

JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER

Volume 9, 2022



JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
VOLUME 9, 2022

ISSN:2502-0463

JURNAL

KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER
VOLUME 9, 2022

Penanggung jawab : drh. Nasirudin, M.Sc

Redaktur : drh. Rr. Anik Winaningrum
drh. Diyan Cahyaningsari, M.Si
drh. Wiwit Subiyanti

Editor : Dr. drh. Puji Rahayu
drh. Hanif Anisatun
drh. Thufeil Yunindika, M.Si

**Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan
2022**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadapan Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat rahmat-Nya Jurnal Ilmiah Kesehatan Masyarakat Veteriner Volume 9 tahun 2022 dapat diselesaikan tepat pada waktunya.

Jurnal ilmiah ini disusun dari tulisan ilmiah staf Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan sesuai dengan keahlian dan bidang masing-masing. Dalam penyusunan jurnal ilmiah ini, masing-masing penulis mendapat banyak bantuan, masukan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak.

Tim jurnal ilmiah BPMSPH menyadari bahwa jurnal ilmiah ini masih jauh dari sempurna dan perlu adanya tulisan-tulisan lebih lanjut. Oleh karena itu, tim jurnal ilmiah mengharapkan kritik dan saran dari pembaca yang bersifat konstruktif demi kesempurnaan jurnal ilmiah ini. Tim jurnal ilmiah berharap semoga gagasan dan juga data pada jurnal ilmiah ini dapat bermanfaat bagi dunia keamanan pangan pada khususnya dan pembaca pada umumnya.

Tim Jurnal Ilmiah BPMSPH

DAFTAR ISI
JURNAL KESEHATAN MASYARAKAT VETERINER BPMSPH
VOLUME 9 TAHUN 2022
ISSN:2502-0463

Validasi Metode Identifikasi DNA Kerbau (*Bubalus Bubalis*) Menggunakan Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Ellena Adinda Putri, Puji Rahayu.....1-9

Analisa Data Pengujian *Escherichia coli* pada Daging Ayam di Wilayah Penyangga DKI Jakarta pada tahun 2019

Monika Danaparamitha Andriani.....10-17

Identifikasi Extended-Spectrum Beta-Lactamase Penyebab Resistensi Antibiotik Ceftazidim dan Cefotaxim pada Isolat *Escherichia coli* dari Sekum Ayam Broiler Tahun 2018-2020

Ajeng Herpianti Utari, Oli Susanti, Attya Asuh Insani, Sani Susanty.....18-21

Identifikasi Fragmen DNA Babi pada Sampel Gelatin Menggunakan Metode Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Septiana Kurnia Putri, Puji Rahayu.....22-28

Verifikasi Metode Pengujian Enterobacteriaceae Berdasarkan ISO 16140-3:2021

Ika Kartika Syarifah, Zeze Zakiah, Mohammad Gaody, Kanti Puji Rahayu, Ery Novarieta.....29-33

Validasi Metode Pengujian Penyakit Mulut dan Kuku Menggunakan Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Hanif Anisatun, Innes Mauldya, Puji Rahayu.....34-39

Validasi Metode Identifikasi DNA Kerbau (*Bubalus Bubalis*) Menggunakan Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Ellena Adinda Putri¹ ; Puji Rahayu^{2*}

¹ Mahasiswa Program Sarjana Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

²Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

Email korespondensi : puji_latif@yahoo.co.id

ABSTRACT

There are many cases of fraud meat-based food products found in society. Meat substitution with an unsecured meat, usually of less quality, could have economic and health repercussions. Identification of species utilizing the multiplication of target DNA molecules in a single reaction can be carried out by real-time PCR. This research was aimed to validate the real-time polymerase chain reaction (qPCR) method for identifying buffalo DNA on animal food product. The qPCR method with SYBR green melting curve analysis was used as a validation test for the buffalo DNA method using the commercial kit QIAGEN DNeasy Food Mericon Kit. The method validation parameters used in this study were repeatability, reproducibility, limit of detection, and specificity. The results showed that on repeatability validation parameters were 100% amplified positive samples while for unamplified negative samples, the t test results on the Ct and Tm values of buffalo DNA reproducibility parameters showed that there was no significant difference in detecting buffalo DNA in two examination with using the qPCR method, the detection limit value for buffalo specific PCR was 0,0625%, and there was no cross-reaction between DNA species in the specificity test. The qPCR method can be used as a testing method to identify the DNA of unwanted species in food of animal origin circulating in the community, especially related to meat adulteration.

Keywords: adulteration, buffalo, DNA, PCR, validation

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara dengan jumlah penduduk yang tinggi, sehingga sangat berdampak langsung terhadap jumlah konsumsi protein hewani khususnya daging dan produk olahannya. Jumlah penduduk yang tinggi ini mengakibatkan jumlah produksi daging dalam negeri belum mampu untuk mencukupi kebutuhan protein hewani yang tinggi. Kebutuhan daging yang tinggi namun tidak diimbangi dengan ketersediaan daging mengakibatkan banyak terjadi pemalsuan daging (Raharjo *et al.* 2019). Pemalsuan produk makanan olahan berbahan dasar daging menjadi masalah pangan yang ada di Indonesia, pemalsuan daging juga sering ditemui di lingkungan masyarakat secara luas dan semakin mengkhawatirkan (Margawati dan Ridwan 2010). Salah satu upaya penjaminan mutu dan keamanan pangan asal hewan dilakukan dengan cara pengembangan metode analisis DNA untuk menemukan adanya indikasi cemaran dalam suatu produk makanan olahan. Salah satunya adalah dengan metode reaksi rantai polimerase (PCR) (Matsunaga *et al.* 1999). Beberapa metode uji lainnya yang digunakan untuk mendeteksi adanya kandungan pemalsuan dan kehalalan pada produk pangan saat ini antara lain *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Asensio *et al.* 2008; Kuswandi *et al.* 2017), *electronic nose* (enose), *gas chromatography mass spectrometer with headspace analyzer* (GCMS-HS) (Nurjuliana *et al.* 2011; Kuswandi *et al.* 2017), imunokromatografi atau yang dikenal sebagai rapid test (Kuswandi *et al.* 2017), *DNA hybridization* (Ballin *et al.* 2009) serta *liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS) (Kleinnijenhuis *et al.* 2018).

Validasi adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut telah memenuhi persyaratan untuk digunakan. Validasi metode dilakukan untuk menentukan apakah hasil analisis suatu metode telah sah dan dapat dipertanggungjawabkan. Validasi metode ekstraksi DNA berguna untuk memastikan bahwa hasil ekstraksi yang dihasilkan sah terhadap parameter-parameter uji validasi yang dilakukan, sehingga didapatkan mutu DNA yang baik serta hasil analisis DNA yang baik dan sah (Gandjar dan Rohman 2007).

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH), Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian Republik Indonesia yang beralamat di Jl. Pemuda nomor 29A, Tanah Sareal, Kecamatan Tanah Sareal, Kota Bogor, Jawa Barat.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian adalah gunting, pinset, mikropipet volume 10-100 μ L dan 100-1000 μ L, tabung ukuran 1,5 dan 2 mL, *thermomixer*, *mini spin*, *tube shaker*, *minispinner*, *minisentrifuge*, timbangan digital, rak tabung, cawan petri, dan *real-time thermal cycler Rotor-Gene Q*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daging kerbau, daging ayam, DNA ayam, DNA kambing, DNA tikus, DNA sapi, DNA babi, kit komersial ekstraksi *Dneasy Mericon Food Kit*, *lysis buffer*, *proteinase K*, *binding buffer*, *pre-wash buffer*, *wash buffer*, *elution buffer*, dan kit komersial master mix *SYBR Select real-time PCR Kit*, *primer gen Bubalus bubalis* (*primer forward* 5'-TTC TTC AGG GCC ATC TCA TC-3' dan *primer reverse* 5'-TGC AAT AAG CAT CTA GGG AGA A-3').

