

## **Identifikasi Pemalsuan Dengan Metode Uji PCR Multipleks Dan Uji Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Pada Daging Sapi**

Hasina Tazkiyya Fitriani<sup>1</sup>, Labib Zufar Mansuridin<sup>2</sup>, Lisania Amanah<sup>3</sup>, Siti Nurhaniah<sup>4</sup>,  
Siti Nurlailatul Qodariah<sup>5</sup>, Wahyu Sigit Widiatmoko<sup>6</sup>, Raden Siti Nurlaela<sup>7</sup>

Email:

b.2010783@unida.ac.id

r.siti.nurlaela@unida.ac.id

"

### **ABSTRAK**

Daging merupakan sumber nutrisi yang penting bagi manusia untuk mendapatkan protein berkualitas tinggi. Kualitas daging ditentukan oleh pertumbuhan komponen jaringan ikat berupa tulang, lemak dan jaringan otot. Besarnya serabut otot dan tebalnya otot akan menentukan kualitas daging. Penipuan terhadap industri daging adalah praktik-praktik pelanggaran hukum dalam industri pengolahan untuk menjual produk agar mendapatkan lebih banyak keuntungan secara ilegal. Penguatan penelitian tentang metode analisis keaslian produk daging sangat penting untuk mengontrol keamanan pangan yang beredar di pasaran. Penelitian ini menggunakan dua metode untuk mendeteksi pemalsuan daging sapi yang dicampurkan dengan daging babi yaitu metode ELISA dan metode uji PCR multipleks. Metode ELISA ini adalah teknik yang digunakan untuk mendeteksi atau mengukur molekul DNA babi yang terkandung dalam daging sapi. Sedangkan uji PCR multipleks adalah teknik PCR yang memungkinkan deteksi beberapa target DNA secara bersamaan. Untuk mendeteksi adanya DNA babi pada daging sapi, PCR multipleks dapat digunakan dengan mengamplifikasi fragmen DNA spesifik dari daging sapi dan daging babi. Pada penelitian ini, Uji PCR multipleks yang dikembangkan terbukti efisien secara simultan dalam identifikasi dua jenis daging. Pengujiannya juga cukup sensitif untuk mengaktifkan deteksi template DNA serendah 30 pg per reaksi yang membuatnya memenuhi syarat untuk makanan daging yang dimasak. Teknik ini validasi untuk akurasi, spesifisitas, sensitivitas, dan penerapan dalam pengujian sampel makanan.

**Kata Kunci:** Daging Sapi, Babi, Uji Multipleks, ELISA

### **PENDAHULUAN**

Produk daging telah menjadi bagian tak terpisahkan dari pangan hewani yang dikonsumsi masyarakat. Daging merupakan sumber nutrisi yang penting bagi manusia untuk mendapatkan protein berkualitas tinggi (Vlachos et al.,2016). Selain

proteinnya yang tinggi daging kaya akan asam amino esensial lengkap dan seimbang, protein pada hewani lebih mudah dicerna daripada nabati serta mengandung mineral dan vitamin. Istilah daging dibedakan dengan karkas, daging adalah bagian yang sudah tidak mengandung tulang, sedangkan karkas berupa daging yang belum dipisahkan dari tulang atau kerangkanya (Astawan, 2006). Kualitas daging ditentukan oleh pertumbuhan komponen jaringan ikat berupa tulang, lemak dan jaringan otot. Besarnya serabut otot dan tebalnya otot akan menentukan kualitas daging.

Keresahan konsumen terkait keaslian makanan dan pemalsuan (Kamruzzaman, Makino, & Oshita, 2015). Pilihan makanan biasanya mencerminkan aspek gaya hidup, budaya, agama, pola makan, dan masalah kesehatan (Lubis, Mohd-Naim, Alizul, & Ahmed, 2016). Di sebagian besar negara, produsen makanan memilih lemak babi sebagai bahan yang cocok untuk minyak karena harganya yang murah dan ketersediaannya. Dalam pandangan beberapa agama (Islam dan Yudaisme), daging babi dan lemak babi adalah masalah serius. Komplikasi biologis dan risiko kesehatan dapat dikaitkan dengan asupan harian (Kim, Seo, Yum, Jeong, & Yang, 2017). Penipuan terhadap industri daging adalah seseorang melanggar hukum untuk menjual produk palsu agar mendapatkan lebih banyak uang secara ilegal, seperti menjual daging hewan mahal yang dicampur dengan daging hewan murah (daging tikus sebagai daging kambing), makanan daging tikus yang mengandung berbagai zat berbahaya (bakteri dan logam berat), dan produk daging kambing yang dicampur dengan daging babi untuk konsumen, membahayakan kesehatan masyarakat dan merugikan hak dan kepentingan masyarakat. Oleh karena itu, penguatan penelitian tentang metode analisis keaslian produk daging sangat penting untuk mengontrol keamanan pangan yang beredar di pasaran.

