

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Seiring perkembangan teknologi di industri pangan, semakin banyak makanan olahan daging yang diproduksi dan digemari oleh masyarakat karena harga yang ekonomis dan kemudahan konsumsi. Bagi negara dengan mayoritas penduduk Muslim seperti Indonesia, aspek kehalalan menjadi perhatian khusus dalam produk makanan olahan ini. Halal, yang berarti “diperbolehkan” dalam Islam, mencakup tidak hanya bahan baku tetapi juga proses produksi, penyimpanan, hingga distribusi (Aini *et al.*, 2023). Oleh karena itu, memastikan kehalalan suatu produk merupakan tantangan penting bagi produsen, otoritas pengawas, dan konsumen, terutama mengingat potensi kontaminasi dengan bahan non-halal selama proses produksi (Supian, 2018; Sunardi *et al.*, 2024).

Pasar makanan halal global terus tumbuh dengan pesat, diperkirakan mencapai USD 2,8 triliun pada 2025 atau sekitar Rp 447 kuadriliun rupiah (State of Global Islamic Economy Report, 2022). Di Indonesia sendiri, populasi Muslim yang besar (87,2% dari total penduduk) mendukung perkembangan signifikan pasar halal, yang pada tahun 2022 diperkirakan bernilai USD 144 miliar atau sekitar dua kuintiliun rupiah dengan pertumbuhan tahunan sekitar 7,3% (BPS, 2023; Indonesia Halal Markets Report, 2023). Namun, tingginya kompleksitas rantai pasokan pangan global turut meningkatkan risiko kontaminasi bahan non-halal, baik secara sengaja maupun tidak sengaja, melalui penggunaan bahan tambahan, peralatan produksi yang tercampur, atau distribusi yang tidak terkontrol. Penelitian menunjukkan bahwa sekitar 15% produk makanan olahan di Asia Tenggara berisiko terkontaminasi bahan non-halal selama proses produksinya (Nashirun *et al.*, 2020). Di Indonesia sendiri, penangkapan pengusaha bakso sapi yang tercemar daging tikus kerap ditemukan, salah satunya penangkapan di Mamuju Tengah, Sulawesi Barat, dilansir dari Liputan6.com pada tahun 2020. Selain itu, menurut Kompas.com pada tahun 2017, penggunaan daging celeng pada makanan olahan bakso juga kerap dilakukan demi menghemat biaya produksi, yang mana per minggunya dapat menghabiskan sekitar 300 kilogram daging celeng. Penelitian di

Kota Surabaya juga menemukan 16,67% daging babi pada bakso sapi dari 30 sampel yang diuji (Susilowati, 2020).

Dalam era digital saat ini, penggunaan komputasi *in silico* dalam deteksi *species*, terutama *species* yang digunakan pada olahan makanan di industri makanan halal telah menjadi aspek penting dalam berbagai bidang ilmu pengetahuan, termasuk bioteknologi molekuler. Penelitian *in silico* merujuk pada penggunaan teknik komputasional untuk mensimulasikan dan menganalisis proses biologis, termasuk desain dan optimasi primer untuk PCR. Pendekatan ini memungkinkan peneliti untuk merancang primer yang spesifik dan efisien tanpa perlu eksperimen laboratorium awal, sehingga menghemat waktu dan sumber daya. Dalam konteks desain primer, penelitian *in silico* melibatkan penggunaan perangkat lunak bioinformatika untuk menganalisis sekuens target dan memastikan bahwa primer yang dirancang memenuhi kriteria tertentu, seperti panjang optimal, kandungan GC, suhu leleh (T_m), dan minimisasi pembentukan struktur sekunder seperti *hairpin* atau dimer. Pendekatan *in silico* juga memungkinkan validasi awal dari primer yang dirancang dengan mensimulasikan kondisi PCR dan memprediksi hasil amplifikasi. Hal ini membantu dalam mengidentifikasi potensi masalah sebelum melakukan eksperimen *in vitro* (Sasmitha *et al.*, 2018).