Pengolahan Sampel Daging

Sampel yang digunakan adalah daging kerbau bagian tenderloin (*musculus psoas mayor*) dan otot bagian dada dari ayam. Jumlah daging kerbau yang digunakan sebanyak 5 g dan daging ayam sebanyak 600 g. Sampel kemudian dicincang hingga sesuai dengan standar dari *Dneasy Mericon Food Kit*. Sampel daging dibagi menjadi kontrol positif, sampel positif, kontrol negatif, dan *Limit of Detection* (LOD). Setelah daging dicincang, daging ditimbang menggunakan neraca analitik dengan ketelitian 0,0001 g. Kontrol positif dibuat menggunakan 100% daging kerbau sebanyak 2 g sedangkan kontrol negatif dibuat menggunakan 100% daging ayam sebanyak 2 g, kemudian kedua sampel kontrol tersebut dimasukkan ke dalam *mini tube eppendorf* dengan volume 2 mL. Pembuatan sampel positif sebanyak 7, sampel dimasukan ke dalam tube volume 2 mL dengan perbandingan daging kerbau sebanyak 1 g dan daging ayam sebanyak 9 g. Jumlah sampel LOD yang digunakan sebanyak 7. Jumlah sampel daging kerbau sebanyak 10 g dan sampel daging ayam sebanyak 500 g. Perbandingan jumlah antara daging kerbau dan daging ayam dalam tiap sampel LOD dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan jumlah antara daging kerbau dan daging ayam pada tiap sampel LOD.

| Sampel | Daging kerbau | Daging ayam | Jumlah |
|--------|---------------|-------------|--------|
| LOD 1 | 1 % | 99 % | 2 |
| LOD 2 | 0,5 % | 99,5 % | 2 |
| LOD 3 | 0,25 % | 99,75 % | 2 |
| LOD 4 | 0,125 % | 99,875 % | 2 |
| LOD 5 | 0,0625 % | 99,9375 % | 2 |
| LOD 6 | 0,0312 % | 99,9688 % | 2 |
| LOD 7 | 0,0156 % | 99,9844 % | 2 |

Ekstraksi DNA

Sampel daging diekstraksi sesuai prosedur standar dari *Dneasy Mericon Food Kit*. Sebanyak 0,2 g sampel daging dimasukan ke dalam 2 mL *sentrifuge tube*, ditambahkan 1 mL *food lysis buffer* dan 2,5 μ L *proteinase K solution*. Sampel dihomogenkan menggunakan *tube shaker* kurang lebih 15 detik untuk memastikan sampel tercampur rata, kemudian sampel diinkubasi pada *thermomixer* selama 30 menit pada suhu 60 °C dengan kecepatan 1000 rpm. Setelah diinkubasi sampel dikeluarkan dan didinginkan pada suhu ruang (15 °C-25 °C) lalu disentrifugasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 2500 x g. Hasil sampel yang telah disentrifugasi kemudian diambil 700 μ L cairan supernatant dan dipindahkan ke dalam 2 mL tabung *microsentrifuge* yang sebelumnya telah diberi 500 μ L kloroform. *Receiver tube* disentrifugasi dengan spin filter pada 14000 rpm selama 15 menit. Buffer PB ditambahkan sebanyak 350 μ L ke dalam 2 mL tabung *microsentrifuge* baru lalu ditambahkan sampel yang sudah disentrifugasi selama 15 menit sebanyak 350 μ L, kemudian sampel dihomogenkan menggunakan *tube shaker* selama 15 detik untuk memastikan sampel tercampur dengan rata. Sampel dipindahkan ke dalam 2 ml tabung *QIAquick spin column*, lalu disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14000 rpm, setelah sampel telah disentrifugasi kemudian debris pada bagian bawah tabung dibuang, lalu ditambahkan 500 μ L buffer AW ke dalam tabung dan disentrifugasi kembali selama 2 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Sampel dipindahkan kembali ke dalam 2 mL tabung

microsentrifuge dan ditambahkan 150 μ L *elution buffer*, Sampel diinkubasi dalam suhu ruang selama 1 menit dan disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Setelah disentrifugasi sampel DNA yang telah diekstrak selanjutnya digunakan untuk diamplifikasi.

Pengujian Sampel Menggunakan Real-Time PCR

Proses amplifikasi diawali dengan penambahan *master mix* PCR menggunakan *buffalo SYBR Select real-time* PCR Kit. Amplifikasi DNA dilakukan pada *thermal cycler Rotor-Gene Q*. Program amplifikasi pada metode uji *real-time* PCR yaitu denaturasi awal (HOLD) 95 °C selama 2 menit, denaturasi 95 °C selama 30 detik, *annealing/extension* 60 °C selama 60 detik, dengan siklus sebanyak 30 kali, *melting point* pada suhu 65 ° - 95 °C selama 90 detik pada tahap pertama dan 5 detik pada tahap selanjutnya (*Applied Biosystem*). Seluruh sampel pengujian dilakukan *replicate/duplo*. Deteksi target menggunakan pewarna reporter FAM dengan *channel Green* (FAM) dan *melting* menggunakan *SYBR green*. Setelah disentrifugasi sampel DNA yang telah diekstrak selanjutnya digunakan untuk diamplifikasi.

Analisis Data

Pengujian metode validasi dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan 4 parameter, yaitu keseksamaan (*precision*) yang meliputi *repeatability* dan *reproducibility*, batas deteksi (*limit of detection*) dan selektivitas (*specificity*). Interpretasi hasil positif pada parameter *repeatability* dan spesifisitas dinyatakan apabila sampel DNA menunjukkan adanya amplifikasi pada *detection system* dengan nilai *cycle threshold* (Ct) <35 dan memperhitungkan *melting curve*. Hasil dinyatakan negatif apabila sampel DNA tidak menunjukkan adanya amplifikasi pada *detection system*. Parameter *reproducibility*, melibatkan perhitungan sederhana menggunakan *analysis tools* dari *Microsoft excel* untuk mencari nilai p terhadap dua pengujian. Nilai p yang besar dari 0,05 ($p > 0,05$) menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan secara nyata dalam mendeteksi keberadaan DNA kerbau pada sampel, namun jika nilai p lebih kecil dari 0,05 ($p < 0,05$) maka terdapat perbedaan nyata dalam mendeteksi keberadaan DNA kerbau. *Limit of Detection* dapat ditentukan dengan melihat nilai LOD yang masih dapat menunjukkan nilai serapan terakhir pada alat (Sumarno dan Kusumaningtyas 2018).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi Metode Analisis

Penelitian ini menggunakan 4 parameter validasi metode analisis yaitu, *repeatability*, *reproducibility*, limit deteksi dan spesifisitas. Hal ini disebabkan pengujian bersifat kualitatif atau lebih sederhana. Validasi terhadap suatu metode analisa menjadi faktor yang penting karena metode analisa yang telah dibuktikan hasil pengukurannya dapat dipertanggung jawabkan dan dipergunakan sebagai landasan dalam pengujian berikutnya.