Karena harganya yang lebih murah dari pada daging, daging babi sering ditambahkan dalam produk makanan dan telah diidentifikasi sebagai pemalsuan potensial dalam daging mentah. Untuk mendeteksi spesies hewan dalam produk pangan, laboratorium pengawasan pangan harus mampu membedakan spesies yang

digunakan dalam bahan mentah (Aida, Man, Wong, Raha, & Son, 2005). Metode analisis yang biasa digunakan untuk analisis halal atau pemalsuan daging babi didasarkan pada analisis protein atau DNA, seperti elektroforesis (Hernandez-Chavez, Gonzalez-Cordova, Rodriguez-Ramirez, & Vallejo-Cordoba, 2011), reaksi berantai polimerase waktu nyata (RT-PCR) (Al-Kahtani, Ismail, & Ahmed, 2017), kromatografi (Yan et al., 2016), PCR amplifikasi DNA mitokondria (Karabasanavar, Singh, Kumar, & Shivannavar, 2014) dan analisis polimorfisme konformasi untai tunggal (SSCP) (Aali, Moradi-Shahrababak, Moradi-Sharbabak, Sadeghi, & Kohram, 2016). Namun, metode ini tidak cocok untuk analisis sampel rutin karena relatif mahal dan memakan waktu yang sedikit lama. Metode deteksi multipleks-PCR dan Metode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) untuk mengidentifikasi pemalsuan daging sapi dengan deteksi waktu cepat, singkat dan akurat.

## **METODE PENELITIAN**

### **1. Metode ELISA**

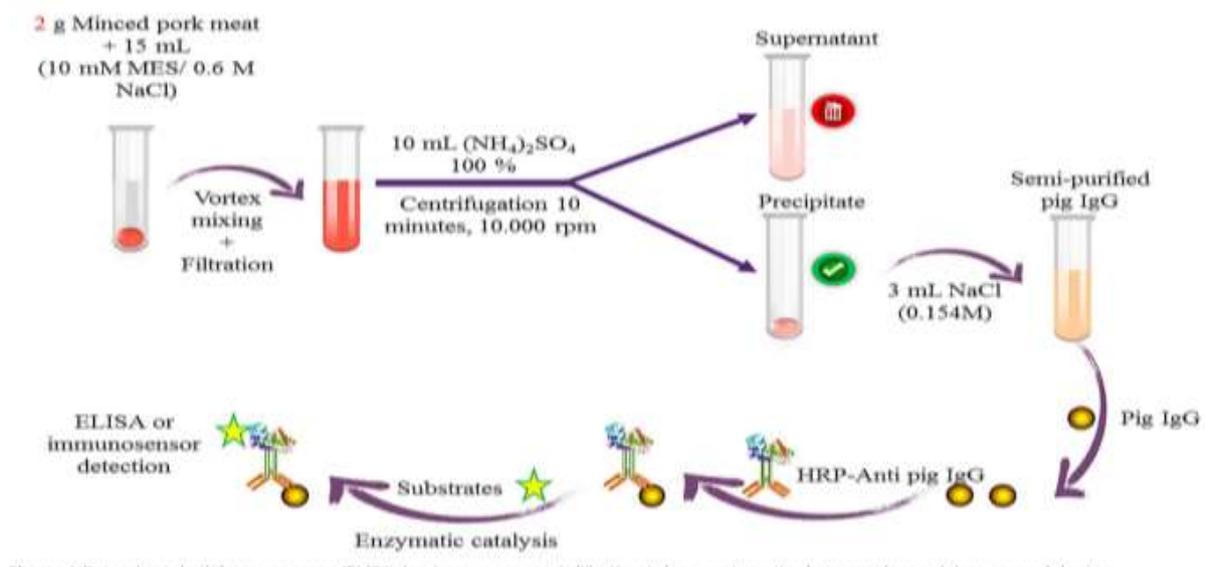
#### **Daging sapi tercemar Daging babi**

Teknik imun-enzimatik (ELISA/immunosensor), daging sapi yang dipalsukan babi disiapkan dengan cara membubuhkan daging babi ke daging sapi dalam kisaran konsentrasi 1; 5; 10; 25; 50; 100 (%b/b).