Berbagai metode berbasis DNA, seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR), telah digunakan dalam mendeteksi kontaminasi bahan non-halal pada produk makanan. Metode *Real-Time* PCR, misalnya, telah menunjukkan sensitivitas tinggi dalam mendeteksi kontaminasi DNA babi hingga 0,001% dalam sampel makanan olahan (Tan *et al.*, 2020). Meski demikian, teknik ini membutuhkan optimalisasi suhu leleh (*melting point*) yang tepat agar hasil deteksi akurat dan konsisten, terutama dalam aplikasi *multiplex* (Denyinghot *et al.*, 2021). Desain primer yang spesifik dan efisien merupakan komponen kunci dalam keberhasilan analisis PCR. Penggunaan perangkat lunak memfasilitasi desain primer untuk PCR multipleks, memungkinkan amplifikasi simultan dari beberapa target spesifik dalam satu reaksi. Pendekatan *in silico* dalam desain primer memungkinkan optimalisasi parameter sebelum aplikasi laboratorium, menghemat waktu dan sumber daya (Zahrani *et al.*, 2022).

Salah satu alternatif yang berkembang adalah *High-Resolution Melting Analysis* (HRMA), sebuah metode berbasis PCR yang menggunakan perbedaan suhu leleh untuk mendeteksi variasi DNA spesifik. HRMA memungkinkan identifikasi DNA *species* dalam makanan olahan dengan cepat dan relatif lebih terjangkau karena tidak memerlukan probe tambahan seperti pada *Real-Time* PCR berbasis TaqMan (Garafutdinov *et al.*, 2020). Teknik ini menggunakan pewarna fluoresen yang mengikat DNA beruntai ganda dan menghasilkan kurva leleh yang unik untuk setiap jenis DNA, sehingga perbedaan *species* atau mutasi dapat diidentifikasi berdasarkan profil *melting temperature* (T_m). Selain itu, HRMA memungkinkan analisis *multiplex* dalam satu reaksi, yang dapat mempercepat proses deteksi (Rolando *et al.*, 2020).

Real-Time PCR memanfaatkan pewarna DNA interkalasi untuk mendeteksi DNA beruntai ganda selama amplifikasi. Pewarna seperti SYBR Green I banyak digunakan karena efisiensinya dalam biaya dan kemudahan aplikasi. Namun, keterbatasannya, seperti pengikatan preferensial pada urutan DNA kaya GC dan inhibisi PCR pada konsentrasi tinggi, mendorong penelitian lebih lanjut terhadap alternatif pewarna, seperti SYTO-82. Dengan sensitivitas tinggi dan minim inhibisi, SYTO-82 menawarkan potensi signifikan untuk meningkatkan akurasi dan efisiensi dalam aplikasi *Real-Time* PCR (Gudnason *et al.*, 2007).

HRMA memiliki banyak keunggulan, seperti efisiensi tinggi, kecepatan analisis, dan tidak memerlukan pewarnaan atau label tambahan, sehingga lebih hemat biaya. Teknik ini sangat sensitif dalam mendeteksi variasi genetik, termasuk mutasi, polimorfisme, dan metilasi DNA. HRMA juga dapat dilakukan dalam satu langkah reaksi PCR *Real-Time*, meminimalkan risiko kontaminasi tambahan. Keandalannya dalam menganalisis sampel dengan jumlah kecil dan kemampuannya mendeteksi berbagai variasi genetik menjadikannya metode skrining yang ideal sebelum melakukan analisis lebih lanjut dengan metode lain, seperti sekuensing (Rolando *et al.*, 2020).