Repeatability

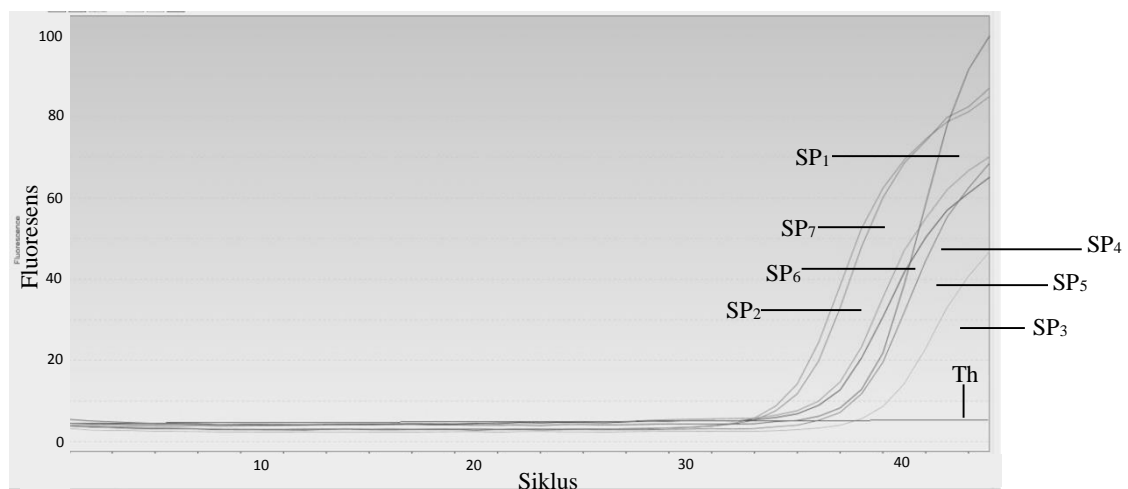
Pengujian *repeatability* menggunakan dua kelompok sampel. Kelompok sampel positif menggunakan campuran DNA kerbau dan DNA ayam dengan jumlah sampel yang dievaluasi sebanyak 7 sampel, sedangkan untuk kelompok sampel negatif menggunakan 100% DNA ayam. Hasil uji *repeatability* dari seluruh sampel dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil pengujian terhadap kelompok sampel positif dengan qPCR menunjukkan bahwa seluruh sampel DNA teramplifikasi pada *detection system* dengan rata-rata nilai *cycle threshold* (Ct) yang dihasilkan sebesar 29,91. Hasil pengujian terhadap kelompok sampel negatif yang digunakan dalam penelitian ini tidak memperlihatkan adanya amplifikasi sehingga tidak ada nilai Ct yang dihasilkan. Setelah sampel dianalisa dengan melihat hasil amplifikasi melalui nilai Ct, hasil dianalisis dengan menggunakan *melting curve analysis* dengan melihat nilai *temperature melting* (Tm) yang dihasilkan. Hasil dari pengujian kelompok sampel positif pada *temperature melting* (Tm) didapatkan hasil bahwa seluruh sampel positif 100% teramplifikasi dengan nilai rata-rata Tm yang diperoleh yaitu 75,28 sedangkan seluruh sampel negatif tidak menunjukkan adanya proses amplifikasi sehingga tidak ada nilai Tm yang dihasilkan. Metode *real-time* PCR pada pengujian *repeatability* mampu mendeteksi DNA kerbau pada seluruh sampel yang mengandung daging kerbau. Hal ini dapat dilihat dari hasil amplifikasi yang dihasilkan oleh kelompok sampel positif pada pengujian Ct dan Tm. Pengujian ini sesuai dengan pernyataan Nicolas *et al.* (2002), bahwa *real-time* PCR dengan adalah teknik sederhana yang dapat diandalkan dan terbukti efektif untuk deteksi dan identifikasi spesies. Kurva *real time* PCR hasil amplifikasi uji *repeatability* dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 2 Hasil uji *repeatability* menggunakan *real-time* PCR

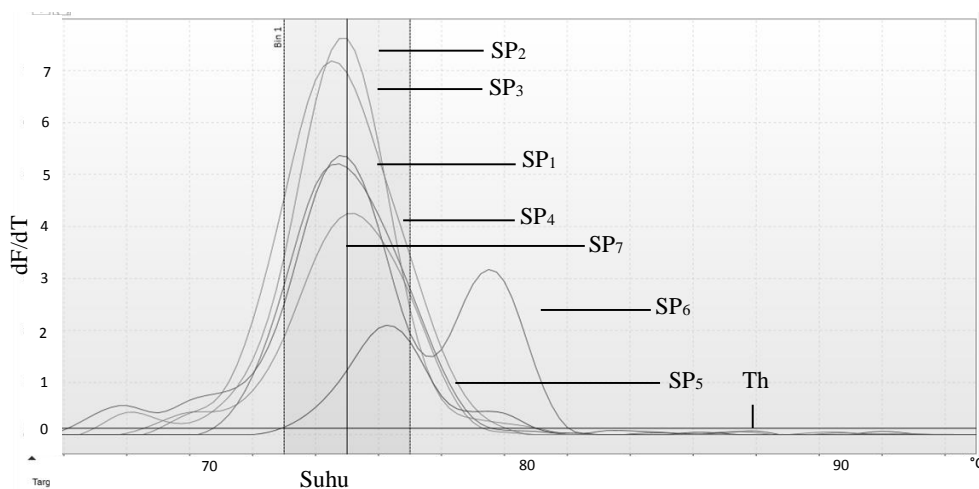
| Jenis Sampel | Ct ¹⁾ | Tm ²⁾ |
|---|------------------------------------|------------------------------------|
| Sampel Positif | | |
| Sampel 1 | 33,66 | 75,3 |
| Sampel 2 | 30,41 | 75,8 |
| Sampel 3 | 26,20 | 75,6 |
| Sampel 4 | 28,47 | 75,3 |
| Sampel 5 | 28,65 | 74,6 |
| Sampel 6 | 29,43 | 75,1 |
| Sampel 7 | 32,59 | 75,3 |
| Rataan Ct/Tm \pm SD³⁾ | 29,91 \pm 2,55 | 75,28 \pm 0,38 |
| Min-Max Ct/Tm⁴⁾ | 26,2 – 33,66 | 74,6 – 75,8 |
| Sampel Negatif | | |
| Sampel 1 | No Ct ⁵⁾ | No Tm ⁶⁾ |
| Sampel 2 | No Ct | No Tm |
| Sampel 3 | No Ct | No Tm |
| Sampel 4 | No Ct | No Tm |
| Sampel 5 | No Ct | No Tm |
| Sampel 6 | No Ct | No Tm |
| Sampel 7 | No Ct | No Tm |
| Rataan Ct/Tm \pm SD | - | - |
| Min-Max Ct/Tm | - | - |
| Keterangan = 1) Ct = <i>Cycle threshold value</i> , terjadi amplifikasi | | |
| 2) Tm = <i>Temperature melting</i> , terjadi amplifikasi | | |
| 3) Rataan Ct/Tm \pm SD = Nilai rata-rata Ct (<i>cycle threshold value</i>) dan Tm (<i>temperature melting</i>) ketujuh sampel dan nilai standar deviasinya. | | |
| 4) Min-Max Ct/Tm = Nilai minimum dan maksimum Ct (<i>cycle threshold value</i>) dan Tm (<i>temperature melting</i>) | | |
| 5) No Ct = Tidak terjadi amplifikasi | | |
| 6) No Tm = Tidak terjadi amplifikasi | | |

Gambar Kurva pada Gambar 1 menunjukkan terjadi atau tidaknya amplifikasi di dalam *thermal cycler*. Hasil amplifikasi terhadap 7 sampel positif DNA kerbau mengalami proses amplifikasi dengan nilai Ct pada ketujuh sampel yang berdekatan. Salah satu penyebab mengapa nilai Ct berdekatan adalah adanya kesamaan jumlah DNA yang terkandung dalam sampel tersebut sehingga akan memberikan waktu amplifikasi bersamaan (Yanti 2017). Sampel positif 7 (Sp7) pada grafik terlihat mengalami kenaikan amplifikasi paling tinggi, sedangkan untuk sampel positif 3 (Sp3) mengalami kenaikan amplifikasi paling rendah. Hal ini menunjukkan bahwa pada Sp7 memiliki konsentrasi DNA yang tinggi, sehingga kurva amplifikasi mengalami peningkatan yang signifikan saat terdeteksi (Yanti 2017). Sebaliknya pada Sp3 mengalami kenaikan amplifikasi yang rendah dikarenakan konsentrasi DNA yang diekstrak sedikit. Selain menganalisis grafik amplifikasi, pengujian *repeatability* juga dilakukan dengan menganalisis kurva *melt curve* dengan melihat *melt peak* (puncak leleh) dan nilai Tm (*temperature melting*). Kurva *melting curve* pada pengujian *repeatability* dapat dilihat pada Gambar 2.



