

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keberadaan makanan halal sangat penting di lingkungan masyarakat Indonesia yang mayoritas beragama Islam. Saat ini cakupan makanan halal meliputi segala sesuatu dari mulai proses pembuatan hingga dikonsumsi oleh konsumen, sehingga jaminan kehalalan makanan menjadi suatu keharusan yang bisa diwujudkan dengan memahami proses sertifikasi halal dan memastikan keaslian produk halal (Faridah *et al.*, 2024). Walaupun pemerintah Indonesia telah membuat regulasi dalam penanganan kehalalan pangan agar aman dikonsumsi umat muslim tetap saja masih banyak produsen yang memalsukan produk olahan daging tersebut dan mencampurkan daging non-halal seperti daging babi, daging tikus, maupun daging anjing. Adanya kasus pencampuran daging non halal pada makanan olahan daging salah satunya disebabkan oleh permintaan konsumsi produk daging yang semakin banyak (Nurrusyda *et al.*, 2023).

Kasus pemalsuan makanan daging beberapa kali terjadi di Indonesia. Sebagai contoh, kasus pencampuran daging giling yang dicampur dengan daging babi di Takengon, Aceh pada tahun 2017. Kemudian kasus penjual daging di Tangerang dan di Bandung pada tahun 2020. Kedua pedagang tersebut ditangkap karena menjual daging sapi yang dicampur dengan daging babi (Kumpran, 2020). Selain terjadi di Indonesia, pencampuran daging non halal pada olahan daging juga terjadi di negara lain, seperti daging domba yang dicampur dengan daging tikus yang terjadi di China dan daging sapi yang dicampur dengan daging babi di Turki (Denyinghot *et al.*, 2021). Bukan hanya pada daging potong atau daging giling, di dalam produk daging olahan juga biasanya bercampur dengan daging lain seperti campuran daging udang pada bakso sapi atau produk lainnya. Adanya campuran daging babi atau tikus pada olahan daging tentunya akan menimbulkan beberapa masalah, seperti kepuasan pelanggan, masalah sosial, masalah kesehatan, dan permasalahan agama terutama sebagai negara dengan mayoritas beragama Islam (Cahyadi *et al.*, 2020).

Kasus pemalsuan makanan yang sering terjadi dalam beberapa waktu ke belakang membuat keberadaan alat deteksi makanan halal menjadi penting.

Sulitnya mendeteksi campuran daging non-halal secara langsung membuat urgensi untuk mendeteksi adanya campuran olahan daging non-halal seperti babi dan tikus pada makanan semakin penting. Teknologi yang digunakan untuk mendeteksi olahan daging tentunya harus canggih dan memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi karena teknologi pengelolaan pangan saat ini berpotensi meningkatkan kesulitan dalam memantau komposisi bahan-bahan yang berasal dari hewan (Muflihah *et al.*, 2023). Dengan pengembangan teknologi yang canggih untuk mendeteksi adanya kontaminasi daging babi dan tikus dapat memastikan bahwa konsumen percaya dengan spesifikasi yang tertera pada label produk dan melindungi hak sebagai konsumen (Denyinghot *et al.*, 2021).

Beberapa metode yang telah digunakan di antaranya seperti kromatografi, metode deteksi protein, dan metode analisis DNA (Muflihah *et al.*, 2023; Nurrusyda *et al.*, 2023). Metode analisis DNA termasuk metode yang sering digunakan karena DNA tahan terhadap suhu yang tinggi, dapat dideteksi pada daging yang sudah matang, tahan terhadap tekanan yang tinggi, dan tahan terhadap perlakuan kimia (Cahyadi *et al.*, 2020; Denyinghot *et al.*, 2021). Metode analisis DNA yang paling berkembang dengan cepat dalam beberapa tahun terakhir adalah pendekatan berbasis DNA dengan menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Di antara banyaknya variasi teknik PCR, PCR *multiplex* dinilai lebih efektif dalam mendeteksi adanya kandungan cemaran daging babi dan tikus pada olahan daging karena dapat menggunakan lebih dari satu primer dalam satu tabung, sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi sampel yang lebih besar, menghemat waktu, dan memiliki sensitivitas yang tinggi (Dalmasso *et al.*, 2004). Hal ini tentunya sangat menguntungkan jika dibandingkan dengan PCR konvensional yang hanya bisa mengamplifikasi satu sekuen saja dalam satu tabung.