Dengan HRMA, hasil dapat diperoleh dalam waktu yang lebih singkat, memungkinkan pengujian lebih banyak sampel dalam waktu terbatas. Selain itu, HRMA memiliki sensitivitas tinggi dengan kemampuan untuk mendeteksi perbedaan kecil dalam urutan DNA, sehingga dapat mengidentifikasi variasi

genetik dengan akurasi tinggi, yang sangat penting dalam konteks identifikasi *species* yang memiliki kesamaan genetik (Monteiro *et al.*, 2021). Pengurangan biaya juga menjadi salah satu keuntungan dari penggunaan HRMA. Dengan mengurangi langkah-langkah analisis tambahan dan mempercepat proses pengujian, HRMA dapat menghemat biaya operasional laboratorium (Dule *et al.*, 2024).

Menurut Alamsyah *et al.* (2019), ayam merupakan *species* yang banyak dibudidayakan di Indonesia sebagai hewan konsumsi dan tingkan konsumsi daging sapi di Indonesia kerap meningkat di tiap tahunnya (Sembor & Tinangon, 2022). Hal ini membuat banyaknya ragam makanan olahan berbahan dasar daging ayam dan sapi yang dikonsumsi masyarakat di Indonesia. Sedangkan menurut Nashirun *et al.* (2020), makanan olahan ini memiliki risiko terkontaminasi daging non-halal seperti babi dan tikus. Oleh karena itu, riset yang dilakukan oleh Kusumawaty *et al.* (2024) telah mengembangkan primer babi, sapi, tikus, dan ayam sebagai penanda makanan halal. Namun riset ini memiliki kekurangan di titik leleh primer keempat *species* tersebut yang mana keempat *species* tersebut memiliki suhu leleh di kisaran 64°C yang menjadikan keempat primer tersebut mengalami *overlap* sehingga tidak dapat diaplikasikan dengan *multiplex Real-Time PCR*. Untuk dapat membedakan amplifikasi dengan *multiplex* primer pada *Real-Time PCR* untuk HRMA, diperlukan primer yang memiliki T_m yang berbeda pada setiap *species*nya (Denyinghot *et al.*, 2021).

Riset terdahulu yang dilakukan Denyinghot *et al.* (2021) telah mengembangkan deteksi *species* non-halal menggunakan metode HRMA yang mana *species* yang diteliti adalah *species* keledai, kucing, babi, tikus, anjing, dan monyet. Deteksi DNA ini menggunakan primer yang telah didesain secara presisi agar memiliki *melting temperature* (T_m) yang berbeda pada setiap *species*nya agar dihasilkan kurva yang memiliki pola T_m pada setiap *species*. Sehingga diperlukan penelitian yang merujuk pada daging olahan yang umum dikonsumsi di Indonesia namun memiliki risiko kontaminasi daging non-halal seperti ayam, babi, sapi, dan tikus dengan primer yang didesain khusus di perbedaan T_m untuk HRMA *Multiplex Real-Time PCR* (Alamsyah *et al.*, 2019; Sembor & Tinangon, 2022; Nashirun *et al.*, 2020).

Dalam *Real-Time* PCR, diperlukan juga kontrol internal yang direaksikan bersamaan sebagai *multiplex*. Fungsi kontrol internal dalam *Real-Time* PCR antara lain untuk memastikan validitas dan reliabilitas hasil deteksi dan kuantifikasi ekspresi gen. Kontrol ini berperan dalam mengoreksi variasi yang mungkin terjadi selama proses isolasi RNA, sintesis cDNA, atau reaksi amplifikasi, sehingga hasil akhir dapat dinormalisasi dan terhindar dari kesalahan interpretasi akibat perbedaan kualitas serta kuantitas sampel yang diuji (Yu *et al.*, 2023). Pada praktiknya, kontrol internal umumnya berupa gen rujukan atau sekuens spesifik yang harus stabil ekspresinya di semua kondisi percobaan. Relevansi kontrol internal sangat tinggi, karena tanpa normalisasi yang tepat, fluktuasi teknis dapat menutupi perbedaan nyata dalam ekspresi gen target (Moldovan & Moldovan, 2020). Salah satu contoh aplikasi khusus adalah penggunaan vektor pGEM-t sebagai pembawa kontrol internal yang memungkinkan pembentukan sekuens RNA atau DNA standar melalui transkripsi *in vitro* sehingga memudahkan verifikasi dengan amplifikasi spesifik PCR, serta sering dimanfaatkan dalam pengembangan standar kuantitatif (Naidenova *et al.*, 2021; Zambenedetti *et al.*, 2017).