Keterangan : 1) SP₁= Sampel Positif 1; 2)SP₂= Sampel Positif 2; 3)SP₃= Sampel Positif 3; 4)SP₄= Sampel Positif 4; 5)SP₅= Sampel Positif 5; 6)SP₆= Sampel Positif 6; 7)SP₇= Sampel Positif 7; 8)Th= *baseline threshold*

Gambar 1 Kurva *real time* PCR hasil amplifikasi uji *repeatability*



Keterangan : 1)SP₁= Sampel Positif 1; 2)SP₂= Sampel Positif 2; 3)SP₃= Sampel Positif 3; 4)SP₄= Sampel Positif 4; 5)SP₅= Sampel Positif 5; 6)SP₆= Sampel Positif 6; 7)SP₇= Sampel Positif 7; 8)Th= baseline threshold

Gambar 2. *Melting curve real-time PCR uji repeatability*

Seluruh sampel dianalisa menggunakan qPCR-MCA serta dianalisis secara deskriptif berdasarkan pola *melting curves* yang terlihat secara visual dan suhu *melt peak* yang diperoleh setelah peningkatan suhu pasca amplifikasi PCR. Hasil pada Gambar 2 menunjukkan pola *melting point (peak)* pada ketujuh sampel memiliki titik leleh dengan suhu yang berbeda-beda namun tetap berada pada rentang *melt curve* yang sama. Hasil pada sampel positif 6 (Sp6) memiliki puncak leleh yang berbeda dibandingkan sampel positif lainnya, hal ini menandakan adanya primer-dimer (sesama primer yang saling berikatan), dimana terbentuk suatu DNA untai ganda yang sangat pendek. Meskipun nilai *temperature melting* (Tm) pada Sp6 terdapat adanya primer dimer, namun hasil amplifikasi yang dihasilkan oleh metode *real-time PCR* amplikonnya berasal dari DNA target yang sama, sehingga nilai Tm yang dihasilkan tidak berpengaruh secara signifikan. Hal ini dapat dijelaskan jika DNA berasal dari produk non-spesifik DNA kerbau, maka akan membentuk puncak suhu yang berbeda dengan puncak suhu spesifik DNA kerbau dan apabila amplifikasi produk telah spesifik, tahap *melt curve* akan menghasilkan *single peak* dengan Tm yang identik (Joyce 2002). Metode *real-time Polymerase Chain Reaction* (qPCR) pada parameter ini mampu mendeteksi DNA kerbau secara spesifik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nuraini (2004), bahwa teknik analisis PCR merupakan salah satu teknik deteksi dan identifikasi jenis hewan yang terkandung dalam suatu produk pangan yang sangat akurat, spesifik dan mempunyai kelebihan dapat mendeteksi protein yang sudah terdegradasi (matang atau produk olahan).

Reproducibility

Pengujian *reproducibility* ini dilakukan terhadap sampel dengan dua pengujian/analisis. Pengujian ini dilakukan dengan mencari nilai p melalui uji t terhadap hasil dari dua pengujian. Hasil uji t terhadap dua pengujian dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji t terhadap nilai cycle threshold (Ct) kerbau dengan qPCR

| Jenis Sampel | n | % positif teramplifikasi | Rataan Ct \pm SD ¹⁾ | Min-Max Ct ²⁾ | Nilai p ³⁾ |
|--------------|---|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Pengujian 1 | 7 | 100 | 29,91 \pm 2,55 | 26,20-33,66 | 0,3623 |
| Pengujian 2 | 7 | 100 | 30,38 \pm 2,25 | 26,43-32,84 | |

Keterangan = 1) Rataan Ct \pm SD = Nilai rata-rata Ct (*cycle threshold value*) ketujuh sampel dan nilai standar deviasinya.

2) Min-Max Ct = Nilai minimum dan maksimum Ct (*cycle threshold value*)

3) Nilai p = tidak berbeda nyata jika p > 0,05

Hasil uji t terhadap nilai Ct pada hasil pengujian 1 dan pengujian 2 diperoleh nilai p sebesar 0,3623. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata dalam mendeteksi DNA kerbau pada dua pengujian dengan menggunakan metode *real-time PCR* (p>0,05). Hasil amplifikasi pada pengujian *reproducibility* menghasilkan nilai rata-rata pada pengujian 1 sebesar 29,91 dan untuk pengujian 2 menghasilkan nilai rata-rata 30,38. Nilai cycle threshold pada penelitian ini masih berada pada batas kriteria yang dipersyaratkan oleh kit komersial yang digunakan (Ct<35) Cahyaningsari (2018). Pengujian yang sama dilakukan berdasarkan nilai *temperature melting* (Tm) terhadap dua pengujian. Hasil uji t terhadap nilai *temperature melting* (Tm) dua pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 Uji t terhadap nilai *temperature melting* (Tm) kerbau dengan *melting curve analysis*

| Jenis Sampel | n | % positif teramplifikasi | Rataan Tm \pm SD ¹⁾ | Min-Max Tm ²⁾ | Nilai p ³⁾ |
|--------------|---|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Peng uji 1 | 7 | 100 | 75,28 \pm 0,38 | 74,6-75,8 | 0,4161 |
| Peng uji 2 | 7 | 100 | 75,34 \pm 0,58 | 74,6-76,3 | |

Keterangan : 1) Rataan Tm \pm SD = Nilai rata-rata Tm (*temperature melting*) ketujuh sampel dan nilai standar deviasinya; 2) Min-Max Tm= Nilai minimum dan maksimum Tm (*temperature melting*); 3) Nilai p = tidak berbeda nyata jika p > 0,05.

Uji t terhadap nilai Tm menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata dalam mendeteksi DNA kerbau pada dua peng uji dengan menggunakan metode *real-time* PCR (p>0,05). Rataan Tm pada peng uji 1 yaitu 75,28, sedangkan untuk peng uji 2 diperoleh rata-rata sebesar 75,34. Amplifikasi uji menggunakan *real-time* PCR dapat dimonitor menggunakan fluoresensi dan amplikon dianalisis menggunakan *Melting Curve Analysis* (MCA) tanpa perlu dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa (Atlas dan Bej 1994). *Melting Curve Analysis* (MCA) pada SYBR-Green secara luas digunakan untuk menentukan produk non-spesifik yang terbentuk saat proses amplifikasi (Cao dan Shockey 2012). Menurut Lyon (2001), prinsip *Melting Curve Analysis* adalah *melting temperature* suatu fragmen DNA dipengaruhi oleh panjang dan sekuens dari fragmen tersebut.

Limit Deteksi

Pengujian parameter limit deteksi menggunakan 7 sampel dengan konsentrasi daging kerbau yang berbeda. Pengujian ini dilakukan untuk melihat sensitivitas suatu metode analisis. Hasil pengujian *Limit of Detection* dapat dilihat pada Tabel 5. Berdasarkan data pada Tabel 5, diperoleh nilai batas deteksi PCR untuk kesensitifan primer spesifik kerbau sebesar 0,0625% dengan nilai Ct 18,04 dan nilai Tm sebesar 74,3. Pengujian pada sampel menunjukkan batas terakhir *thermal cycler* serta kesensitifan primer kerbau dalam mendeteksi DNA kerbau sampai pada sampel ke-5 dengan konsentrasi analit 0,0625%. Hasil yang baik ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kemurnian DNA hasil ekstraksi, ketepatan kondisi reaksi PCR, serta ketepatan pemilihan primer juga berpengaruh untuk mendapatkan *limit of detection* dengan konsentrasi yang rendah (Lelana *et al.* 2003). Primer merupakan bagian penting dalam reaksi amplifikasi DNA karena merupakan penggerak utama pada sintesis DNA. Ketepatan kondisi pada reaksi PCR merupakan faktor utama dalam menentukan keberhasilan suatu reaksi PCR. Ketepatan kondisi reaksi ditentukan oleh ketepatan campuran reaksi dan ketepatan kondisi suhu pada masing-masing siklus (Lelana *et al.* 2003). Kurva *real-time* hasil amplifikasi pada pengujian *limit of detection* dapat dilihat pada Gambar 3.

Tabel 5 *Limit of Detection*

| Sampel | Nilai LOD | Ct ¹⁾ | Tm ²⁾ |
|--------|-----------|---------------------|---------------------|
| 1 | 1% | 12,77 | 75 |
| 2 | 0,5% | 14,29 | 74,5 |
| 3 | 0,25% | 14,68 | 74,6 |
| 4 | 0,125% | 15,03 | 74,5 |
| 5 | 0,0625% | 18,04 | 74,3 |
| 6 | 0,03125% | No Ct ³⁾ | No Tm ⁴⁾ |
| 7 | 0,015625% | No Ct | No Tm |

Keterangan = 1) Ct = *Cycle threshold value*;