Ada beberapa pendekatan dari *multiplex* PCR yang digunakan dalam mendeteksi kontaminasi daging babi dan tikus di antaranya adalah *High Resolution Melting Analysis (HRMA) Multiplex PCR* dan *Multiplex PCR Probe Taqman* (Aryati, 2020; Denyinghot *et al.*, 2021; Naully dan Septriliyana, 2022; Muflihah *et al.*, 2023). Kedua teknik ini tentunya memiliki kelebihan dan kekurangannya. HRMA tentunya tidak memerlukan probe spesifik, sehingga lebih sederhana dan

lebih ekonomis. HRMA juga dapat mendeteksi sampel secara cepat dan efisien, dan memiliki sensitivitas tinggi terhadap variasi genetik. Di sisi lain, teknik HRMA ini masih memiliki banyak kekurangan seperti sulitnya kemampuan mendeteksi lebih dari tiga target pada satu reaksi. *Melting profile* dari masing-masing target harus memiliki perbedaan yang cukup signifikan untuk memungkinkan adanya pemisahan yang jelas pada hasilnya. Penerapan HRMA pada setiap sampel lalu perbandingan antar sampelnya akan membutuhkan waktu dan biaya yang lebih banyak (Denyinghot *et al.*, 2021). Oleh karena itu, untuk meningkatkan deteksi sampel babi dan tikus dengan lebih efisien, dilakukanlah metode deteksi dengan menggunakan teknik PCR *multiplex* probe Taqman.

Kuantitatif PCR (qPCR) *Multiplex* dengan menggunakan probe Taqman termasuk dalam teknik yang canggih untuk memungkinkan deteksi simultan beberapa urutan DNA target dalam satu kali reaksi PCR. Teknik ini banyak digunakan dalam berbagai bidang termasuk diagnostik klinis, deteksi, pemantauan lingkungan, dan penelitian genetik. Penggunaan probe Taqman dapat menandakan daerah target dengan lebih mudah karena daerah target tersebut dapat diperbanyak dengan *multiplex* qPCR, sehingga penggunaan probe Taqman dalam qPCR efektif untuk mendeteksi adanya daging babi pada produk makanan olahan daging (Raharjo *et al.*, 2019). Beberapa kelebihan probe Taqman dibandingkan dengan teknik *multiplex* PCR HRMA adalah probe Taqman menggunakan pewarna fluoresen yang diaktifkan ketika probe berhasil berikatan dengan DNA target spesifik dan proses hibridisasinya hanya terjadi pada urutan probe sesuai dengan target DNA, sehingga dapat meningkatkan akurasi deteksi walaupun dalam konsentrasi DNA yang sangat rendah. Penggunaan probe juga memungkinkan deteksi dan kuantifikasi DNA babi secara *real-time*, serta memberikan hasil cepat tanpa memerlukan langkah analisis seperti menggunakan elektroforesis. Tidak adanya langkah tambahan setelah qPCR ini memungkinkan adanya pengurangan risiko kontaminasi. Selain itu, teknik qPCR berbasis Taqman sangat sensitif dan mampu mendeteksi bahkan sejumlah kecil DNA babi yang terkandung di dalam makanan olahan termasuk ketika makanan olahan telah melewati proses

pengolahan yang panjang (Whitecombe *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2020; Sihotang *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2023).

Dalam melakukan teknik qPCR tentunya ada beberapa optimasi yang perlu dilakukan termasuk dalam optimasi hasil qPCR menggunakan alat yang berbeda. Setiap alat tentunya memiliki kelebihan masing-masing dan memiliki tampilan hasil amplifikasi yang berbeda. Perbandingan hasil dari dua alat yang digunakan tentunya akan memiliki perbedaan dan merujuk pada hasil yang paling baik untuk digunakan sebagai sumber analisis data. Spesifisitas dari alat juga menentukan hasil dari tahapan reaksi yang dilakukan. Jika alat dapat mendeteksi hingga konsentrasi DNA yang sangat kecil tentunya sangat mendukung deteksi DNA pada produk olahan ini.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Kusumawaty *et al* (2024) telah dihasilkan primer *multiplex* untuk tikus, babi, sapi, dan ayam yang dilakukan melalui PCR konvensional dan dibedakan secara jelas pada gel agarose 1,5% setelah melewati proses elektroforesis. Penelitian sebelumnya memiliki kekurangan, yaitu kurangnya akurasi deteksi dari hasil elektroforesis PCR konvensional sehingga memungkinkan adanya hasil *false negative* karena bergantung pada pita yang terbentuk dari gel agarose, dan tidak dapat mendeteksi DNA dalam konsentrasi yang rendah karena keterbatasan deteksi konsentrasi DNA rendah melalui teknik elektroforesis. Oleh karena itu, untuk memperbaiki kekurangan tersebut teknik *multiplex* PCR dengan probe taqman pada alat *real-time* digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan pasangan primer *multiplex* dan probe Taqman spesifik untuk mendeteksi DNA tikus, sapi, babi, dan ayam pada sampel DNA jaringan hewan dan DNA makanan olahan daging menggunakan alat *real-time* PCR.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah “Bagaimana merancang pasangan primer *multiplex* dan probe Taqman spesifik yang bisa mendeteksi adanya DNA ayam, sapi, babi dan tikus pada DNA

jaringan hewan dan DNA produk makanan olahan daging melalui qPCR *multiplex*?”

