ini, tidak ada sampel yang ditanyakan *false negative*. Oleh karena itu, nilai sensitivitas untuk kit PRIME-CYTO dengan PCR konvensional adalah 100%.

Spesifisitas menunjukkan proporsi subjek yang negatif menurut standar yang diidentifikasi sebagai negatif benar (*true negative*) [12]. Spesifisitas dapat dihitung menggunakan persamaan 2:

$$\text{Spesifisitas} = \frac{\text{True Negative}}{\text{True Negative} + \text{False Positive}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

[27]

Persentase spesifisitas dihitung menggunakan persamaan 2. Berikut merupakan perhitungan spesifisitas pada PCR konvensional:

$$\begin{aligned} \text{Spesifisitas} &= \frac{\text{True Negative}}{\text{True Negative} + \text{False Positive}} \times 100\% \\ \text{Spesifisitas} &= \frac{43}{43 + 0} \times 100\% \\ \text{Spesifisitas} &= 100\% \end{aligned}$$

True negative merupakan sampel dengan standar emas dan hasil tes negatif. Dalam hal ini, *true negative* berarti berdasarkan teori sampel tersebut harus menunjukkan hasil yang negatif dan terbukti negatif. Berdasarkan Tabel 6, terdapat 43 sampel yang dinyatakan sebagai *true negative* meliputi sampel dari daging sapi, sosis sapi, daging ayam, sosis ayam, dan air. Sedangkan untuk *false positive* merupakan sampel yang dinyatakan sebagai negatif oleh standar emas, namun hasil tes yang didapatkan positif. Dalam penelitian ini, tidak terdapat sampel yang dinyatakan sebagai *false positive*. Oleh karena itu, nilai spesifisitas untuk kit PRIME-CYTO dengan PCR konvensional adalah 100%.

Sensitivitas dan spesifisitas yang baik adalah yang nilainya mendekati 100%. Secara statistik, semakin banyak jumlah pengujian yang dilakukan, maka semakin tinggi tingkat kepercayaan yang diperoleh [28].

Terdapat beberapa sampel yang mengalami kontaminasi. Sampel-sampel ini tidak dapat dihitung ke dalam perhitungan sensitivitas maupun spesifisitas karena kontaminasi bukan merupakan kesalahan dari kit PRIME-CYTO maupun alat PCR. Terdapat beberapa sumber umum kontaminasi mulai dari kontaminasi di permukaan peralatan hingga penanganan sampel yang kurang steril serta terbebas dari DNA lain [29].

Analisis Sampel dengan *Real-time* PCR

Penentuan sensitivitas secara *real-time* PCR dilakukan untuk memastikan bahwa kit PRIME-CYTO yang merupakan kombinasi antara primer CYTB-Full dan qPCR *Master Mix* ini dapat mengamplifikasi gen *cyt b* babi atau tidak. Sedangkan penentuan spesifisitas dilakukan untuk memastikan bahwa kit ini hanya dapat mengamplifikasi gen *cyt b* babi saja. Untuk menentukan persentase sensitivitas dan spesifisitas tersebut, digunakan tabel 2x2 yang ditunjukkan dengan Tabel 7.

Tabel 7. Tabel 2x2 pengukuran sensitivitas dan spesifisitas *real-time* PCR

	Standar Emas		Total	
	Positif	Negatif		
Hasil Tes	Positif	22 (<i>True positive</i>)	37 (<i>False positive</i>)	59 (Total hasil positif)
	Negatif	4 (<i>False negative</i>)	4 (<i>True negative</i>)	8 (Total hasil negatif)
Total		26 (Total sampel positif)	41 (Total sampel negatif)	67

Pada pengukuran sensitivitas dan spesifisitas dengan *real-time* PCR, jumlah sampel yang digunakan yaitu sebanyak 67 sampel. Berdasarkan Tabel 7, terdapat total 26 sampel positif dan 41 sampel negatif. Sampel positif adalah sampel yang teridentifikasi sebagai *true positive* dan *false negative*, sedangkan sampel negatif adalah sampel yang teridentifikasi sebagai *true negative* dan *false positive*. Total sampel positif yang diperoleh digunakan dalam penentuan nilai sensitivitas, sedangkan total sampel negatif digunakan dalam penentuan nilai spesifisitas.