#### **Ekstraksi Daging**

Dua jenis sampel daging, yaitu daging sapi dan daging babi digunakan. Daging sapi digunakan sebagai kontrol dalam penelitian ini. Setiap jenis sampel daging (sapi dan babi) dibebaskan dari lemak dan jaringan ikat, kemudian dicacah dan dihaluskan secara terpisah dalam blender, dan ditimbang sebanyak 10 g. Sampel daging disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan untuk ekstraksi protein untuk meminimalkan perubahan yang merugikan pada sampel. Ekstraksi protein dari daging dilakukan sebagai berikut: 2 g sampel daging dicampur dengan 15 mL buffer ekstraksi (10 mM 2-(N Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) dengan

0,6 M sodium chloride (NaCl)) dan diinkubasi pada 75 ° C selama 30 menit, dilakukan pengadukan cepat diikuti dengan sentrifugasi selama 10 menit (10.000 rpm). Kemudian, supernatan diambil dan disaring tiga kali dengan penyaring kopi. Ekstraksi dingin dilakukan dengan mencampurkan 1 g sampel daging dengan buffer ekstraksi tanpa inkubasi suhu dan protein yang diekstraksi disimpan dalam es selama proses ekstraksi.



### Deteksi pemalsuan daging babi dengan ELISA kompetitif

ELISA kompetitif dilakukan sebagai berikut: 1000 µg.mL<sup>-1</sup> standar IgG murni dari serum babi digunakan sebagai standar, 100 µL dilapisi pada sumur dan pelat diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Kemudian 5% BSA (200 µL/sumur) digunakan untuk memblokir situs nonspesifik selama 1 jam pada suhu kamar. Selanjutnya, larutan campuran yang mengandung antibodi penangkap pada pengenceran 10<sup>-3</sup>(100 µL/sumur) dan protein IgG yang diekstraksi dari sampel daging (100 µL/sumur) diinkubasi selama 30 menit pada suhu 4 °C. Setelah setiap langkah modifikasi, pelat dicuci dengan PBS.

## 2. Metode Uji PCR Multipleks

### Ekstraksi DNA

Satu mL buffer lisis (3,13 M guanidine tiosianat, 0,05 M Tris-HCl, 0,025 M EDTA, 1% sarkosyl, pH 6,8) ditambahkan per 300  $\mu$ L sampel ke dalam mikrosentrifus 1,6 ml tabung. Setelah inkubasi 5-7 menit pada 65° C, sampel diputar ke bawah pada 5.000 G selama 30 detik. Itu supernatan dipindahkan ke tabung baru yang berisi 10  $\mu$ L penyerap Silika. Setelah inkubasi 10 menit pada agitasi terus menerus pada suhu kamar, sampel disentrifugasi pada 5000G selama 30 detik. Pelet dicuci sekali dengan campuran 200  $\mu$ L penyangga lisis ditambah 600  $\mu$ L penyangga pencuci (2,34 M guanidinium hidroklorida, 0,0585 M Tris HCl, 0,0243 M EDTA, pH 6,8) dan dua kali dengan 600  $\mu$ L buffer pencuci. Pelet itu dikeringkan pada suhu 65°C selama 5 menit. DNA diperoleh kembali dengan menginkubasi pelet dalam 50  $\mu$ L buffer elusi. (5% Chelex 100, 0,05M Tris-HCl, pH 8.0) pada 65 °C selama 5 menit. Solusinya diputar ke bawah untuk 1 minimal 10.000G dan supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke tabung baru. Sampelnya adalah disimpan pada -20 °C.