Penelitian ini memiliki relevansi besar dengan bidang *food safety*, *halal authentication*, dan bioteknologi molekuler. Kontribusi *multiplex* HRMA dalam mendukung regulasi pangan sangat signifikan, terutama di wilayah dengan persyaratan halal/kosher, juga dapat membantu produsen dan distributor dalam memastikan keaslian produk hewani, serta mencegah pemalsuan yang dapat merugikan konsumen (Zahrani *et al.*, 2022). Potensi peningkatan metode deteksi *species* menggunakan HRMA dibandingkan metode tradisional terlihat jelas dari berbagai studi yang menunjukkan keakuratan dan efisiensi teknik ini. HRMA menawarkan keunggulan dalam hal kecepatan dan efisiensi, di mana proses analisisnya lebih cepat dibandingkan dengan metode konvensional seperti elektroforesis gel, yang memerlukan waktu tambahan untuk visualisasi hasil (Monteiro *et al.*, 2021).

Penelitian ini juga berkontribusi pada kebijakan pangan dengan memberikan data yang relevan mengenai autentikasi produk hewani. Dengan meningkatnya kesadaran masyarakat tentang pentingnya kehalalan dan keamanan pangan, hasil dari penelitian ini dapat digunakan untuk pengembangan regulasi yang lebih ketat

terkait kehalalan dan keamanan produk hewani. Selain itu, hasil penelitian dapat digunakan untuk meningkatkan kesadaran konsumen tentang pentingnya keaslian produk makanan serta mengedukasi mereka mengenai cara-cara untuk memastikan bahwa produk yang mereka konsumsi memenuhi standar halal. Dengan demikian, penelitian ini tidak hanya memberikan kontribusi ilmiah tetapi juga implikasi praktis yang luas bagi industri pangan dan masyarakat secara keseluruhan (Rahayu & Yusup, 2022).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka rumusan masalah pada penelitian ini yaitu “bagaimana cara mendesain dan mengoptimasi primer dengan perbedaan *melting temperature* (T_m) yang spesifik untuk deteksi DNA daging ayam, sapi, babi, tikus, dan kontrol internal untuk makanan olahan dengan metode HRMA *Multiplex Real-Time* PCR secara *in silico*?”.

1.3. Pertanyaan Penelitian

1. Bagaimana mendesain dan mengoptimasi primer *multiplex* berbasis *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) secara *in silico* untuk mendeteksi DNA daging ayam, sapi, babi, tikus, serta plasmid pGEM-t sebagai kontrol internal?
2. Apakah primer yang telah dirancang memiliki spesifisitas tinggi tanpa amplifikasi silang, serta menghasilkan perbedaan suhu leleh (T_m) yang cukup terpisah sehingga memungkinkan diskriminasi masing-masing *species* target dalam sistem HRMA *multiplex*?

1.4. Batasan Penelitian

1. Penelitian ini hanya dirancang untuk mendeteksi empat *species* tertentu yaitu daging babi (*Sus scrofa* dan *Sus scrofa domesticus*), tikus (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*, dan *Rattus argentiventer*), ayam (*Gallus gallus*), dan sapi (*Bos taurus*), serta kontrol internal dari sekuens sintetik. Tidak dapat digunakan untuk mengidentifikasi *species* lain.
2. Penelitian ini hanya menggunakan data genom mitokondria yang tersedia di *GeneBank* NCBI. Jika terdapat keterbatasan data atau variasi genetik antar *species* yang belum terdaftar, hasil desain primer mungkin tidak sepenuhnya mencakup seluruh variasi genetik.

