

**VALIDASI METODE *MULTIPLY* PCR GEN *ND5* UNTUK
DETEKSI KONTAMINASI BABI PADA BAKSO SAPI**



**HAFIZHAH PUTRIZALDA
NIM. 20032067/2020**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2024**

**VALIDASI METODE *MULTIPLEX* PCR GEN *ND5* UNTUK
DETEKSI KONTAMINASI BABI PADA BAKSO SAPI**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains



**Oleh:
HAFIZHAH PUTRIZALDA
NIM. 20032067**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2024**

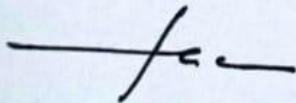
PERSETUJUAN SKRIPSI

VALIDASI METODE *MULTIPLEX* PCR GEN *ND5* UNTUK DETEKSI KONTAMINASI BABI PADA BAKSO SAPI

Nama : Hafizhah Putrizalda
NIM : 20032067
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

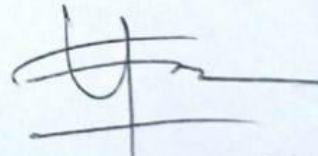
Padang, 19 Agustus 2024

Mengetahui:
Kepala Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 197508152006042001

Disetujui Oleh:
Pembimbing



Afifatul Achyar, M.Si.
NIP. 19840531201903006

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

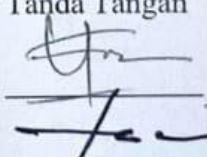


Nama : Hafizhah Putrizalda
NIM/TM : 20032067/2020
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

VALIDASI METODE *MULTIPLEX* PCR GEN *ND5* UNTUK DETEKSI KONTAMINASI BABI PADA BAKSO SAPI

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi
Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Padang, 19 Agustus 2024

Tim Penguji

	Nama	Tanda Tangan
Ketua	: Afifatul Achyar, M.Si.	
Anggota	: Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.	
Anggota	: Dr.dr. Elsa Yuniarti, S.Ked., M.Biomed., AIFO-K.	

SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

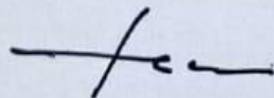
Nama : Hafizhah Putrizalda
NIM/TM : 20032067/2020
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul "**Validasi Metode *Multiplex* PCR Gen *ND5* Untuk Deteksi Kontaminasi Babi Pada Bakso Sapi**" adalah benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang sepengetahuan saya tidak terdapat karya, pendapat, dan ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan rasa tanggungjawab sebagai anggota Masyarakat ilmiah.

Padang, 19 Agustus 2024

Mengetahui,
Ketua Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 19750815 200604 2 001

Saya yang menyatakan,



Hafizhah Putrizalda
NIM. 20032067

VALIDASI METODE *MULTIPLEX* PCR GEN *ND5* UNTUK DETEKSI KONTAMINASI BABI PADA BAKSO SAPI

Hafizhah Putrizalda

ABSTRAK

Polymerase Chain Reaction adalah metode berbasis DNA yang paling umum digunakan untuk memperbanyak fragmen DNA dari gen tertentu secara *in vitro*. Salah satu pengembangan pada metode PCR yang dapat digunakan dalam mengidentifikasi kontaminasi pada olahan pangan adalah *multiplex* PCR. Metode ini dapat meningkatkan efisiensi dalam identifikasi beberapa spesies secara simultan. Tujuan pada penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil validasi metode *multiplex* PCR gen *ND5* terhadap kontaminasi babi pada bakso sapi dengan metode baku ISO/TS 20224-3: 2020 (E).

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif menggunakan metode *multiplex* PCR dengan menganalisis dan membandingkan hasil elektroforesis dan kurva amplifikasi *real-time* PCR yang datanya disajikan dalam bentuk grafik dan gambar. Sampel yang digunakan berupa 13 bakso sapi yang berasal dari tiga kecamatan di Kota Padang, kontrol negatif yang digunakan berasal dari bakso sapi kemasan serta kontrol negatif berupa bakso babi yang diperoleh di Pasar Pondok Kampung Cina Kota Padang. Penelitian dilakukan pada bulan November 2023 sampai April 2024 di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Hasil penelitian pada 13 sampel bakso sapi yang telah dilakukan uji halal menggunakan metode *multiplex* PCR menunjukkan hasil yang negatif atau bebas dari kontaminasi DNA babi. Pengujian dengan metode *real-time* PCR (qPCR) sesuai standar baku ISO juga menunjukkan hasil yang sama dan konsisten dengan metode *multiplex* PCR, sehingga metode *multiplex* PCR gen *ND5* yang dikembangkan tervalidasi dan mampu menyeimbangkan data dengan metode *real-time* PCR (qPCR) standar ISO/TS 20224-3:2020 (E).