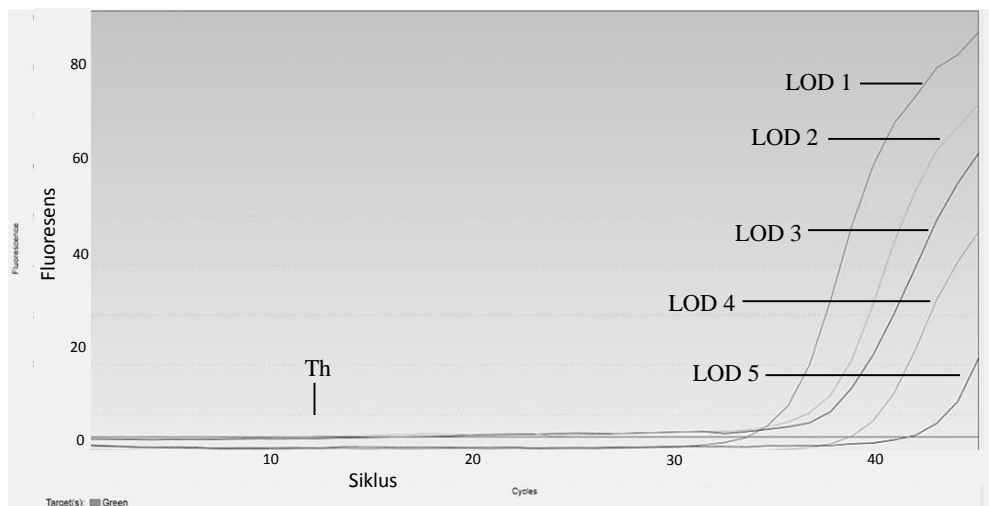
2) Tm= *Temperature melting*;

3) No Ct = Tidak terjadi amplifikasi

4) No Tm = Tidak terjadi amplifikasi

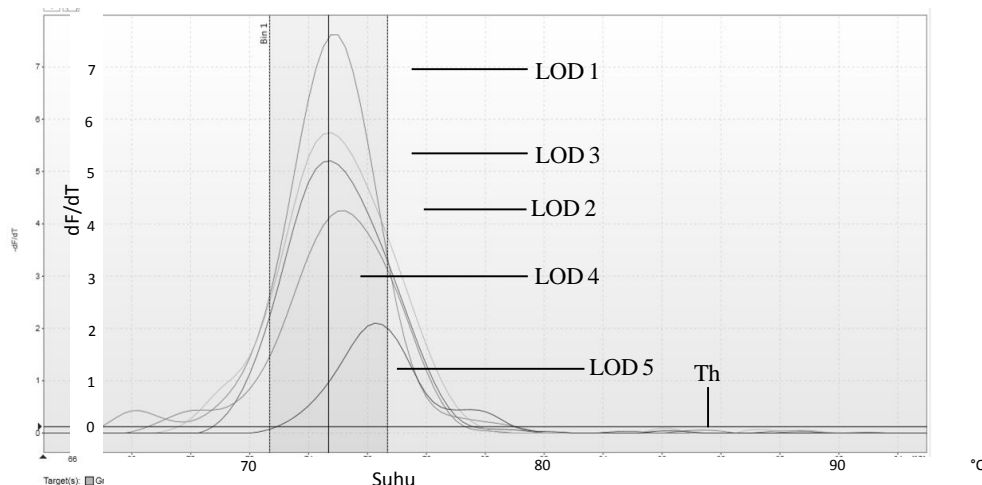
Proses amplifikasi pada Gambar 3 menghasilkan kenaikan kurva yang berbeda. Perbedaan kenaikan kurva ini disebabkan karena perbedaan konsentrasi analit tiap sampel. Pengujian *limit of detection* pada DNA kerbau menggunakan metode *real-time* PCR dapat teramplifikasi hingga konsentrasi 0,0625%. Sampel dengan konsentrasi 0,03125% dan 0,015625% tidak menghasilkan nilai Ct dan Tm dikarenakan konsentrasi analit yang terlalu rendah sehingga proses PCR sudah tidak mampu mengamplifikasi. Berdasarkan pengujian *limit of detection* DNA kerbau, metode *Polymerase Chain Reaction* (qPCR) merupakan metode yang memadai untuk mendeteksi DNA dalam jumlah yang kecil, khususnya memperkuat wilayah target DNA template dengan cara cepat dan sensitif (Burgener dan Hübner 1998).

Melting curve pada Gambar 4 menunjukkan terbentuknya proses satu puncak (*melt peak*) pada kelima sampel. Hasil pengujian ini sesuai dengan Cahyaningsari *et al.* (2018), yang menjelaskan bahwa nilai suhu pelelehan/ *temperature melting* (Tm) yang baik memiliki nilai yang sama dan hanya terdapat satu *melt peak* (puncak leleh). Kelima sampel tersebut berada dalam rentang *melting curve* yang sama, hal ini mengindikasikan bahwa kelima sampel berasal dari DNA spesies yang sama.



Keterangan : LOD 1= *limit of detection* 1%; LOD 2= *limit of detection* 0,5%; LOD 3= *limit of detection* 0,25%; LOD 4= *limit of detection* 0,125%; LOD 5= *limit of detection* 0,0625%; Th= *baseline threshold*

Gambar 3. Kurva *real-time* PCR hasil amplifikasi uji *limit of detection*



Keterangan : LOD 1= *limit of detection* 1%; LOD 2= *limit of detection* 0,5%; LOD 3= *limit of detection* 0,25%; LOD 4= *limit of detection* 0,125%; LOD 5= *limit of detection* 0,0625%; Th= *baseline threshold*

Gambar 4. *Melting curve* *real-time* PCR dengan metode SYBR green *melting curve analysis*

Spesifisitas

Pengujian spesifisitas pada penelitian ini menggunakan sampel dari DNA non-spesifik kerbau, hal ini dilakukan untuk memverifikasi spesifisitas primer hasil isolasi DNA kerbau. Sampel DNA non-spesifik yang digunakan dalam pengujian spesifisitas ini yaitu DNA ayam, kambing, tikus, sapi, dan babi. Data hasil pengujian spesifisitas dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Spesifisitas

| DNA | Ct ¹⁾ | Tm ²⁾ |
|---------|---------------------|---------------------|
| Ayam | No Ct ³⁾ | No Tm ⁴⁾ |
| Kambing | No Ct | No Tm |
| Tikus | No Ct | No Tm |
| Sapi | No Ct | No Tm |
| Babi | No Ct | No Tm |

Keterangan = 1) Ct = *Cycle threshold value*, 2) Tm= *Temperature melting*, 3) No Ct= Tidak terjadi amplifikasi, 4) No Tm= Tidak terjadi amplifikasi

Hasil yang diperoleh pada Tabel 6 menggunakan primer spesifik kerbau yang dibandingkan dengan DNA non-spesifik kerbau dari beberapa jenis spesies, menunjukkan hasil uji spesifisitas antar gen tidak menghasilkan adanya reaksi silang atau efek dari kontaminan yang mungkin ada dalam

sampel. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya nilai *cycle threshold* (Ct) dan *temperature melting* (Tm) yang dihasilkan pada DNA beberapa spesies yang diuji. Menurut USP (2005), analisis spesifisitas dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan analit pada sampel yang dilakukan dengan membandingkan bahan pembanding yang diketahui secara pasti seperti standard dan sampel yang mengandung analit (sebagai respon positif) serta sampel yang tidak mengandung analit (sebagai respon negatif) untuk memastikan bahwa respon positif tidak diperoleh adanya bahan yang secara struktural mirip atau terkait erat dengan analit. Hasil uji parameter spesifisitas memperoleh hasil spesifisitas 100%, karena kelima sampel tidak menghasilkan nilai amplifikasi (parameter spesifisitas memenuhi syarat). Hasil yang baik ini disebabkan karena SYBR Green tidak berikatan dengan DNA rantai ganda non-spesifik ataupun terjadinya primer dimer. Primer dimer merupakan proses saling berikatan antara primer-forward dan primer-reverse yang teramplifikasi dan terkuantifikasi sehingga menghasilkan data *false positive* (Pestana *et al.* 2010). Berdasarkan hasil pengujian, metode *real-time Polymerase Chain Reaction* (qPCR) mampu mengidentifikasi DNA kerbau secara spesifik dengan keakuratannya yang tinggi.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Penggunaan metode *real-time* PCR dalam mengidentifikasi campuran daging kerbau dalam daging ayam memiliki validitas yang tinggi berdasarkan uji *repeatability*, *reproducibility*, dan spesifisitas. Hal tersebut diperkuat dengan kemampuan deteksi metode ini yang mencapai konsentrasi analit sebanyak 0,0625%. Berdasarkan hasil penelitian ini, metode *real-time* PCR dapat digunakan dalam mengidentifikasi DNA spesifik guna mencegah bertambahnya kasus pemalsuan produk pangan asal hewan.