### **PCR dan Deteksi**

PCR Uniplex dan multipleks dilakukan dalam volume total sebanyak 20 $\mu$ L. Komposisi akhir adalah 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 320  $\mu$ M dUTP, 160  $\mu$ M dATP, 160  $\mu$ M dCTP, 160  $\mu$ M dGTP, 0,2 U UNG, 1,5 U Taq DNA polymerase. dan 0,3 ng setiap template DNA.

### **Validasi Uji PCR Multiplex**

Sensitivitas uji PCR multipleks diuji menggunakan pengenceran serial dari cetakan DNA yang telah dicampur sebelumnya dari setiap spesies target dimulai dengan 1 ng ke bawah per reaksi. Lima konsentrasi disiapkan dengan pengenceran 3 kali lipat dan diamplifikasi menjadi menentukan konsentrasi minimal yang dapat dideteksi. Untuk tes reproduktifitas, DNA diisolasi dari mentah, direbus (sampel direbus dalam air pada suhu 97–99 °C selama 30 menit) dan microwave sampel daging yang dimasak (750 W, 10 menit) (100 g) dianalisis menggunakan pengujian. Pengujian kekokohan dinilai dalam pengujian dengan 53 sampel daging olahan yang tersedia secara komersial produk.

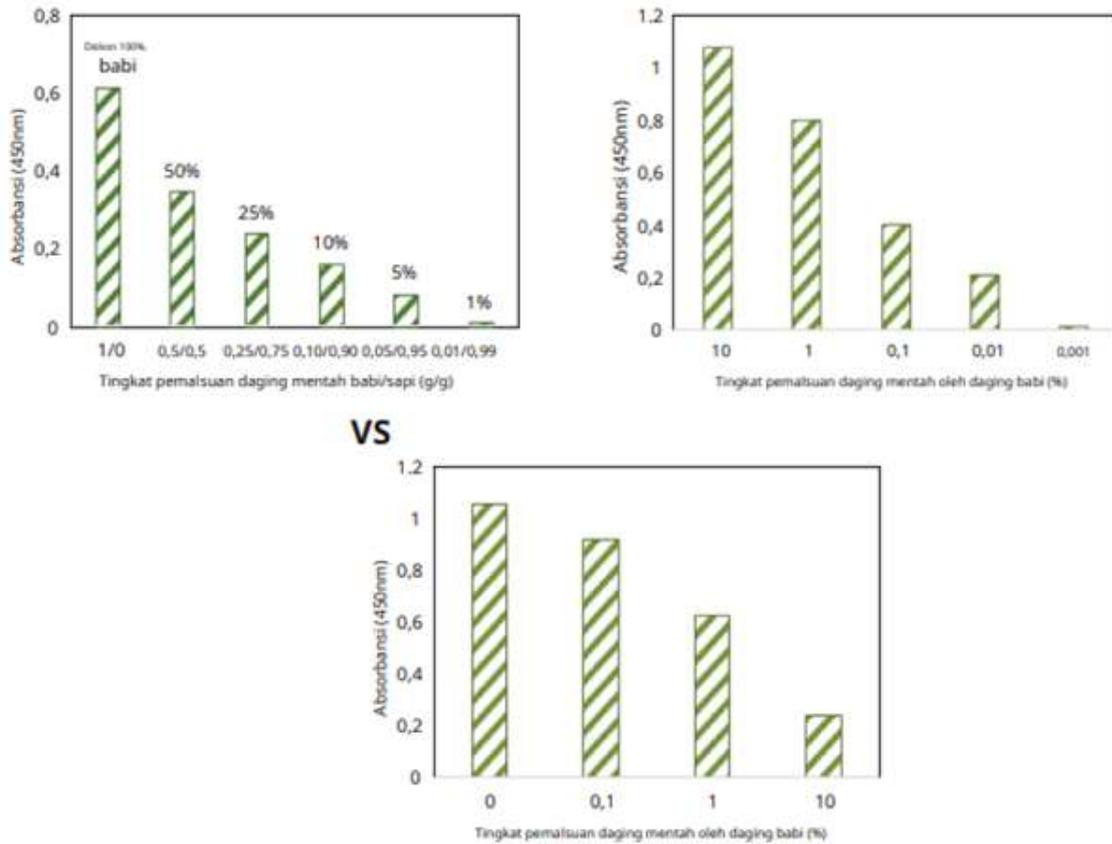
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Metode ELISA