Persentase sensitivitas dihitung menggunakan persamaan 1. Berikut merupakan perhitungan sensitivitas pada *real-time* PCR:

$$\begin{aligned} \text{Sensitivitas} &= \frac{\text{True Positive}}{\text{True Positive} + \text{False Negative}} \times 100\% \\ \text{Sensitivitas} &= \frac{22}{22 + 4} \times 100\% \\ \text{Sensitivitas} &= 85\% \end{aligned}$$

True positive merupakan sampel dengan standar emas dan hasil tes positif. Dalam penelitian ini, terdapat 22 sampel yang dinyatakan sebagai *true positive* mengandung gen *cyt b* babi, di antaranya yaitu sampel daging babi dan sosis babi. Sedangkan *false negative* merupakan sampel yang dinyatakan sebagai positif oleh standar emas, namun hasil tes yang didapatkan negatif. Dalam penelitian ini, sampel yang dinyatakan *false negative* terdapat sebanyak 4 sampel. Oleh karena itu, diperoleh nilai sensitivitas untuk kit PRIME-CYTO dengan *real-time* PCR adalah 85%.

Persentase spesifisitas dihitung menggunakan persamaan 2. Berikut merupakan perhitungan spesifisitas pada *real-time* PCR:

$$\begin{aligned} \text{Spesifisitas} &= \frac{\text{True Negative}}{\text{True Negative} + \text{False Positive}} \times 100\% \\ \text{Spesifisitas} &= \frac{4}{4 + 37} \times 100\% \\ \text{Spesifisitas} &= 10\% \end{aligned}$$

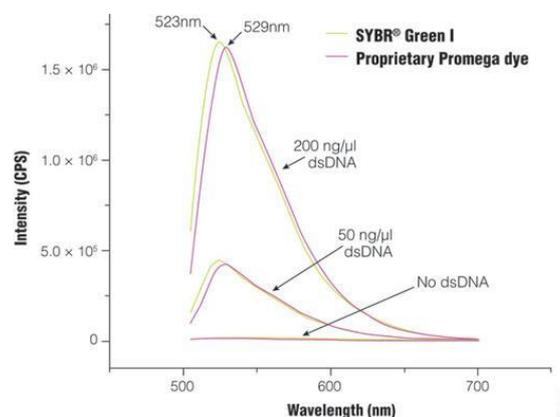
True negative merupakan sampel dengan standar emas dan hasil tes negatif. Dalam penelitian ini, terdapat 4 sampel yang dinyatakan sebagai *true negative* meliputi sampel dari daging sapi, sosis sapi, daging ayam, sosis ayam, air, dan pereaksi tanpa DNA *template*. Sedangkan untuk *false positive* merupakan sampel yang dinyatakan sebagai negatif oleh standar emas, namun

hasil tes yang didapatkan positif. Dalam penelitian ini, terdapat 37 sampel yang dinyatakan *false positive* meliputi sampel dari daging sapi, sosis sapi, daging ayam, sosis ayam, air, dan pereaksi tanpa DNA *template*. Oleh karena itu, nilai spesifisitas untuk kit PRIME-CYTO dengan PCR konvensional adalah 10%.

Berdasarkan uraian di atas, walaupun sensitivitas kit PRIME-CYTO menggunakan *real-time* PCR ini cukup besar yakni 85% tetapi nilai spesifisitas dari kit ini hanya sebesar 10%. Artinya, kit PRIME-CYTO menggunakan *real-time* PCR ini sudah cukup sensitif terhadap gen *cyt b* babi, namun kurang spesifik terhadap gen *cyt b* babi karena sampel-sampel yang seharusnya memiliki hasil pengujian negatif turut terbaca positif.