Kata kunci: Bakso sapi, *Multiplex* PCR, *ND5*, *Real-time* PCR, Validasi

VALIDATION OF ND5 GENE *MULTIPLEX* PCR METHOD FOR DETECTION OF PORK CONTAMINATION IN BEEF MEATBALLS

Hafizhah Putrizalda

ABSTRACT

Polymerase Chain Reaction is a DNA-based method that is most commonly used to multiply DNA fragments of certain genes in vitro. One of the developments in the PCR method that can be used to identify contamination in processed food is multiplex PCR. This method can increase efficiency in identifying several species simultaneously. The aim of this study was to determine the validation results of the multiplex PCR method for the ND5 gene on pork contamination in beef meatballs using the ISO/TS 20224-3: 2020 (E) standard method.

This research is a descriptive study using the multiplex PCR method by analyzing and comparing the results of electrophoresis and real-time PCR amplification curves, the data of which is presented in the form of graphs and pictures. The samples used were 13 beef meatballs from three sub-districts in Padang City, the negative control used came from packaged beef meatballs and the negative control was pork meatballs obtained at Pondok Kampung Cina Market, Padang City. The research was conducted from November 2023 to April 2024 at the Genetics and Biotechnology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padang State University.

The results of research on 13 beef meatball samples that had been halal tested using the multiplex PCR method showed negative results or were free from pork DNA contamination. Testing using the real-time PCR (qPCR) method according to ISO standards also shows the same and consistent results as the multiplex PCR method, so that the ND5 gene multiplex PCR method developed is validated and able to balance data with the ISO/TS 20224-3:2020 (E).standard real-time PCR (qPCR) method.

Keywords: *Beef meatballs, Multiplex PCR, ND5, Real-time PCR, Validation*

KATA PENGANTAR



Puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Karunia-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “**Validasi Metode *Multiplex* PCR Gen *ND5* Untuk Deteksi Kontaminasi Babi Pada Bakso Sapi**”. Sholawat beserta salam untuk Nabi Muhammad SAW sebagai junjungan umat seluruh alam.

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Keberhasilan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu Afifatul Achyar, M.Si. sebagai dosen pembimbing yang telah memberikan banyak waktu, pikiran, dan tenaga untuk membimbing dalam melaksanakan penelitian dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi serta kemurahan hati Ibu untuk segala hal yang telah Ibu berikan kepada saya.
2. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed. Sebagai Ketua Departemen Biologi dan Ketua Program Studi Biologi FMIPA UNP sekaligus dosen penguji yang telah banyak memberikan kritikan, saran, dan masukan dalam penulisan skripsi.
3. Ibu Dr. dr. Elsa Yuniarti, S.Ked., M.Biomed., AIFO-K sebagai dosen penguji yang telah banyak memberikan kritikan, saran, dan masukan dalam penulisan skripsi.

4. Ibu Dr. Irdawati, M.Si. sebagai Pembimbing Akademik yang telah memberikan nasehat dan saran di Departemen Biologi.
5. Bapak/Ibu dosen staff Departemen Biologi yang telah membantu selama masa perkuliahan di Departemen Biologi serta dalam kelancaran penulisan skripsi ini.
6. Kepada kedua orang tua saya, Ayah (Alm. Rizal Antoni) dan Bunda (Sukma Enda) yang menjadi saksi perjuangan dan perjalanan penulis dalam menyelesaikan pendidikan dan penulisan skripsi ini, yang telah memberikan banyak do'a dan dukungan finansial. Ayah, terima kasih sudah menjadi ayah hebat walaupun tidak berkesempatan melihat putri sulungnya sampai di titik ini, tetapi ayah mampu mendidik Fifi dengan baik sehingga dapat meraih gelar sarjana. Bunda, terima kasih selalu ada di setiap perjalanan penulis. Semua kemudahan dalam proses pendidikan ini bisa Fifi dapat karena do'a yang setiap waktu bunda langitkan. Tidak lupa juga adik kandung yang sangat penulis sayangi, Muhammad Syauqi Addawi dan Muhammad Rafiqi Nur Salam yang selalu memberikan semangat dan bantuannya dalam proses penulisan.
7. Keluarga besar penulis, terutama Apak, Titik, Mamam, Uncu, Tatak, dan Om Cin yang selalu memberikan do'a yang terbaik serta dukungan berupa moril dan materil selama proses pendidikan dan dalam penyusunan skripsi.
8. Diri penulis sendiri, Hafizhah Putrizalda. Terima kasih sudah bertahan dan tidak mudah untuk menyerah dengan keadaan. Terima kasih untuk tetap kuat sampai di tahap ini. Masih banyak yang harus dicoba untuk tahap selanjutnya, Fi dan harus tetap semangat.