#### Deteksi pemalsuan Daging sapi dengan ELISA

Metode elisa kompetitif dikembangkan untuk meminimalkan waktu inkubasi pig-IgG yang diekstraksi yang membutuhkan semalaman. Sebelum melakukan ELISA kompetitif, dilakukan studi optimasi untuk mengidentifikasi kisaran konsentrasi pig-IgG murni yang digunakan sebagai standar dan untuk mengetahui konsentrasi pig-IgG untuk pelapisan pelat jika terjadi kompetisi. Absorbansi pada 450 nm versus pig-IgG ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) konsentrasi dalam kisaran 100–0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Ara. 1D) dilengkapi dengan regresi linier  $\text{DO}_{450\text{nm}} = 0,551 \log C + 0,278$ , di mana, C sesuai dengan absorbansi/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , ( $R^2=0,999$ ). Batas deteksi (LOD) dihitung menurut  $3\sigma/S$  dan ditemukan 0,12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , di mana S adalah kemiringan kurva kalibrasi dan  $\sigma$  adalah standar deviasi dari nilai kerapatan optik (450 nm). Absorbansi menurun dengan meningkatnya tingkat pemalsuan dalam kisaran antara 0,1 dan 10%. Pengujian kompetitif yang dikembangkan menunjukkan sensitivitas tinggi dengan penentuan tingkat pemalsuan yang rendah (0,1%) hanya dalam 45 menit (ons BSA/Pig-IgG diadsorpsi pada sumur pelat).

Respons kronoamperometri dari berbagai tingkat pemalsuan mulai dari (A) 10 hingga 0,1% diperoleh dengan immunosensor langsung yang dikembangkan dan (B) dari 0,1 hingga 0,01% oleh immunosensor kompetitif. (C) Tingkat pemalsuan diperoleh dengan bakso daging sapi yang dibuat dengan cara membumbui daging babi ke bakso sapi dalam kisaran konsentrasi 1; 10; 20; 40; 80% (%b/b). Bakso yang mengandung 100% daging babi dijadikan sebagai kontrol positif, sedangkan sampel bakso daging sapi yang mengandung 100% daging sapi atau tanpa daging babi (0%) dimasukkan sebagai kontrol negatif murni atau murni. (D) Hasil uji spesifisitas yang dibuat oleh immunosensor yang dikembangkan terhadap daging babi dibandingkan dengan daging lainnya (sapi, domba, ayam dan kalkun).



## 2. Metode Uji PCR

Reproduktifitas pengujian adalah diperiksa dengan berbagai sampel daging mentah dan makanan olahan. Amplifikasi DNA babi, sapi, dan ayam yang diisolasi dari mentah, direbus, dan dimasak dengan microwave daging menghasilkan produk PCR yang diharapkan dari semua templat DNA yang dianalisis.

Hasil amplifikasi PCR untuk campuran ini menunjukkan kemampuan uji mendeteksi secara andal 0,1–0,2% kontaminan dalam campuran berbagai spesies daging, sehingga mengkonfirmasi kelayakan pengujian yang dikembangkan untuk analisis pemalsuan sukarela.

Penerapan pengujian yang dikembangkan untuk diproses secara komersial produk daging. Survei dilakukan dengan 53 sampel salamis, sosis, irisan daging, kalengan daging dan makanan siap masak beku dibeli dari supermarket yang berlokasi di Moskow dan Wilayah Moskow. Campuran vektor yang menyimpan

urutan spesifik spesies digunakan sebagai positif kontrol. Hasilnya menunjukkan Lebih dari 90% dari semuanya sampel (49 dari 53) memiliki spesies daging yang tidak terdaftar sebagai bahan. Pemalsuan yang paling sering terungkap adanya substitusi daging yang cukup mahal (daging sapi, kalkun) dengan ayam, yang ternyata ilustrasi yang jelas tentang pemalsuan yang bermotivasi ekonomi (Di Pinto et al., 2015; Everstine, Spink, & Kennedy, 2013).