Terdapat asumsi terkait penyebab kit PRIME-CYTO dengan *real-time* PCR ini kurang spesifik. Asumsi awal terkait rendahnya nilai spesifisitas ini karena adanya kontaminasi gen *cyt b* babi pada kontrol negatif, sampel ayam dan sapi, maupun reagen dari kit PRIME-CYTO mulai dari qPCR *Master Mix*, *nuclease free water*, dan primer. Setelah digunakan reagen-reagen yang baru, hasil *real-time* PCR tetap menunjukkan hasil yang tidak sesuai.

Asumsi lain mengenai kurang spesifiknya kit PRIME-CYTO menggunakan *real-time* PCR ini karena adanya perbedaan antara pewarna dalam *Master Mix* dengan pewarna yang terkalibrasi dalam alat *real-time* PCR. Pewarna SYBR® *Green I* merupakan jenis pewarna yang umum digunakan pada proses *real-time* PCR. Pewarna ini telah terkalibrasi dalam detektor alat *real-time* PCR yang digunakan. Pada penelitian ini pewarna tersebut tidak digunakan, melainkan pewarna lain yang identik dengan pewarna SYBR® *Green I*, yaitu pewarna BRYT™ *Green* yang telah tercampur dalam *Master Mix*. Pewarna ini dikatakan identik dengan pewarna SYBR® *Green I* karena eksitasi dan emisi pewarna serupa dengan SYBR® *Green I* (Gambar 5.), sehingga kompatibel dengan *platform* instrumentasi yang tersedia secara umum. Maka, digunakan pengaturan instrumen yang sama seperti pada penggunaan pewarna SYBR® *Green I*.



Gambar 5. Spektrum fluoresens SYBR® *Green I* dan pewarna Promega eksklusif dalam Campuran GoTaq® qPCR *Master Mix* [30]

Berdasarkan Gambar 5, spektrum emisi fluoresens SYBR® *Green I* dan Promega BRYT™ *Green* tanpa adanya dsDNA dan dengan adanya 50ng/µL atau 200ng/µL dsDNA. Panjang gelombang emisi puncak adalah 523 nm untuk SYBR® *Green I* dan 529 nm untuk BRYT™ *Green*.

Ada sedikit perbedaan antara pewarna SYBR® *Green I* dan pewarna BRYT™ *Green*, yaitu pewarna BRYT™ *Green* digunakan pada konsentrasi yang lebih tinggi daripada SYBR® *Green I* karena lebih sedikit menghambat proses reaksi amplifikasi. Sehingga, konsentrasi pewarna dalam *Master Mix* dioptimalkan untuk menghasilkan fluoresens yang lebih cerah secara signifikan selama proses *real-time* PCR daripada *Master Mix* yang mengandung SYBR® *Green*

I. *Master Mix* ini dilengkapi dengan pewarna referensi CXR tingkat rendah yang identik dengan pewarna referensi ROX™ [30].

Dilakukan juga percobaan kit PRIME-CYTO pada *real-time* PCR menggunakan pewarna referensi CXR. Dalam alat *real-time* PCR, pewarna yang telah terkalibrasi selain SYBR® *Green* I adalah ROX™ yang identik dengan pewarna referensi CXR. Namun, kontrol negatif yang diuji tetap menunjukkan terjadinya amplifikasi.

Terdapat sebuah forum diskusi yang membahas peristiwa *real-time* PCR yang kurang spesifik dalam laman researchgate.net. Diskusi dimulai dari pertanyaan yang diajukan oleh Jain [31] mengenai kontaminasi yang terjadi pada *real-time* PCR menggunakan kit dengan pewarna SYBR® *Green* I yang kerap terjadi meski telah menggunakan *molecular grade water*, ruang preparasi terpisah, tip berfilter dan steril, mengganti reagen, serta mencuci pipet yang digunakan secara berkala. Hasil yang diperoleh tetap menunjukkan adanya amplifikasi pada sampel *non-template* dengan nilai Ct di antara 23-25. Selain itu, telah dilakukan juga pengenceran konsentrasi primer serta pengecekan *melt curve* untuk memastikan tidak terjadinya primer-dimer. Primer-dimer ini merupakan peristiwa ketika primer yang digunakan akan saling bertaut dan menyebabkan terbentuknya DNA *template*. Dari pertanyaan tersebut, terjadi diskusi antara beberapa user. Berikut merupakan poin-poin hasil diskusi dari forum tersebut:

1. Pergantian primer baru disarankan karena dikhawatirkan terjadi kontaminasi dari primer;
2. Disarankan penggunaan kit yang mengandung *probe* karena dapat meningkatkan spesifisitas lebih baik daripada menggunakan pewarna SYBR® *Green* I;
3. Disarankan juga menggunakan *nuclease free water* yang baru;
4. Terdapat user lain yang mengalami kejadian yang sama.

Dari diskusi tersebut, terdapat salah satu saran bahwa penggunaan kit yang mengandung *probe* pada *real-time* PCR dapat meningkatkan spesifisitas lebih baik daripada menggunakan pewarna SYBR® *Green* I. Perbedaan penggunaan SYBR® *Green* I dan hidrolisis *probe* adalah pewarna SYBR® *Green* I akan berpendar ketika terinterkalasi dengan untai ganda DNA, sedangkan pada kit yang mengandung *probe*, fluoresens akan berpendar saat *probe* dipisahkan secara fisik melalui hidrolisis oleh aktivitas nuklease. Pada kit yang mengandung *hydrolysis probe* terdapat dua pewarna fluoresens, yaitu *reporter* dan *quencher* [32]. Prinsip kerja penggunaan hidrolisis *probe* dalam *real-time* PCR yaitu sinyal fluoresens akan dieksitasi oleh molekul *reporter* ke molekul *quencher* ketika *probe* belum berkomplemen dengan target. *Probe* akan berkomplemen dengan DNA target saat mencapai suhu *annealing* karena jarak antara dua molekul berdekatan dan proses eksitasi sinyal fluoresens dari *reporter* ke *quencher* terhenti karena jarak kedua molekul berjauhan. DNA polimerase akan memanjangkan DNA target hingga DNA polimerase dan *probe* berdekatan, sehingga 5' nuklease yang terdapat pada DNA polimerase akan menghidrolisis molekul *reporter* lalu dihasilkan emisi sinyal fluoresens yang dapat ditangkap oleh detektor pada alat *real-time* PCR [33]. Metode *real-time* PCR menggunakan kit yang mengandung *hydrolysis probe* lebih spesifik daripada menggunakan pewarna SYBR® *Green* I [32].

Kesimpulan

Batas deteksi kit PRIME-CYTO dengan PCR konvensional adalah sebesar 3 ng/μL pada isolat DNA dari daging babi dan 10⁻³ ng/μL pada isolat DNA sosis babi.

Sensitivitas kit PRIME-CYTO untuk deteksi gen *cyt b* babi dengan metode PCR konvensional dan *real-time* PCR secara berturut-turut adalah sebesar 100% dan 85%. Berdasarkan hasil

tersebut, artinya penggunaan kit PRIME-CYTO baik menggunakan PCR konvensional maupun *real-time* PCR sensitif terhadap DNA gen *cyt b* dari babi.

Spesifisitas kit PRIME-CYTO untuk deteksi gen *cyt b* babi dengan metode PCR konvensional dan *real-time* PCR secara berturut-turut adalah sebesar 100% dan 10%. Berdasarkan hasil tersebut, artinya pada metode PCR konvensional kit PRIME-CYTO spesifik dalam mendeteksi gen *cyt b* babi, sedangkan pada metode *real-time* PCR kit PRIME-CYTO kurang spesifik mendeteksi gen *cyt b* babi.