9. Teman-teman seperbimbingan, Eja, Cici, Rani, Afifah, dan Dara. Terima kasih atas semua bantuan dukungan dan kerjasamanya.
10. Teman-teman *molekuler pride*, Kia, Hana, dan Silvy yang selalu menemani dikala sulitnya penelitian, memberikan bantuan, dan dukungan selama melakukan penelitian di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Universitas Negeri Padang.
11. Teman-teman seperjuangan dari awal perkuliahan, Biologi Sains A 2020 yang menjadi rumah, membantu, dan menghibur selama masa perkuliahan serta keluarga besar koloni Biologi 2020 yang selalu memberikan dukungan serta do'anya.
12. Serta untuk semua pihak yang ikut berpartisipasi dalam penelitian dan penyusunan penulisan skripsi ini.

Semoga bantuan yang Bapak/Ibu serta rekan-rekan berikan, bernilai ibadah dan mendapatkan pahala dari Allah SWT. Penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi semua orang yang membacanya.

Padang, Mei 2024

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II KERANGKA TEORITIS	6
A. Metode Uji Halal Pangan	6
B. <i>Gold Standard</i> ISO/TS 20224-3: 2020 (E).....	20
C. Gen <i>ND5</i> Pada DNA Mitokondria	22
D. Olahan Produk Bakso Sapi.....	25
E. Isolasi DNA.....	26
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	28
A. Jenis Penelitian	28
B. Waktu dan Tempat Penelitian	28
C. Alat dan Bahan Penelitian	28
D. Prosedur Penelitian.....	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	37
A. Hasil Penelitian	37
B. Pembahasan	42
BAB V PENUTUP.....	46
A. Kesimpulan.....	46
B. Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Primer yang digunakan pada <i>multiplex</i> PCR	29
2. Primer dan <i>probe</i> yang digunakan pada metode qPCR ISO/TS 20224-3:2020 (E)	29
3. Komponen reaksi <i>multiplex</i> PCR	33
4. Program <i>multiplex</i> PCR	34
5. Komponen reaksi metode qPCR ISO/TS 20224-3:2020 (E)	35
6. Program metode qPCR ISO/TS 20224-3:2020 (E).....	35
7. Rentang nilai akurasi metode yang dikembangkan.....	37
8. Hasil pengukuran kuantitas dan kualitas DNA sampel bakso	37
9. Nilai Ct hasil qPCR ISO/TS 20224-3:2020 (E).....	40
10. Perhitungan nilai akurasi <i>multiplex</i> PCR dengan qPCR ISO/TS 20224-3:2020 (E)...	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Gen <i>ND5 Sus scrofa</i> pada NCBI.....	23
2. Gen <i>ND5 Bos taurus</i> pada NCBI.....	23
3. Desain pasangan primer spesifik <i>Sus</i> dan <i>Bos</i> menggunakan <i>geneious prime</i> .	24
4. Karakteristik hasil desain primer spesifik <i>Sus</i> dan <i>Bos</i>	25
5. Elektroferogram produk <i>multiplex PCR ND5</i> Babi dan Sapi.....	38
6. Kurva amplifikasi dan nilai Ct sampel bakso sapi produk qPCR ISO/TS 20224-3: 2020 (E)	40
7. Kurva amplifikasi dan nilai Ct sampel bakso babi produk qPCR ISO/TS 20224-3: 2020 (E)	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kurva amplifikasi dan nilai Ct <i>real-time</i> PCR (qPCR) ISO	53
2. Perbandingan hasil metode <i>multiplex</i> PCR gen <i>ND5</i> dengan metode	56
3. Hasil pengukuran kuantitas dan kualitas DNA sampel bakso	56
4. Dokumentasi kegiatan penelitian	58