## **KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa tes imunoenzimatis cepat (elisa dan immunosensor) menggunakan antibodi poliklonal IgG antibodi terkonjugasi HRP (horseradish peroxidase) diusulkan untuk mendeteksi tingkat rendah pemalsuan daging sapi dalam daging babi. Pengujian tersebut mampu secara akurat mengenali protein IgG babi yang diekstraksi dari daging. Uji PCR multipleks yang dikembangkan terbukti efisien secara simultan identifikasi lima jenis daging Pengujiannya juga cukup sensitif untuk mengaktifkan deteksi template DNA serendah 30 pg per reaksi yang membuatnya memenuhi syarat untuk makanan daging yang dimasak. Dalam penelitian ini, uji PCR multipleks mendapat validasi untuk akurasi, spesifisitas, sensitivitas, dan penerapan dalam pengujian sampel makanan ini kuat dan sederhana, serta dapat dengan mudah diimplementasikan analisis laboratorium rutin tanpa peralatan canggih khusus.

## **REFERENSI**

- Aali, M., Moradi-Shahrabak, H., Moradi-Sharbabak, M., Sadeghi, M., & Kohram, H. 2016. Polymorphisms in The Scd Gene are Associated with Meat Quality and Composition Fatty acids in Fat and thin-Tailed Iranian Sheep Breeds. *Animal Husbandry Science*.
- Afifah, KM, Hossain, A., Hossain, MS, Kamruzzaman, MM, et al. 2021. Detection of species adulteration in Meat and Cheese Products Mozzarella Using Mitochondrial CYT B Gene Duplex PCR: Food Safety Issues in Bangladesh.

- Chemical Food.16, (2). [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.FOCHMS.2021.100017100017](https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100017100017).
- Aida, AA, Man, YC, Wong, CMVL, Raha, AR, & Son, R. 2005. Analysis of Raw Meat and Lard Using Polymerase Chain Reaction for Halal Authentication. *Meat Science*, 69(1), 47-52.
- Al-Kahtani, HA, Ismail, EA, & Ahmed, MA. 2017. Pig Detection in Binary Meat Mixtures and Some Commercial Food Products Using Conventional PCR Techniques and Real-Time. *Food Chemistry*, 219.54-60.
- Di Pinto, A., Marchetti, P., Mottola, A., Bozzo, G., Bonerba, E., Ceci, E., Tantillo, G. 2015. Identifikasi Spesies Pada Produk Fillet Ikan Menggunakan DNA Barcode. *Penelitian Perikanan*, 170, 9-13.
- Everstine, K., Spink, J., & Kennedy, S. 2013. Pemalsuan yang Dimotivasi Secara Ekonomis (EMA) dari Makanan: Karakteristik Umum Insiden EMA. *Jurnal Perlindungan Pangan*, 76(4), 723-735.
- Flessner, MF, & Lofthouse, J. 1997. In Vivo Diffusion of Immunoglobulin G in Muscle: Effects of Binding, Solute Exclusion, and Lymphatic Removal American *Journal of Physiology-Cardiac and Circulatory Physiology*, 273(6), H2783-H2793. Hernandez.
- Gap-Don Kim, Jin-Kyu Seo, Hyeon-Woong Yum, Jin Yeon Jeong, Han-Sul Yang. 2017. Protein Markers for Discrimination of Meat Species in Raw Beef, Pork and Poultry and Their Mixtures. 217. 163-170.
- Karabasanavar, NS, Singh, SP, Kumar, D., & Shebannavar, SN. 2014. Detect From Pork Adulteration by Highly Specific PCR Assay of The Mitochondrial D-Loop. *Chemistry Food*, 145, 530-534.
- Lubis, HN, Mohd-Naim, NF, Alizul, NN, & Ahmed, MU. 2016. From Market to Food Plate: The Latest Trusted Technology and Innovation in Halal Food Analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 55-68. 188. 81-90.
- Vlachos, A., Arvanitoyannis, IS, Tserkezout, P. 2016. Updated Review of Methods and Applications of Meat Authenticity. *J. Criticism. Pastor Food Science. Nutr.*

56(7), 1061-1096. [HTTPS://DOI.ORG/10.1080/10408398.2012.691573](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.691573)

Yan, K., Zhang, H., Hui, W., Zhu, H., Li, X., Zhong, F., & Chen, C. 2016. Quick

Screening Toxic Salbutamol, Ractopamine, and Clenbuterol in Pork Samples

With High Performance Liquid Chromatography-UV Method. Journal of Food

and Drug Analysis, 24(2), 277-283.