

METODE qPCR *SYBR GREEN* DENGAN *MELTING CURVE ANALYSIS* UNTUK IDENTIFIKASI DAN DIFERENSIASI DAGING BABI TERNAK DAN DAGING BABI HUTAN

Puji Rahayu¹ *, Diyan Cahyaningsari¹, Hanif Anisatun¹, Metrizal¹

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*Email korespondensi penulis: puji_latif@yahoo.co.id

ABSTRAK

Salah satu upaya penjaminan mutu dan keamanan pangan asal hewan dilakukan dengan cara pengembangan metode untuk mengidentifikasi spesies terkait pemalsuan dan kehalalan suatu produk hewan. Metode qPCR dengan *Melting Curve Analysis* (MCA) dikembangkan dalam upaya untuk identifikasi dan diferensiasi spesies babi dan babi hutan yang banyak terkait dengan pemalsuan dan kehalalan produk hewan. Dengan menggunakan sepasang primer dan profil PCR yang sama metode ini mampu mengidentifikasi dan juga mendiferensiasi babi ternak dan babi hutan berdasarkan kurva leleh amplikonnya. Pada hasil amplifikasi tidak bisa membedakan antara babi ternak dan babi hutan, oleh karena itu diperlukan analisis tambahan yang mampu digunakan untuk mendiferensiasi babi ternak dengan babi hutan. Hasil analisa terhadap kurva leleh amplikon dapat digunakan sebagai dasar untuk membedakan babi ternak dengan babi hutan karena *melting temperature* (T_m) yang dihasilkan berbeda berbeda yaitu 81.5°C untuk babi ternak dan 82.3°C untuk babi hutan. Uji t terhadap nilai T_m (Tabel 3) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara T_m dari DNA babi ternak dan DNA babi hutan ($p < 0.05$). Dengan adanya analisis tambahan dengan menggunakan *Melting Curve Analysis* bisa dilakukan diferensiasi antara babi dengan babi hutan. Teknik pengujian qPCR berbasis *SYBR Green-melting curve analysis* (*SYBR Green-MCA*) merupakan metode yang cepat dan akurat untuk identifikasi dan diferensiasi spesies. Metodologi yang ditetapkan dalam pengembangan ini dapat digunakan untuk melakukan identifikasi dan diferensiasi pada spesies terutama yang berkaitan dengan kehalalan suatu produk pangan asal hewan.

Kata kunci: qPCR, *SYBR Green*, *Melting Curve Analysis* (MCA), pangan asal hewan

PENDAHULUAN

Identifikasi spesies dalam produk daging telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir sejak bahan makanan ini menjadi target yang rentan untuk pemalsuan dan serta semakin meningkatnya permintaan status halal dalam produk pangan asal hewan. Beberapa metode analitik yang mungkin digunakan untuk identifikasi spesies pada produk sudah banyak dikembangkan diantaranya dengan metode kromatografi, spektrometri massa, mikroskop, spektroskopi, resonansi putaran elektronik, pengujian enzimatik, ELISA dan juga PCR (Ballin, 2010). Selama ini belum banyak metode yang mampu membedakan antara babi ternak dan babi hutan karena baik susunan DNA maupun protein dari kedua spesies hanya sedikit memiliki perbedaan (Skobrák *et al.*, 2011)

Metode berbasis protein dilaporkan banyak bermasalah untuk identifikasi spesies dalam daging yang dipanaskan karena denaturasi protein oleh pemanasan intensif selama pemrosesan makanan menyebabkan modifikasi dalam aktivitas antigenik molekul, akibatnya mengubah kemampuan antibodi untuk mengidentifikasi protein targetnya (Hsieh, 2004). Selain itu pada metode yang berdasarkan protein kemungkinan reaksi silang antara spesies sangat mungkin terjadi (Hsieh *et al.*, 1998). Karena alasan ini metode berbasis protein telah

digantikan oleh metode berbasis DNA. Metode pengujian berdasarkan DNA memiliki kekuatan identifikasi yang spesifik karena identifikasi dilakukan terhadap segmen DNA dengan urutan tertentu dari jaringan atau hewan tertentu (Farag *et al.*, 2015). Dari teknik berbasis DNA, *polimerase chain reaction* (PCR) merupakan metode yang paling banyak digunakan, karena metode ini sederhana, hemat waktu, sensitif dan spesifik untuk mengidentifikasi spesies meskipun sampel sudah mengalami pemrosesan yang berbeda (Mafra *et al.*, 2008; Bottero dan Dalmasso, 2011; Floren *et al.*, 2015). Selain itu, penggunaan PCR dalam analisis makanan telah menyediakan berbagai analitik metode untuk deteksi dan identifikasi cepat pada spesies dan tingkat intra-spesies.