Saran

Metode *real-time* PCR yang telah divalidasi pada penelitian ini perlu didiseminasikan ke laboratorium nasional agar dapat digunakan untuk mendeteksi pemalsuan daging kerbau pada pangan asal hewan yang beredar di masyarakat. Selain itu, perlu dilakukan pengembangan metode untuk mendeteksi keberadaan DNA spesies lain yang tidak dikehendaki pada pangan asal hewan, serta pengujian juga perlu dilakukan pada jenis sampel olahan daging atau produk pangan hewan lainnya yang dikhawatirkan terjadi pemalsuan daging.

DAFTAR PUSTAKA

- Asensio L, Gonzalez I, Garcia T, Martin R. 2008. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*. 19(1): 1-8 doi: 10.1016/j.foodcont.2007.02.010.
- Atlas RM, Bej AK. 1994. *Polymerase Chain Reaction Methods for general and molecular bacteriology*, dalam Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, (Eds.) Washington DC: *Am Soc Microbiol*. 10(1): 418–435.
- Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. 2009. Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration. *Meat Sci*. 83: 165-174. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.06.003.
- Cahyaningsari D, Latif H, Sudarnika E. 2018. Identifikasi penambahan daging babi pada pangan berbahan daging sapi menggunakan metode uji cepat, ELISA dan real-time PCR (qPCR) [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Cao H, Shockey J. 2012. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *J Agr Food Chem*. 60(50): 12296-12393. doi:10.1021/jf304690e.
- Joyce C. 2002. Quantitative PCR: A Review of Current Methodologies. From *Methods in Molecular Biology* vol. 193: RT-PCR Protocols. Totowa: Humana Press Inc.
- Kleinnijenhuis AJ, Van Holthoon FL, Herregods G. 2018. Validation and theoretical justification of an LC-MS method for the animal species specific detection of gelatin. *Food Chem*. 243: 461- 467. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.104.
- Kuswandi B, Gani AA, Ahmad M. 2017. Immuno strip test for detection of pork adulteration in cooked meatballs. *Food Biophys*. 19: 1-6. doi: 10.1016/j.fbio.2017.05.001.

- Lelana NEOE, Sutarno, Etikawati E. 2003. Identifikasi Polimorfisme pada Fragmen ND-5 DNA Mitokondria Sapi Benggala dan Madura dengan Teknik PCR-RFLP. *Roy soc ch.* 4(1): 1-6.
- Lyon E. 2001. Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 1(1): 92-101. doi: 10.1586/14737159.1.1.92.
- Margawati ET, Ridwan M. 2010. Analysis of porcine contamination by using PCR technology in several meat ball products to find an effective assessment system. *Berita Biol.* 10: 93-98.
- Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, Shinmura Y. 1999. A quick and simple method for the identification of meatspecies and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* 51: 143-148.
- 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.
- Nuraini H. 2004. Pengembangan sekuen *Porcine Repetitive Element* (PRE-1) sebagai penanda molekuler untuk mendeteksi material babi pada produk daging olahan [disertasi]. Bogor(ID): Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Nurjuliana M, Che Man YB, Mat Hashim D, Mohamed AKS. 2011. Rapid identification of pork for halal authentication using the electronic nose and gas chromatography mass spectrometer with headspace analyzer. *Meat Sci.* 88: 638-644. doi : 10.1016/j.meatsci.2011.02.022.
- Pestana EA, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen GJ. 2010. *Early Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics Real-time PCR Application*. Dordrecht (DE): Springer Science & Bussiness Media.
- Raharjo TJ, Pratama GA, Nuryanti I, and Pratiwi R. 2019. Forgery detection beef with mice meat (*Mus musculus*) in meatballs using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) primer specific for a target mitochondrial DNA ND-1 gene. *Indones J Chem.* 19: 89–96. doi: 10.22146/ijc.27542.
- United States Pharmacopeia. 2005. The National Formulary: NF 26. Washington DC (USA): United States Pharmacopeial Convention.
- Yanti, A. 2017. Uji Autentifikasi Daging Kambing Terhadap Cemaran Daging Babi Menggunakan Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction). [Skripsi]. Jakarta (ID): Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan.

Analisa Data Pengujian *Escherichia coli* pada Daging Ayam di Wilayah Penyangga DKI Jakarta pada tahun 2019

Monika Danaparamitha Andriani^{1*}

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan, Jl. Pemuda No.29A, Bogor 16161

*E-mail korespondensi: monika.dandriani@gmail.com

ABSTRAK

Daging unggas tidak hanya mengandung protein berkualitas tinggi, namun juga berbagai vitamin dan mineral penting. Provinsi sentra penghasil daging ayam di Indonesia ialah Jawa Barat, Jawa Timur, Jawa Tengah, DKI Jakarta dan Banten. Usaha penyediaan daging ayam perlu mendapat perlakuan khusus karena daging ayam segar merupakan salah satu bahan pangan yang mudah rusak oleh mikroorganisme. Pada keadaan normal bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) akan hidup dan berkembang pada saluran pencernaan hewan, namun beberapa strain *E. coli* bersifat patogen yang dapat menyerang hewan serta manusia, dan mengakibatkan gangguan pada sistem pencernaan serta imunosupresi. Tujuan tulisan ini adalah untuk mengetahui distribusi cemaran *E. coli* pada produk daging ayam di wilayah Aglomerasi DKI Jakarta tahun 2019 dan memberikan rekomendasi pengendalian. Pada wilayah aglomerasi DKI Jakarta, provinsi DKI Jakarta memiliki proporsi sampel dan proporsi distribusi yang tercemar *E. coli* melebihi batas maksimum cemaran mikroba (BMCM) paling tinggi. Lebih spesifik, Kota Tangerang Selatan memiliki proporsi sampel dengan cemaran *E. coli* diatas BMCM tertinggi, yaitu 80 %, sedangkan Kota Jakarta Selatan dan Kota Depok memiliki proporsi distribusi cemaran *E. coli* diatas BMCM tertinggi yaitu 18%. Dari total 45 sampel daging ayam yang tercemar *E. coli* melebihi BMCM, Retail memiliki proporsi terhadap distribusi cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi yaitu 58%. Kegiatan pengawasan Hari Besar Keagamaan Nasional (HBKN) memiliki proporsi sampel dan proporsi distribusi dengan cemaran *E. coli* diatas BMCM lebih tinggi dibanding hasil uji sampel ketika kegiatan Program Monitoring dan Surveilans Residu Cemaran Mikroba (PMSRCM).

Kata kunci : cemaran bakteri; daging ayam; *E. coli*.

PENDAHULUAN

Daging unggas tidak hanya mengandung protein berkualitas tinggi, namun juga berbagai vitamin dan mineral penting. Selain itu, daging unggas lebih diminati oleh konsumen karena mudah dicerna, dapat diterima oleh mayoritas orang serta memiliki harga yang relatif murah (Farrell, 2013). Berdasarkan data Survei Sosial Ekonomi Nasional (SUSENAS) perkembangan konsumsi per kapita daging ayam masyarakat Indonesia selama sepuluh tahun terakhir (2010-2019) cenderung terus meningkat sebesar 5,64% per tahun. Pada tahun 2019 konsumsi daging ayam ras pedaging mencapai 5,69 kg/kapita/tahun. Provinsi Jawa Barat memiliki kontribusi terbesar dalam produksi daging ayam ras pedaging, karena selain untuk kebutuhan masyarakat Jawa Barat sendiri juga sebagai penyangga ketersediaan daging ayam di ibukota negara. Provinsi sentra lainnya ialah Jawa Timur, Jawa Tengah, DKI Jakarta dan Banten. Data Kementerian Pertanian menunjukkan bahwa DKI Jakarta merupakan wilayah sentra konsumsi yang banyak menerima pasokan komoditas ayam ras pedaging dari wilayah lain. Hal ini terkait dengan Peraturan Daerah (PERDA) Provinsi DKI Jakarta No. 4 Tahun 2007, tentang Pengendalian, Pemeliharaan dan Peredaran Unggas, dimana Pemerintah Provinsi DKI melarang budidaya unggas pangan (Pusdatin Kementan 2020). Namun peningkatan permintaan belum diiringi dengan peningkatan kualitas terutama dari segi keamanan pangan dan kesehatan. Penerapan higiene dan sanitasi yang buruk dalam penanganan daging dapat mengakibatkan daging terkontaminasi mikroorganisme. Tingginya cemaran mikroorganisme pada daging dapat menurunkan kualitas daging dan dapat menyebabkan gangguan kesehatan konsumen. Berkaitan dengan hal tersebut, harus dilakukan upaya untuk menyediakan pangan asal hewan yang aman, sehat, utuh, dan halal (ASUH). Salah satunya adalah dengan pengawasan melalui program monitoring dan surveilans residu dan cemaran mikroorganisme (PMSRCM) dan pengawasan hari besar keagamaan (HBKN).