Referensi

- [1] Aini, "Sertifikasi Halal Produk Pangan di Badan Penyelenggaraan Jaminan Produk Halal (BPJPH)," Institut Pertanian Bogor, Bogor, 2021.
- [2] R. Yuningsih, "Perlindungan Konsumen Dari Dampak Buruk Makanan Tidak Halal Bagi Kesehatan." p. 173, 2010.
- [3] H. S. Bekti *et al.*, "Identifikasi *Taenia solium* secara Mikroskopis pada Peternakan Babi
Microscopic Identification of *Taenia solium* in Pig Farms," Online, 2021.
- [4] W. A. Nadira and Yudha Nurdian, "Efek Neurologis yang Disebabkan oleh Infestasi *Trichinella*." 2017.
- [5] W. C. Anggundari, Auraga Dewantoro, Umi Nuraeni, Bambang Prasetya, and Yopi, "Dukungan Metrologi untuk Metode Deteksi Terkini Kandungan Daging Babi dalam Rangka Jaminan Produk Halal," *PROsiding PPIS*, pp. 259–266, Nov. 2020.
- [6] E. Andriyani, Nor Lutfi Fais, and Siti Muarifah, "Perkembangan Penelitian Metode Deteksi Kandungan Babi untuk Menjamin Kehalalan Produk Pangan Olahan," *Journal of Islamic Studies and Humanities*, vol. 4, no. 1, pp. 104–126, 2019, doi: <http://dx.doi.org/10.21580/jish.41.4888>.
- [7] A. Primasari, "Sensitivitas Gen Sitokrom B (Cyt b) sebagai Marka Spesifik pada Genus *Rattus* dan *Mus* untuk Menjamin Keamanan Pangan Produk Asal Daging," Institut Pertanian Bogor, Bogor, 2011.
- [8] B. R. Glick, Jack J. Pasternak, and Cheryl L. Patten, *Molecular Biotechnology*, 4th ed. Washington, DC: ASM Press, 2010.
- [9] L. K. Theodorus, "Identifikasi Gen Sitokrom B (Cyt B) Babi Hutan pada Kernet Sapi di Yogyakarta dengan Metode Polymerase Chain Reaction (2021)," Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, 2021.
- [10] Y. Erwanto, Abdul Rohman, Mohammad Zainal Abidin, and Dwi Ariyani, "Identifikasi Daging Babi Menggunakan Metode PCR-RFLP Gen Cytochrome B Dan PCR Primer Spesifik Gen Aamelogenin," *AGRITECH*, vol. 32, no. 4, pp. 370–377, Nov. 2012.
- [11] D. D. Astari, Sania Gustiani Dewi, Sinta Setyaningrum, and Bevi Lidya, "Perancangan Primer untuk Deteksi Kandungan Gen Cytochrome b Babi dengan Metode Polymerase Chain Reaction dan Aplikasinya pada Berbagai Produk Industri," *Fullerene Journ. Of Chem*, vol. 6, no. 2, pp. 110–117, 2021, doi: 10.37033/fjc.v6i2.329.