Pendekatan qPCR dengan metode *SYBR green melting curve analysis* (*SYBR green-MCA*) merupakan salah satu metode deteksi dan juga mampu mendiferensiasi daging babi dan daging babi hutan baik pada produk segar maupun olahan. Metode ini memberikan hasil spesifisitas tinggi dengan analisis kurva leleh ampikon (*melting curve analysis*) sehingga mampu membedakan antara babi ternak dan babi hutan.

Tujuan dari pengembangan metode ini adalah mendapatkan metode untuk melakukan identifikasi dan diferensiasi babi ternak dan babi hutan serta menganalisis pola *melting curves* dari kedua spesies tersebut.

MATERI DAN METODE

Materi

Alat yang digunakan antara lain gunting, pinset, *single channel micropipet*, *mini spin down*, dan *real-time thermal cycler Rotor-Gene Q* (Qiagen) dan spektrofotometer nanodrop (Thermo Scientific). Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daging babi ternak (n=7) dan daging babi hutan (n=7), komersial ekstraksi *DNeasy Mericon Food Kit* (Qiagen) untuk ekstraksi DNA, *kit master mix SYBR Select* (Applied Biosystem), *nuclease free water* (Qiagen) dan primer untuk amplifikasi spesifik dari DNA babi 5'-ATG AAA CAT TGG AGT CCT ACT AAT TAC-3' (forward) dan 5'-CTA CGA GGT CGT TTC CGA TAT AAG G-3' (reverse).

Metode

Sampel daging diekstraksi sesuai dengan protokol dari *DNeasy Mericon Food Kit*. DNA hasil ekstraksi dapat langsung digunakan untuk amplifikasi PCR atau disimpan pada suhu -20 °C sampai -80 °C untuk proses selanjutnya. Sebelum masuk pada proses amplifikasi DNA dianalisa dengan menggunakan nanodrop spektrofotometer untuk menghitung kuantitas dan kualitas DNA tersebut. Jumlah DNA yang digunakan dalam pengujian ini disamakan yaitu dihitung sebesar 100 ng/μl baik DNA babi ternak maupun DNA babi hutan. Proses amplifikasi diawali dengan penghitungan template yang terdiri dari *SYBR select master mix* sebanyak 12.5 μl, primer *forward* 2 μl, primer *reverse* 2 μl dan *nuclease free water* 3,5 μl

untuk satu sampel. Amplifikasi DNA dilakukan pada *thermal cycler Rotor-Gene Q*. Program amplifikasi pada metode uji real-time PCR yaitu denaturasi awal 95 °C selama 2 menit, denaturasi 95 °C selama 15 detik, *annealing/extension* 60 °C selama 60 detik, dengan siklus sebanyak 35 kali, *melting point* pada suhu 60 ° - 95 °C selama 90 detik pada tahap pertama dan 5 detik pada tahap selanjutnya dengan pencatatan dilakukan setiap kenaikan 1°C. Deteksi target menggunakan pewarna reporter *SYBR* dengan *channel Green* dan melting menggunakan *SYBR green*. Interpretasi hasil positif dinyatakan apabila sampel DNA menunjukkan adanya amplifikasi pada detection system dengan nilai *cycle threshold* (Ct) serta nilai *melting temperature* (Tm) yang dihasilkan. Untuk *melting curve analysis* software Qx dari Rotor Gene (Qiagen) digunakan untuk mengidentifikasi nilai spesifik Tm dari masing-masing spesies.