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Keamanan pangan didefinisikan sebagai kondisi dan upaya yang diperlukan untuk pencegahan pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia, fisik dan bahan lain yang dapat merugikan dan membahayakan kesehatan manusia (Peraturan Pemerintah Nomor 28 Tahun 2004). Pemerintah telah berupaya melindungi konsumen dengan berbagai undang-undang dan peraturan pemerintah, tetapi sampai saat ini pemalsuan akan produk pangan khususnya produk olahan daging masih sering terjadi.

Pencampuran daging lain pada produk daging olahan biasanya bertujuan untuk menekan biaya produksi. Banyak kasus penipuan dan kontaminasi dengan penggunaan bahan-bahan yang tidak layak konsumsi dan tidak halal. Kontaminasi bahan tersebut dapat terjadi pada tahap awal atau tahap akhir produksi. Namun, ada juga kontaminasi yang tanpa disengaja dan tidak diketahui oleh produsen produk daging olahan, seperti mesin penggilingan daging yang penggunaannya tidak dibedakan antara daging halal dan daging haram yang dilakukan oleh tempat penggilingan daging (Primasari, 2011). Dalam kasus ini yang berpotensi tercemar daging yang tidak boleh dikonsumsi seperti babi adalah olahan bakso. Proses pembuatan bakso oleh produsen dari etnis tertentu dimungkinkan dicampur dengan daging babi yang bertujuan untuk menurunkan harga produksi tetapi harga jual tetap tinggi, serta meningkatkan cita rasa. Pencampuran ini tidak disertai informasi yang jelas kepada masyarakat, sehingga masyarakat tidak mengetahui produk olahan tersebut mengandung babi, padahal masyarakat muslim

diharamkan mengonsumsi daging babi dan beberapa golongan masyarakat juga mempunyai *hipersensitivitas* atau intoleran terhadap daging babi (Fibriana *et al.*, 2010).

Teknologi molekular dapat digunakan sebagai solusi alternatif yang akurat untuk mengautentikasi apakah suatu sampel makanan mengandung kontaminan daging babi, dilihat dari kandungan DNA. Teknologi ini sangat mungkin untuk memastikan apakah suatu sampel makanan mengandung kontaminan babi walaupun dalam jumlah sedikit. Hal ini disebabkan daging babi/celeng biasanya dijual dengan mencampur daging sapi atau daging halal lain, sebagai makanan olahan seperti bakso, sosis, dan nugget menggunakan mesin penggilingan di pasar. Teknologi molekular yang dapat digunakan sebagai metode identifikasi kontaminan daging babi/celeng pada daging dan makanan olahan secara cepat/*rapid test* adalah teknik PCR, baik PCR konvensional maupun *real-time* PCR. (Rachmawati *et al.*, 2018).

PCR adalah metode berbasis DNA yang paling umum digunakan untuk memperbanyak fragmen DNA dari gen tertentu secara *in vitro*. PCR adalah teknik pilihan yang digunakan untuk mengidentifikasi beberapa jenis ternak (Cespedes *et al.*, 1999). Metode ini merupakan teknik yang dapat digunakan dalam mengidentifikasi kontaminasi babi (Farouk *et al.*, 2006). Untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal perlu dilakukan optimasi proses PCR. Secara umum optimasi proses PCR dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR (Safanah, 2019). Salah satu metode PCR yang dapat digunakan dalam mengidentifikasi kontaminasi pada olahan pangan adalah *multiplex* PCR. Teknik ini dapat meningkatkan efisiensi dalam identifikasi beberapa spesies

secara simultan, sehingga dapat mengurangi biaya dan waktu dalam pengerjaannya (Ali, 2014). Keuntungan dari metode *multiplex* PCR, yaitu dapat melakukan uji deteksi kontaminasi yang lebih dari satu jenis hewan pada sampel dalam keadaan mentah atau produk yang sudah mengalami pemanasan suhu tinggi (Nuraini *et al.*, 2020). Metode ini dapat cukup akurat, ekonomis, dan cepat dalam mendeteksi gen target dari berbagai jenis hewan dan bahan daging yang segar (Martin *et al.*, 2007). Salah satu faktor penentu keberhasilan teknik PCR dalam mendeteksi adanya bahan yang berasal dari babi pada suatu produk adalah pada kualitas dan kuantitas DNA *template* (Arini *et al.*, 2023).