- [12] B. Murti, "Validitas dan Reliabilitas Pengukuran," May 2011.
- [13] T. R. Maulani, H. Susilo, M. Indriati, and A. Suhaemi, "Deteksi Cemarkan DNA Babi Dengan RT-PCR Pada Sosis Tanpa Logo Halal di Kabupaten Pandeglang," *Gorontalo Agriculture Technology Journal*, vol. 3, no. 2, Oct. 2020.
- [14] Widayat, Tri Winarni Agustini, Meiny Suzery, Ahmad Ni'matullah Al-Baari, Sylvia Rahmi Putri, and Kurdianto, "Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sebagai Alat Deteksi DNA Babi dalam Beberapa Produk Non-Pangan," *Indonesian journal of halal*, pp. 26–33, 2019.
- [15] Y. L. Rahmania, Widayat, Tri Winarni Agustini, Meiny Suzery, and Ahmad Ni'matullah Albaari, "Pengukuran Kandungan DNA Babi dalam Berbagai Produk Pangan dengan Metode Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)," *Indonesian Journal of Halal*, pp. 129–133, 2021.
- [16] Mariyani, Sismindari, and Rumiyati, "Validasi Metode Real-Time Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi DNA Babi (*Sus scrofa domestica*) dan Celeng (*Sus barbatus*) pada Sosis Sapi," *Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia*, vol. 6, pp. 3925–3940, Aug. 2021, doi: 10.36418/Syntax-literate.v6i8.3806.
- [17] S. Surzycki, *Basic Techniques in Molecular Biology*. Berlin: Springer, 2000.
- [18] N. Marwayana, "Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA) dari Sampel Jaringan Otot," *Oseana*, vol. XL, pp. 1–9, 2015.
- [19] D. Y. Maulid and M. Nurimala, "DNA Barcoding untuk Autentikasi Produk Ikan Tenggiri (*Scomberomorus* sp)," *Jurnal Akuatika*, vol. VI, no. 2, pp. 154–160, Sep. 2015.
- [20] F. G. Dayanti, A. Djuminar, A. Dermawan, and A. Tantan, "Perbandingan Nilai Pengukuran Kuantitatif Hasil Ekstraksi DNA *Salmonella typhi* Menggunakan Metode Bioling, NaOH, Kit Komersial," *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, vol. 11, no. 1, pp. 350–357, 2019.
- [21] J. Sambrook and David W. Russell, *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 3rd ed., vol. 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
- [22] Pendidikanmu, "Materi Centrifuge," *pendidikanmu.com*, 2022. <https://pendidikanmu.com/2022/02/centrifuge-adalah.html> (accessed Jun. 18, 2022).
- [23] G. R. Aristya, A. Agriansyah, and B. S. Daryono, "Deteksi dan Skrining Pewarisan Sifat Ketahanan Penyakit Powdery Mildew pada Generasi Backcross Tanaman Melon (*Cucumis melo* L.) Var Tacapa," Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2013.
- [24] Y. Mulyani, A. Purwanto, and I. Nurruhwati, "Perbandingan Beberapa Metode Isolasi DNA untuk Deteksi Dini Koi Herpes Virus (KHV) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)," 2011.
- [25] G. Haryanto, "Probe Optik Untuk Mengukur Konsentrasi Fitoplankton, Studi Kasus *Scenedesmus* sp," 2008.

- [26] G. J. Vilijoen, Louis H. Neland, and John R. Croowther, *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Dordrecht: Springer, 2005.
- [27] A. K. Akobeng and A. K. Akobeng, "Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values", doi: 10.1111/j.1651-2227.2006.00180.x.
- [28] Menteri Kesehatan Republik Indonesia, *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 43 Tahun 2013 tentang Cara Penyelenggaraan Laboratorium Klinik Yang Baik*. 2013.
- [29] Infiniti Bioanalitika Solusindo, "Kontaminasi di Laboratorium," *ibs.co.id*, Aug. 30, 2021. <https://ibs.co.id/kontaminasi-laboratorium/> (accessed Jun. 18, 2022).
- [30] Promega, "Introducing GoTaq® qPCR Master Mix: The Bright Choice for Dye-Based qPCR," 2009. [https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/introducing-gotaq-qpcr/#:~:text=%23%20A6001\)%20introduces%20a%20new%2C,inhibitory%20in%20a n%20amplification%20reaction.](https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/introducing-gotaq-qpcr/#:~:text=%23%20A6001)%20introduces%20a%20new%2C,inhibitory%20in%20a n%20amplification%20reaction.) (accessed Jun. 27, 2022).
- [31] R. Jain, "Contamination in real time PCR using SYBR green chemistry, what could be the solution?," *researchgate.com*. Sep. 09, 2017. Accessed: Jun. 09, 2022. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/post/Contamination_in_real_time_PCR_using_SYBR_green_chemistry_what_could_be_the_solution
- [32] Z. Zilhadia, A. N. Izzah, and O. S. Betha, "Perbandingan Metode SYBR Green dan Hydrolysis Probe dalam Analisis DNA Gelatin Sapi dan Gelatin Babi Menggunakan Real Time Polymerase Chain Reaction," *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, vol. 4, no. 1, pp. 16–23, Dec. 2017, doi: 10.29208/jsfk.2017.4.1.194.