HASIL

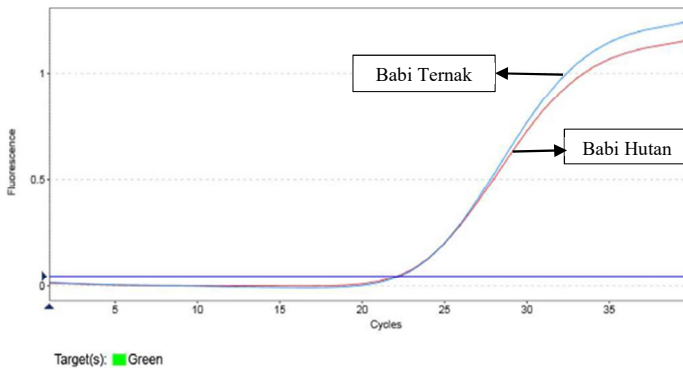
Sampel daging babi ternak (n=7) dan daging babi hutan (n=7) yang sudah diekstraksi DNANYa di analisis terlebih dahulu dengan menggunakan spektrofotometer. Hasil kuantifikasi dan kemurnian dari DNA yang dihasilkan dapat di lihat pada tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi DNA babi ternak dan babi hutan hasil spektrofotometer

Jenis Sampel	n	Rataan Konsentrasi DNA $\pm$ SD (ng/ μ l)	Konsentrasi DNA Min-Max (ng/ μ l)	Rataan Ratio 260/280 nm	Rataan Ratio 260/230 nm
Babi Ternak	7	263,12 $\pm$ 25,30	231,87-301,23	1,86	1,49
Babi Hutan	7	264,70 $\pm$ 51,84	209,35-345,54	1,89	1,65

Dari hasil analisis dengan menggunakan spektrofotometer diperoleh jumlah DNA untuk babi ternak dengan rataannya 263,12 ng/ μ l sedangkan pada babi hutan diperoleh 264,70 ng/ μ l. Berdasarkan hasil analisis dipastikan bahwa DNA hasil ekstraksi sudah sangat mencukupi untuk proses qPCR.

Konfirmasi hasil qPCR bisa dilihat dari *cycle threshold* (Ct) yang menunjukkan pada siklus berapa DNA yang bersifat spesifik mengalami proses amplifikasi. Hasil pengujian dengan qPCR menunjukkan bahwa seluruh sampel teramplifikasi menghasilkan Ct yang berbeda berkisar antara 22,01 - 22,34 sedangkan pada babi hutan berkisar antara 22,19 - 22,54. *Amplification plot* Ct qPCR pada daging babi ternak dan babi hutan dapat dilihat pada Gambar 1. Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa hasil amplifikasi terhadap sampel daging babi ternak dan babi hutan mempunyai nilai yang berdekatan. Adapun rataannya nilai Ct dari seluruh sampel dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 2. Amplification plot cycle threshold (Ct) qPCR untuk babi ternak dan babi hutan dengan konsentrasi DNA 100 µg/ml

Uji t terhadap nilai Ct pada babi ternak dan babi hutan yang diperoleh menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan dalam mendeteksi spesies babi ternak dengan babi hutan menggunakan metode realtime PCR ($p \geq 0.05$).

Tabel 2. Nilai cycle threshold (Ct) babi ternak dan babi hutan dengan qPCR

Jenis Sampel	n	% positif teramplifikasi	Rataan Ct $\pm$ SD	Min-Max Ct	nilai p
Babi Ternak	7	100	22,25 $\pm$ 0,23	22,01 - 22,34	0,1587
Babi Hutan	7	100	22,38 $\pm$ 0,11	22,19 - 22,54	