3. Seluruh proses dilakukan secara *in silico* tanpa verifikasi eksperimental. Oleh karena itu, dapat terjadi perbedaan pada efektivitas primer yang dirancang dalam kondisi laboratorium nyata karena adanya faktor-faktor seperti kontaminasi, kesalahan *pipetting*, atau variasi reagen.
4. Validasi spesifisitas primer hanya dilakukan dengan perangkat lunak seperti *PrimerPooler*, *Sequence Manipulation Suite*, BLAST, dan uMELT. Pengujian spesifisitas pada sampel DNA asli tidak termasuk dalam penelitian ini.
5. *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) bergantung pada prediksi nilai *melting temperature* (T_m) yang dilakukan secara *in silico*. Nilai T_m yang dihasilkan mungkin tidak selalu sama dalam kondisi eksperimental karena faktor lingkungan, alat, atau reagen.
6. Penelitian ini tidak mempertimbangkan pengaruh DNA yang mengalami degradasi atau kontaminasi yang dapat memengaruhi hasil amplifikasi dalam aplikasi nyata.

1.5. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yakni untuk mendesain primer optimal yang dapat digunakan untuk qRT-PCR metode HRMA dalam mendeteksi DNA daging ayam, babi, sapi, dan tikus.

1.6. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat sebagai pengembangan metode deteksi kehalalan produk pangan olahan berbasis identifikasi DNA, sehingga dapat membantu mencegah kontaminasi silang bahan haram dan mendukung jaminan mutu produk sesuai ketentuan syariat dan regulasi.

1.7. Struktur Penulisan Skripsi

Penulisan skripsi ini secara umum tersusun berdasarkan struktur organisasi berikut:

1) BAB I

Bab ini menjelaskan fenomena dan urgensi yang menjadi latar belakang penelitian mengenai deteksi daging non-halal pada produk pangan, rumusan masalah, pertanyaan penelitian, batasan penelitian, tujuan penelitian, manfaat penelitian, dan struktur penulisan skripsi.

2) BAB II

Bab ini menguraikan teori dan literatur yang mendukung penelitian, termasuk definisi halal, prinsip-prinsip metode deteksi DNA seperti HRMA dan qRT-PCR, penelitian *in silico*, serta penelitian terdahulu yang relevan.

3) BAB III

Bab ini menjelaskan jenis penelitian, waktu dan lokasi penelitian, alur penelitian, serta alat dan bahan yang digunakan. Prosedur penelitian yang mencakup tahap pemilihan data genom, perancangan primer, pemilihan primer, simulasi PCR dan visualisasi T_m , simulasi kompatibilitas primer, serta analisis data dijelaskan secara mendetail.

4) BAB IV

Bab ini memaparkan hasil penelitian yang diperoleh selama proses perancangan dan optimalisasi primer *multiplex* untuk HRMA, serta membahas temuan tersebut secara mendalam. Pembahasan meliputi perbandingan dengan teori dan penelitian sebelumnya, analisis molekuler primer, serta interpretasi hasil melting temperature (T_m) dan kurva amplifikasi DNA secara *in silico*. Data hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel dan/atau gambar untuk memudahkan pemahaman.

5) BAB V

Bab ini memuat kesimpulan dari hasil penelitian untuk menjawab rumusan masalah, yaitu cara mendesain dan mengoptimasi primer dengan perbedaan melting temperature (T_m) yang spesifik untuk deteksi DNA daging ayam, sapi, babi, tikus, dan kontrol internal untuk makanan olahan dengan metode HRMA *Multiplex Real-Time PCR* secara *in silico*. Bab ini juga mencantumkan saran-saran bagi penelitian lanjutan untuk pengembangan metode yang lebih efektif.