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Chatri *et al.* (2023) sudah melakukan desain primer untuk mendeteksi keberadaan daging babi dan daging sapi pada produk olahan pangan dengan menggunakan gen target *NADH dehydrogenase (ND5)*. Selanjutnya, Mardhotillah (2021) menggunakan metode PCR konvensional dengan pasangan primer Sus-F dan Sus-R yang mengamplifikasi gen *ND5*. Gen *ND5* merupakan pengkode rantai 5 *NADH-ubiquinone oxydoreductase*, yang terletak di membran dalam mitokondria dan merupakan yang terbesar dari lima kompleks rantai transpor 3 elektron. Kelebihan dari menggunakan gen *ND5* yang terdapat pada *genome* mitokondria sebagai target adalah karena gen ini memiliki salinan yang lebih banyak sehingga akan lebih mudah terdeteksi (Masnaini, 2021). Selanjutnya, pada penelitian Putri (2022) juga telah berhasil mendapatkan kondisi *multiplex* PCR yang optimal untuk mengamplifikasi gen *ND5* daging babi dan sapi secara bersamaan dengan variasi konsentrasi pasangan primer *ND5* daging babi (Sus-F dan Sus-R), primer *ND5* daging sapi (Bos-F dan Bos-R) serta profil program PCR.

Namun, metode yang telah dioptimasi oleh Putri (2022) belum pernah dilakukan validasi. Padahal suatu metode uji baru dapat diaplikasikan di laboratorium uji, jika sudah melewati proses validasi. Validasi merupakan konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti yang obyektif bahwa persyaratan tertentu untuk tujuan khusus dipenuhi. Menurut SNI 19-17025-2017, salah satu klausulnya menyebutkan bahwa laboratorium harus memvalidasi metode tidak baku, metode yang dikembangkan, dan metode baku yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan (Muryanto, 2020).

Berdasarkan pertimbangan tersebut, maka dalam penelitian ini dilakukan validasi metode analisis cemaran DNA babi dengan metode *multiplex* PCR gen *ND5* yang telah dikembangkan sebelumnya. Validasi ini bertujuan untuk mengetahui bahwa metode yang telah dikembangkan memenuhi semua parameter, sehingga dapat dijadikan metode yang handal dan sah dalam analisis cemaran DNA babi pada produk makanan olahan, khususnya bakso sapi di pasaran. Validasi metode analisis ini akan dibandingkan dengan metode baku dari *International Organization for Standardization* (ISO) yang digunakan oleh laboratorium pengujian sebagai persyaratan umum untuk kompetensi pengujian dan kalibrasi, sehingga kredibilitas suatu metode dapat terjamin (Kehek *et al.*, 2022). Metode yang menjadi *gold standard* untuk deteksi cemaran DNA babi adalah SNI ISO/TS 20224-3: 2020 (E) (BSN, 2022). Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini berfokus terhadap “Validasi Metode *Multiplex* PCR Gen *ND5* Untuk Deteksi Kontaminasi Babi Pada Bakso Sapi” dengan metode baku ISO/TS 20224-3: 2020 (E).

B. Rumusan Masalah

Bagaimanakah hasil dari validasi metode *multiplex* PCR menggunakan gen *ND5* terhadap deteksi kontaminasi babi pada bakso sapi?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil validasi metode *multiplex* PCR gen *ND5* terhadap kontaminasi babi pada bakso sapi dengan metode baku ISO/TS 2224-3: 2020 (E).

D. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini memberikan informasi tentang seberapa valid metode *multiplex* PCR dalam mendeteksi kontaminasi babi pada produk olahan makanan khususnya bakso sapi.
2. Hasil penelitian ini memberikan informasi mengenai beberapa bakso yang terindikasi adanya campuran babi dalam pengolahan bakso melalui validasi gen *ND5* berbasis *multiplex* PCR.