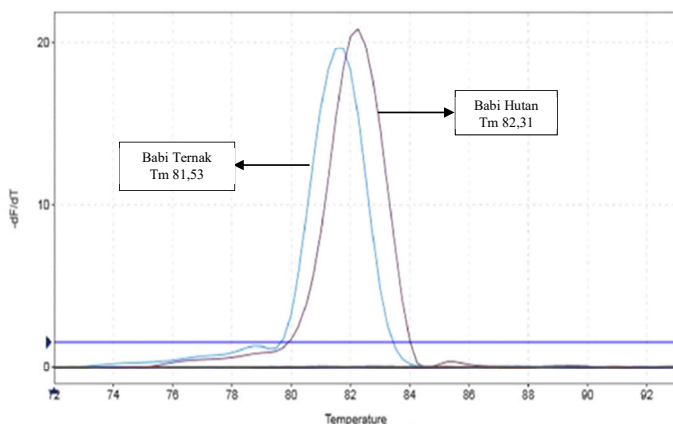
$p > 0.05$ tidak berbeda nyata

Dari hasil analisis melting curve diperoleh bahwa DNA babi ternak melting pada kisaran suhu 81,00-81,51 sedangkan DNA babi hutan berada pada kisaran suhu 82,24-82,3. Secara lengkap hasil dapat dilihat pada tabel 3. Uji t terhadap nilai T_m menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara T_m dari DNA babi ternak dan DNA babi hutan ($p < 0.05$).

Tabel 3. Nilai melting temperature (T_m) babi ternak dan babi hutan dengan Melting Curve Analysis

Jenis Sampel	n	% Genotype	Rataan $T_m \pm$ SD	Min-Max T_m	Nilai p
Babi Ternak	7	100% Babi Ternak	81,42 $\pm$ 0,17	81,00 - 81,51	0,00016
Babi Hutan	7	100% Babi Hutan	82,28 $\pm$ 0,02	82,24 - 82,31	

$p < 0.05$ berbeda nyata



Gambar 2. *Melting curve* untuk babi ternak dan babi hutan dengan metode *SYBR green melting curve analysis*

PEMBAHASAN

Metode qPCR untuk identifikasi spesies telah digunakan dalam berbagai pengujian karena waktu yang digunakan dalam analisa relatif lebih singkat (Sue et al., 2014). Real time PCR memiliki berbagai keunggulan dibanding teknik PCR konvensional yaitu mampu menganalisis sampel dengan jumlah relatif sedikit, mampu menghasilkan data cepat dan akurat, dan mampu menganalisis lebih dari satu gen dalam satu waktu. Prinsip qPCR yaitu pendeteksian amplicon yang terbentuk dengan mengukur peningkatan sinyal fluoresens yang berpendar saat terikat dengan untai DNA ganda. Fluoresens yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah DNA baru yang terbentuk (Reece, 2004).

Sebelum proses amplifikasi, DNA yang diperoleh sebaiknya dihitung dengan menggunakan spektrofotometer. Selain untuk mengetahui kuantitas DNA yang diperoleh proses ini juga mampu mengevaluasi kemurnian DNA untuk mendeteksi kontaminan lain yang mungkin ada. Perhitungan kemurnian yang paling umum adalah rasio absorbansi pada 260/280 nm serta 260/230 nm. DNA berkualitas baik akan memiliki rasio 260/280 nm dengan kisaran 1,7-2,0. Rasio absorbansi 260/230 nm dapat digunakan sebagai ukuran sekunder dari kemurnian DNA atau RNA. Dalam hal ini, rasio antara 2,0 - 2,2 dianggap murni. DNA dengan rasio dibawah dari standar akan menyebabkan terganggunya proses amplifikasi karena menunjukkan banyak kontaminan pada sampel DNA tersebut. Kemurnian DNA yang ideal didapatkan dari proses isolasi DNA adalah 95-100% dengan nisbah absorbansi sebesar 2.00 ± 0.05 (Sambrok dan Russel, 2009). Dari tabel 1 dapat dilihat bahwa hasil pengukuran DNA memperoleh hasil yang cukup baik baik pada daging babi ternak maupun daging babi hutan.

Nilai Ct yaitu siklus dimana fluoresensi mencapai ambang batas atau threshold sehingga terjadi peningkatan signifikan saat pertama kali terdeteksi

(Rodriguez, 2013). Salah satu penyebab mengapa nilai Ct berdekatan adalah adanya kesamaan jumlah DNA yang terkandung dalam sampel tersebut sehingga akan memberikan waktu amplifikasi bersamaan. Banyak metode PCR yang sudah dikembangkan untuk identifikasi spesies babi akan tetapi beberapa metode tidak mampu melakukan diferensiasi antara babi ternak dan babi hutan karena keduanya pada saat dilakukan pengujian secara bersamaan dengan konsentrasi DNA yang sama akan memberikan nilai Ct yang sangat mirip. Oleh karena itu diperlukan suatu analisis tambahan atau analisis post PCR apabila ingin melakukan diferensiasi terhadap beberapa spesies terutama yang mempunyai kemiripan baik secara fenotipe maupun secara genotipe.