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk menghasilkan pasangan primer *multiplex* dan probe Taqman yang bisa mendeteksi DNA ayam, sapi, babi dan tikus pada DNA jaringan hewan dan produk makanan olahan daging walaupun dalam konsentrasi DNA yang rendah melalui qPCR *multiplex*.

1.4 Pertanyaan Penelitian

- 1) Bagaimana mendesain primer dan probe untuk mendeteksi adanya DNA dari daging tikus, sapi, babi, dan ayam pada produk makanan olahan daging?
- 2) Bagaimana menghasilkan DNA berkualitas yang bisa dideteksi menggunakan alat qPCR?
- 3) Bagaimana menentukan konsentrasi primer dan probe yang baik untuk qPCR?
- 4) Bagaimana membuat formula komposisi sampel yang baik untuk bisa digunakan dalam *multiplex* qPCR probe Taqman?

1.5 Batasan Masalah

- 1) Jenis produk makanan olahan, yaitu nugget, bakso, dan sosis.
- 2) Jenis daging non-halal juga dibatasi menjadi lebih spesifik, yaitu daging babi dan daging tikus.
- 3) Komposisi tambahan pada produk makanan olahan seperti tepung, bumbu tambahan, dan proses pengolahan sampel.
- 4) Persentase campuran daging dalam produk makanan olahan.
- 5) Hasil desain primer dan probe.

1.6 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini terletak pada penerapannya dalam mengembangkan alat deteksi halal menggunakan DNA sampel. Dengan demikian, manfaat penelitian ini mencakup:

1. Aplikasi pengembangan kit deteksi halal untuk makanan dengan menggunakan DNA sampel.

2. Mengembangkan penggunaan probe untuk deteksi DNA target.
3. Mengembangkan variasi teknik PCR menjadi lebih luas salah satunya melalui *multiplex* qPCR menggunakan probe Taqman terutama untuk lembaga yang lebih besar dan aplikasi di masyarakat yang lebih luas.

1.7 Struktur Organisasi Skripsi

Sistematika penulisan dalam skripsi ini tersusun dalam lima bab yang dalam setiap bab akan menguraikan topik skripsi dengan lebih teliti. Secara umum struktur penulisan skripsi dapat ditinjau sebagai berikut:

1. BAB I Pendahuluan

Bab 1 memaparkan tentang latar belakang penelitian, rumusan masalah, pertanyaan penelitian, tujuan penelitian, batasan masalah dan manfaat dari penelitian. Penelitian mengenai deteksi DNA halal ini bertujuan untuk menghasilkan probe Taqman yang dapat mendeteksi adanya DNA babi dan tikus melalui *real-time* PCR pada produk makanan olahan daging. Hal ini tentunya penting untuk mengetahui kandungan daging pada produk makanan olahan daging yang dikonsumsi sehari-hari terutama oleh masyarakat Indonesia yang mayoritas beragama islam. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui batas deteksi konsentrasi DNA dari teknik *multiplex* qPCR menggunakan probe Taqman.

2. BAB II Tinjauan Pustaka

BAB II berisi pemaparan teori yang mendukung penelitian ini berdasarkan studi literatur yang mencakup tentang primer dan probe, standar halal pangan olahan, kontaminasi daging babi dan tikus pada makanan olahan, penanda genetik, penanda molekuler, *multiplex* PCR, dan *real-time* PCR.

3. BAB III Metode Penelitian

BAB III berisi pemaparan metode penelitian yang digunakan, yang mencakup jenis penelitian, waktu dan lokasi penelitian, prosedur penelitian (desain primer dan probe secara *in silico*, simulasi PCR secara *in silico*, isolasi DNA, pengukuran kualitas DNA, PCR konvensional, dan *real-time* PCR), analisis data, dan diagram alir penelitian.

4. BAB IV Temuan dan Pembahasan

BAB IV menyajikan interpretasi temuan yang diperoleh berdasarkan hasil analisis data dan divalidasi dengan pembahasan dari literatur yang mendukung. Temuan penelitian mencakup hasil desain primer dan probe secara *in silico*, simulasi PCR secara *in silico*, hasil isolasi DNA, hasil pengukuran kualitas DNA, hasil validasi PCR konvensional, perbandingan hasil *real-time*, dan hasil analisis *real-time* PCR.

5. BAB V Simpulan, Implikasi, dan Rekomendasi

BAB V menyajikan kesimpulan yang menanggapi tujuan penelitian, implikasi penelitian, dan rekomendasi untuk penelitian selanjutnya.