Usaha penyediaan daging ayam perlu mendapat perlakuan khusus karena daging ayam segar merupakan salah satu bahan pangan yang mudah rusak oleh mikroorganisme. Kontaminasi dapat terjadi sejak saat pemotongan, transportasi, sampai tempat penjualan. Kartikasari *et al.* (2019) menemukan 11,5% sampel daging ayam yang diperoleh dari rumah potong unggas di Lamongan, Jawa Timur tercemar oleh *Escherichia coli* (*E. coli*). Selain itu, sebanyak 88% dari 1367 dari sampel produk daging ayam yang dijual di retail di Arizona, Amerika Serikat terkontaminasi oleh *E. coli* (Davis *et al.* 2018).

Pada keadaan normal bakteri *E. coli* akan hidup dan berkembang pada saluran pencernaan hewan, namun beberapa strain *E. coli* bersifat patogen yang dapat menyerang hewan serta manusia,

dan mengakibatkan gangguan pada sistem pencernaan serta imunosupresi. Keberadaan *E. coli* pada makanan dapat menjadi sumber *foodborne disease*, sehingga dibutuhkan penanganan yang higienis serta sanitasi yang baik untuk meminimalisasi kontaminasi bakteri pada daging selama proses perlakuan (Kartikasari *et al.* 2019). Penghitungan jumlah *E. coli* pada daging sangat penting karena keberadaan mikroorganisme ini dapat dijadikan sebagai penilaian terhadap kualitas sanitasi daging dan air. Terdapat 6 tipe pathogenic *E. coli* yaitu enterohaemorrhagic (EHEC), enterotoxigenic (ETEC), enteroinvasive (EIEC), enteropathogenic (EPEC), enteroaggregative (EAEC) dan *diffuse adherent E. coli* (DAEC). Setiap tipe tersebut secara spesifik menyebabkan diare melalui mekanisme dan gejala klinis yang berbeda (Percival dan Williams, 2014).

Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah Mengetahui distribusi cemaran *E. coli* pada produk daging ayam dalam wilayah aglomerasi DKI Jakarta tahun 2019 dan memberikan rekomendasi pengendalian.

MATERI DAN METODE

Desain Studi

Desain studi yang digunakan adalah epidemiologi deskriptif. Kajian ini mengambil data dari unit usaha di wilayah aglomerasi DKI Jakarta berdasarkan pengambilan sampel dari Program Monitoring dan Surveilans Residu Cemaran Mikroba (PMSRCM) dan Program pengawasan Hari Besar Keagamaan Nasional (HBKN) di Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan tahun 2019.

Koleksi Data Sekunder

Data diambil dari hasil pengujian *Escherichia coli* PMSRCM BPMSPH selama bulan Januari 2019 sampai dengan Desember 2019 sebanyak 108 sampel. Jenis sampel yang diambil adalah daging ayam. Tempat pengambilan sampel dari unit usaha/penyimpanan daging ayam.

Sampel berasal dari di 3 wilayah provinsi sentra produsen daging ayam tertinggi wilayah aglomerasi DKI Jakarta yaitu DKI Jakarta, Jawa Barat dan Banten, khususnya wilayah Bogor, Depok, Tangerang, dan Bekasi.

Definisi Kasus

Sampel dinyatakan melebihi batas maksimum cemaran mikroba (BMCM) apabila hasil pengujian laboratorium menyatakan cemaran *E. coli* melebihi Standar Nasional Indonesia (SNI) 7388:2009. SNI 7388:2009 mensyaratkan *E. coli* tidak melebihi 1×10^1 dari 25 gram atau 25 mililiter bahan pangan.

Ukuran Epidemiologi

Ukuran yang diambil proporsi *E. coli* melebihi BMCM.

Analisis dan Pengolahan Data

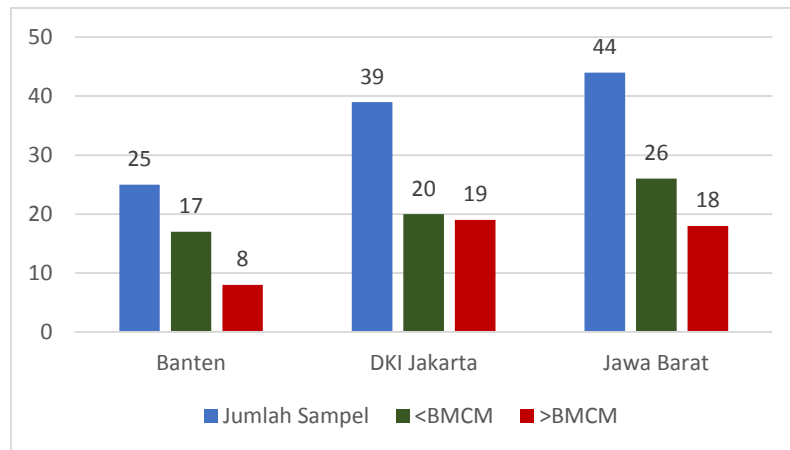
Seluruh data yang diperoleh dimasukkan ke dalam *Microsoft Excel* kemudian diberikan kode, diperbaiki, dibersihkan, dianalisa, kemudian dibuat grafik *pie chart* untuk membuat Persentase proporsi dan distribusi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

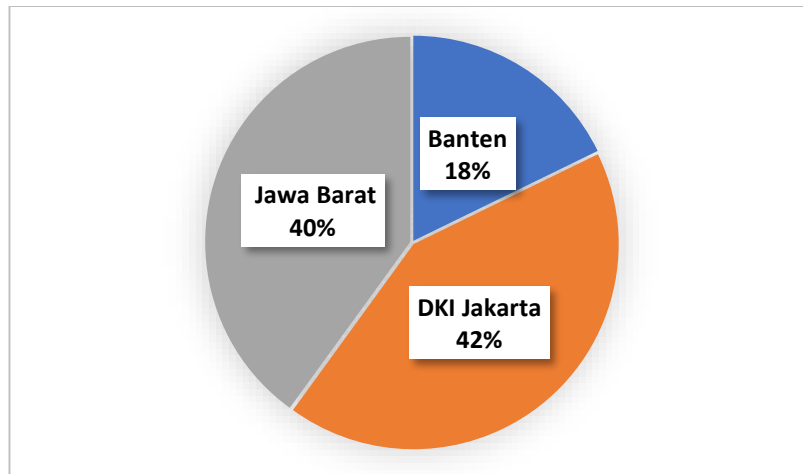
1. Persentase *E. coli* melebihi BMCM dari sampel yang diperiksa berdasarkan Provinsi sentra produsen daging ayam di wilayah aglomerasi DKI Jakarta.

Tabel 1. Proporsi hasil pengujian *E. coli* melebihi BMCM pada semua sampel daging ayam berdasarkan provinsi dalam wilayah aglomerasi DKI Jakarta.

| No. | Provinsi | Jumlah Sampel | <i>E. coli</i> < BMCM | <i>E. coli</i> > BMCM | Proporsi <i>E. coli</i> > BMCM (%) | Distribusi <i>E. coli</i> > BMCM (%) |
|--------------|-------------|---------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | Banten | 25 | 17 | 8 | 32% | 18% |
| 2 | DKI Jakarta | 39 | 20 | 19 | 49% | 42% |
| 3 | Jawa Barat | 44 | 26 | 18 | 41% | 40% |
| Total | | 108 | 63 | 45 | | 100% |



Gambar 1. Hasil pengujian *E. coli* pada sampel daging ayam dari 3 Provinsi wilayah aglomerasi DKI Jakarta.