Untuk melakukan diferensiasi antara babi ternak dan babi hutan, setelah sampel dianalisa dengan melihat hasil amplifikasi melalui nilai Ct nya, hasil dianalisis dengan menggunakan melting curve analysis dengan melihat nilai melting temperature (T_m) yang dihasilkan. Suhu saat DNA terdenaturasi separuhnya disebut dengan melting temperature (T_m). Saat kondisi ini, absorbansi pada 260 nm akan meningkat sebesar 18.5% yaitu menjadi separuh dari 37% absorbansi denaturasi sempurna. Efek hiperkromik merupakan fenomena yang menjadi penyebab terjadinya peristiwa ini (Chatterjea dan Rana, 2012). Seluruh sampel yang diuji menggunakan qPCR-MCA dianalisis secara deskriptif berdasarkan pola melting curves yang terlihat secara visual dan suhu melt peak yang diperoleh setelah peningkatan suhu pasca amplifikasi PCR sebesar 1°C/detik.

Secara keseluruhan, metode ini dapat mendeteksi dua pola melting curves yaitu dapat membedakan antara babi ternak dan babi hutan dalam satu kali uji PCR seperti yang terlihat pada Gambar 2. Perbedaan T_m juga dapat menunjukkan adanya perbedaan variasi sekuens DNA antar spesies, meskipun perbedaan hanya terletak pada satu atau dua basa saja. keseluruhan kelompok sampel babi ternak memberikan T_m yang berbeda dengan kelompok sampel babi hutan. Dari hasil tersebut dapat diperoleh bahwa dengan melihat nilai T_m maka bisa dilakukan diferensiasi terhadap babi ternak dan babi hutan.

Babi ternak dan babi hutan mempunyai karakteristik protein yang sangat dekat sehingga sulit untuk dibedakan (Hoseinpour et al., 2017). Berdasarkan metode qPCR SYBR Green MCA ini dapat dilakukan diferensiasi terhadap dua spesies ini berdasarkan pada Melting Time yang dihasilkan. Melting Curve Analysis pada SYBR-Green secara luas digunakan untuk menentukan produk non-spesifik yang terbentuk saat proses amplifikasi (Cao dan Shockey, 2012).

Teknik deteksi dan identifikasi spesies, terutama dalam produk pangan asal hewan menjadi sangat penting karena berkaitan dengan kesehatan, ekonomi, dan agama. Daging yang aman dan halal menjadi perhatian utama, terutama bagi komunitas Muslim mayoritas di Indonesia. Babi hutan (*Sus scrofa scrofa*), misalnya, berbeda secara genetik dari babi ternak (*Sus scrofa domestica*) akan tetapi perbedaan tersebut hanya sedikit, untuk melakukan diferensiasi biasanya

dilakukan oleh (sub) identifikasi spesies (Ballin, 2010). Teknik qPCR memiliki keunggulan untuk membedakan antara spesies hewan hanya dengan menggunakan analisis DNA. Kelebihan DNA apabila dibandingkan dengan protein, DNA memiliki stabilitas termal yang lebih tinggi, terdapat di mayoritas sel, dan berpotensi memberikan informasi identik diperoleh dari hewan yang berbeda (Lockley dan Bardsley, 2000). Diferensiasi antara babi ternak dan babi hutan dalam makanan berhasil dilakukan dengan menargetkan dua lokus gen dengan metode qPCR (Kaltenbrunner *et al.*, 2019). Selain itu Sahilah *et al.* (2012), berhasil melakukan diferensiasi dengan metode PCR-*restriction fragment length polymorphism* (RFLP) untuk membedakan gen mitokondria daging babi ternak dan daging babi hutan.

Penggunaan qPCR dengan teknik *SYBR green melting curve analysis* terbukti berhasil dalam mendeteksi, mengidentifikasi dan membedakan DNA babi ternak dengan babi dengan cepat, tepat dan akurat. Teknik qPCR *SYBR green melting curve analysis* dapat menghemat waktu dan biaya analisis karena untuk mendeteksi sampel dari DNA babi ternak dan babi hutan dapat dilakukan dalam satu reaksi sehingga metode ini bisa lebih efisien.

