

Optimasi Primer Gen Cytochrome C Oxidase Subunit I dalam Mendeteksi Kandungan Babi (*Sus scrofa* dan *Sus scrofa domesticus*) menggunakan qPCR untuk Pengembangan Halal Kit = Optimization of the Cytochrome C Oxidase Subunit I Gene Primer in Detecting Porcine Content (*Sus scrofa* and *Sus scrofa domesticus*) using qPCR for Halal Kit Development

Kembaren, Jocelyn Almeda Br Sembiring, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920530729&lokasi=lokal>

Abstrak

Penggunaan halal kit komersial dan qPCR dalam mendeteksi kehalalan produk pangan masih minim dilakukan di Indonesia. Hal ini dikarenakan sebagian besar kit deteksi berbasis PCR masih diimpor sehingga pendeteksian kehalalan pangan belum ekonomis. Selain itu, gen referensi untuk uji kehalalan suatu produk yang ditetapkan dalam International Organization for Standardization (ISO) juga masih sangat terbatas. Oleh karena itu, diperlukan adanya gen alternatif dalam mendeteksi kehalalan pangan, seperti gen COI. Gen tersebut digunakan karena bersifat sensitif, stabil, serta memiliki laju mutasi dan variabilitas yang rendah. Tujuan penelitian ini adalah merancang primer gen COI secara in-silico dengan nilai spesifisitas dan sensitivitas yang baik, serta dapat digunakan sebagai gen alternatif ISO. Tahapan desain primer yang dilakukan menghasilkan sepasang primer dan probe terbaik, yaitu primer forward 5'- GTA ACT GAC TCG TAC CGC TAA TAA -3', primer reverse 5'- GTA ATA GGA AGG ATG GTG GAA GT -3', dan probe 5'- AGC TCC CGA TAT GGC CTT TCC ACG TA -3'. Ekstraksi dan purifikasi DNA sampel ayam, sapi, babi domestik, dan babi hutan dilakukan menggunakan GenElute™-E Single Spin Blood DNA Kit. DNA yang telah diisolasi selanjutnya dikuantifikasi menggunakan Nanodrop Spectrophotometer. Hasil kuantifikasi DNA yang dilakukan pada keempat sampel menunjukkan nilai kemurnian pada absorbansi A260/A280 berada pada rentang nilai 1,136—2,000 dan nilai konsentrasi DNA berada pada rentang nilai 70—1060 g/mL. Suhu annealing optimal yang diperoleh adalah 57°C. Uji spesifisitas primer COI dan ACTB menggunakan metode qPCR menunjukkan bahwa kedua primer masih dapat mengamplifikasi sekuens DNA ayam dan persentase spesifisitas kedua primer yang didapatkan melalui perhitungan adalah 50%. Hasil uji sensitivitas primer COI menunjukkan nilai limit of detection (LoD) sebesar 1 pg/μL, nilai efisiensi (E) sebesar 82,55%, dan linearitas (R²) sebesar 0,9855. Hasil uji sensitivitas primer ACTB menunjukkan nilai limit of detection (LoD) sebesar 5 pg/μL dengan nilai efisiensi (E) sebesar 92,22%; dan linearitas (R²) sebesar 0,9951. Hasil uji sensitivitas primer COI dan ACTB menunjukkan nilai persentase sensitivitas yang sama, yaitu sebesar 100%, namun primer COI dinilai lebih sensitif dalam mendeteksi gen target karena menunjukkan nilai LoD yang lebih rendah daripada primer ACTB, yaitu sebesar 1 pg/μL. Berdasarkan keseluruhan hasil yang diperoleh, diperlukan adanya penelitian lebih lanjut terhadap primer gen COI untuk meningkatkan spesifisitasnya dalam mendeteksi kandungan babi domestik (*Sus scrofa domesticus*) dan babi hutan (*Sus scrofa*) pada produk pangan agar dapat digunakan sebagai primer alternatif untuk pengembangan halal kit berbasis qPCR di Indonesia.

.....The use of commercial halal kits and qPCR in detecting halal food products is still minimal in Indonesia. This is because most of the PCR-based detection kits are still imported so the detection of halal food is not yet economical. In addition, the reference gene for the halal test of a product specified in the International

Organization for Standardization (ISO) is still very limited. Therefore, it is necessary to have alternative genes in detecting food halalness, such as the COI gene. The gene is used because it is sensitive, stable, and has a low mutation rate and variability. This study aimed to design an in-silico primer for the COI gene with good specificity and sensitivity, which could be used as an alternative gene for ISO. The primer design phases were carried out to produce the best primer and probe pair, namely forward primer 5'- GTA ACT GAC TCG TAC CGC TAA TAA -3', reverse primer 5'- GTA ATA GGA AGG ATG GTG GAA GT -3', and probe 5'- AGC TCC CGA TAT GGC CTT TCC ACG TA -3'. DNA extraction and purification of chicken, cattle, domestic pig, and wild boar samples were carried out using the GenElute™-E Single Spin Blood DNA Kit. The isolated DNA was then quantified using a Nanodrop Spectrophotometer. The results of DNA quantification performed on the four samples showed that the purity values for the absorbance of A260/A280 were in the range of 1.136-2.000 and the DNA concentration values were in the range of values of 70—1060 g/mL. The optimal annealing temperature obtained is 57°C. The specificity test of COI and ACTB primers using the qPCR method showed that both primers were still able to amplify chicken DNA sequences and the percentage specificity of the two primers obtained by calculation was 50%. The results of the COI primary sensitivity test showed a limit of detection (LoD) value of 1 pg/μL, an efficiency value (E) of 82.55%, and a linearity (R²) of 0.9855. The ACTB primary sensitivity test results showed a limit of detection (LoD) value of 5 pg/μL with an efficiency value (E) of 92.22%; and linearity (R²) of 0.9951. The results of the COI and ACTB primer sensitivity tests showed the same sensitivity percentage value, which was 100%, but the COI primer was considered more sensitive in detecting target genes because it showed a lower LoD value than the ACTB primer, which was 1 pg/μL. Based on the overall results obtained, further research is needed on the COI gene primer to increase its specificity in detecting domestic pork (*Sus scrofa domestica*) and wild boar (*Sus scrofa*) content in food products so that it can be used as an alternative primer for developing qPCR-based halal kits in Indonesia.