SIMPULAN DAN SARAN

Penggunaan qPCR *multiplex* dengan *SYBR green melting curve analysis* terbukti berhasil dalam mendeteksi, mengidentifikasi dan membedakan DNA babi ternak dengan babi dengan cepat, tepat dan akurat. Teknik qPCR *SYBR green melting curve analysis* dapat menghemat waktu dan biaya analisis karena untuk mendeteksi sampel dari DNA babi ternak dan babi hutan dapat dilakukan dalam satu reaksi sehingga metode ini bisa lebih efisien.

Perlunya dilakukan pengembangan metode *SYBR green melting curve analysis* lebih lanjut untuk mengetahui apakah perbedaan *melting temperature* (T_m) antara babi ternak dan babi hutan pada produk asal hewan yang sudah mengalami pemrosesan (produk olahan) juga memberikan pola yang sama.

DAFTAR PUSTAKA

- Ballin, N.Z. 2010. Authentication of meat and meat products. *Meat Science* 86, 577-587.
- Beuret, C. 2004. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex realtime RT-PCR. *J. Virol. Methods* 115, 1–8.
- Bottero, Maria and Dalmaso, Alessandra. 2011. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *Veterinary journal* (London, England : 1997). 190. 34-38.
- Chatterjea MN and Rana S. 2012. *Textbook of Medical Biochemistry* 8th Ed. New Delhi(IN): Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd.
- Farag MR, Alagawany M, Abd El-Hack ME, Tiwari R, Dhama K. 2015. Identification of different animal species in meat and meat products: trends and advances. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3(6): 334-346.
- Floren C, Kilic I, Brenig B, Schütz E, Beck J. 2015. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). *Food chemistry*. 173. 1054-8.
- Hoseinpour F, Foroughi A, Nomanpour B, Nasab RS. 2017. Identification and differentiation of *Campylobacter* species by high-resolution melting curve analysis. *Microbiol Pathog.* 108: 109-113.
- Hsieh FY, Bloch D, Larsen M. 1998.. A Simple Method of Sample Size Calculation for Linear and Logistic Regression. *Statistics in medicine*. 17. 1623-34.
- Hsieh, Yuch-Ping. 2004. Meat Species Identification. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*. 1. 1-19.
- Hui YH. 2011. *Handbook of Food Science Technology and Engineering* Third Edition. China (CN).
- Kaltenbrunner M, Mayer W, Kerkhoff K. 2019. Differentiation between wild boar and domestic pig in food by targeting two gene loci by real-time PCR. *Sci Rep* 9, 9221 (2019).
- Lockley AK and Bardsley R. 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*. 11. 67-77.
- Mafra I, Silva S, Moreira E, Silva C, Beatriz M, Oliveira PP. 2008. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control*. 19.
- Mouillesseaux KP, Klimpel KR, Dhar AK. 2003. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 111, 121–127.
- Nicolas L, Milon G, Prina E. 2002. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J. Microbiol. Methods* 51, 295–299.
- Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP. 2004. SYBR Green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile virus circumvents false-negative results due to strain variability. *J. Clin. Microbiol.* 42,1511–1518.

- RJ. 2004. *Analysis of Genes and Genomes*. Inggris (EN): Jhon Wiley and Sons Lid.
- Sambrook J and Russell DW. 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.* 2006;2006(1):pdb.prot4455. Published 2006 Jun 1.
- Sahilah, AM, Nazri W, Shahimi S, Yaakob N, Abdullah S, Norrakiah, Abdullah A, Babji, A, Ghani M. 2012. Comparison Between Pork and Wild Boar Meat (*Sus scrofa*) by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). *Sains Malaysiana*. 41. 199-204.
- Shipley GL. 2006. An introduction to realtime PCR, dalam Dorak MT (Ed) *Real-Time PCR*. New Castle (UK): Taylor & Francis Group.
- Skobrák EB, Bodnár K, Jónás E.M, Gundel J, Jávora A. 2011. The Comparison Analysis of the Main Chemical Composition Parameters of Wild Boar Meat and Pork.
- Sue MJ Yeap, Swee Keong, Omar, Abdul Tan, Sheau Wei. 2014. Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *BioMed research international*.