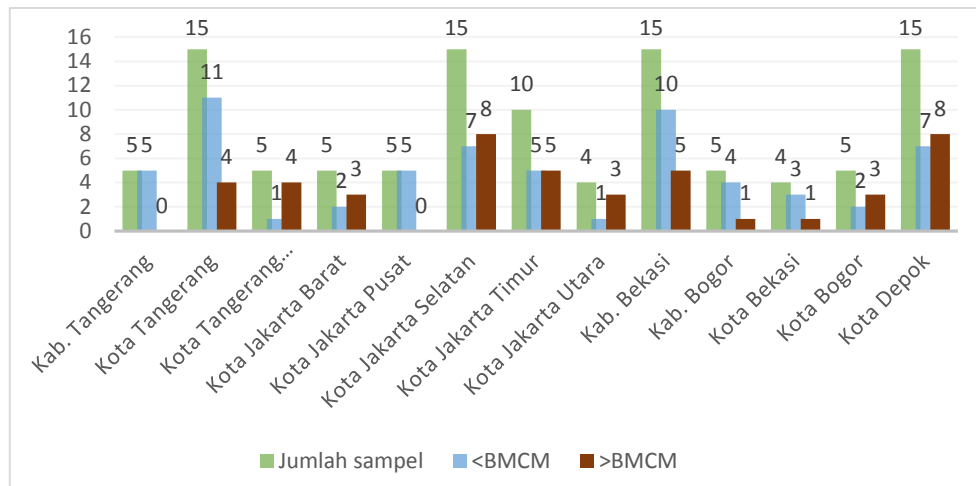
Gambar 2. Proporsi distribusi hasil *E. coli* diatas BMCM dari 3 Provinsi wilayah aglomerasi DKI Jakarta

Berdasarkan data di Tabel.1, provinsi DKI Jakarta memiliki proporsi sampel dan proporsi distribusi yang tercemar paling tinggi, yaitu 49% dan 42%.

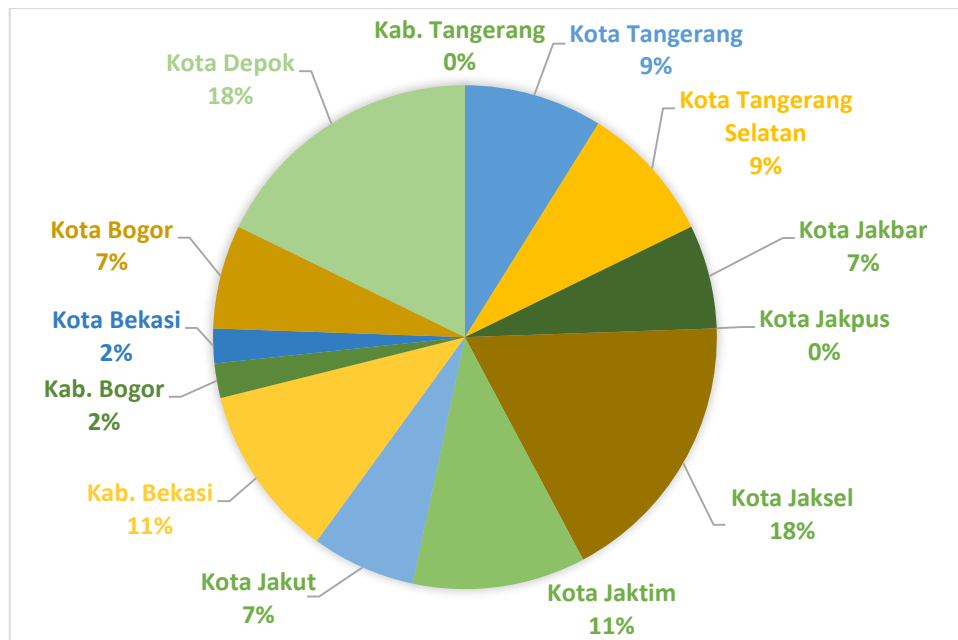
2. Persentase *E. coli* melebihi BMCM dari sampel yang diperiksa berdasarkan Kota/Kabupaten sentra produsen daging ayam di wilayah aglomerasi DKI Jakarta.

Tabel 2. Proporsi hasil pengujian *E. coli* melebihi BMCM pada semua sampel berdasarkan Kota/Kabupaten dalam wilayah aglomerasi DKI Jakarta.

| No. | Kota/Kabupaten | Jumlah Sampel | <i>E. Coli</i> <BMCM | <i>E. Coli</i> >BMCM | Proporsi <i>E. Coli</i> >BMCM (%) | Distribusi <i>E. Coli</i> >BMCM (%) |
|--------------|------------------------|---------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | Kab. Tangerang | 5 | 5 | 0 | 0% | 0% |
| 2 | Kota Tangerang | 15 | 11 | 4 | 27% | 9% |
| 3 | Kota Tangerang Selatan | 5 | 1 | 4 | 80% | 9% |
| 4 | Kota Jakarta Barat | 5 | 2 | 3 | 60% | 7% |
| 5 | Kota Jakarta Pusat | 5 | 5 | 0 | 0% | 0% |
| 6 | Kota Jakarta Selatan | 15 | 7 | 8 | 53% | 18% |
| 7 | Kota Jakarta Timur | 10 | 5 | 5 | 50% | 11% |
| 8 | Kota Jakarta Utara | 4 | 1 | 3 | 75% | 7% |
| 9 | Kab. Bekasi | 15 | 10 | 5 | 33% | 11% |
| 10 | Kab. Bogor | 5 | 4 | 1 | 20% | 2% |
| 11 | Kota Bekasi | 4 | 3 | 1 | 25% | 2% |
| 12 | Kota Bogor | 5 | 2 | 3 | 60% | 7% |
| 13 | Kota Depok | 15 | 7 | 8 | 53% | 18% |
| Total | | 108 | 63 | 45 | | 100% |



Gambar 3. Hasil pengujian *E. coli* pada sampel daging ayam dari Kota/Kabupaten wilayah aglomerasi DKI Jakarta



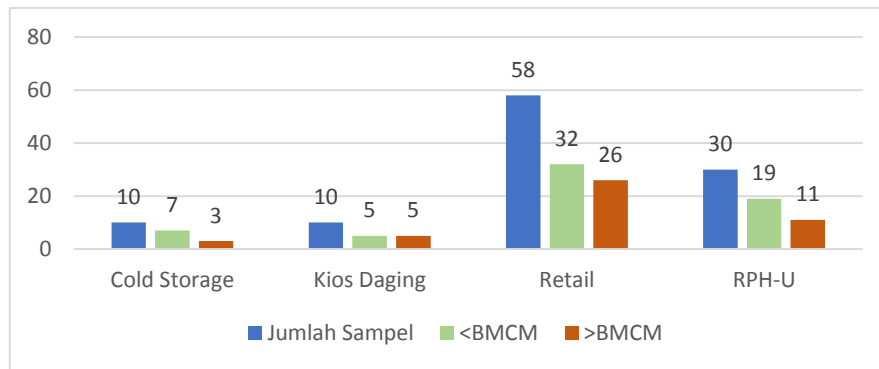
Gambar 4. Proporsi distribusi hasil *E. coli* diatas BMCM dari setiap kota/kabupaten

Berdasarkan data di Tabel 2, Kota Tangerang Selatan memiliki proporsi sampel dengan cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi yaitu 80 %, sedangkan Kota Jakarta Selatan dan Kota Depok memiliki proporsi distribusi cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi yaitu 18%.

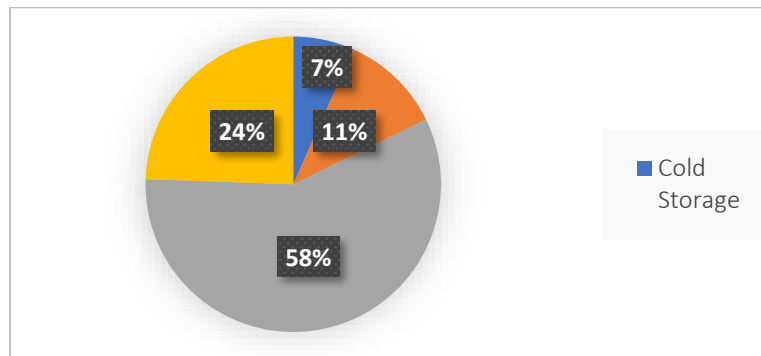
3. Persentase *E. coli* melebihi BMCM dari sampel yang diperiksa berdasarkan unit usaha di wilayah aglomerasi DKI Jakarta

Tabel 3. Proporsi *E. coli* diatas BMCM pada semua sampel berdasarkan tempat pengambilan unit usaha.

| No. | Unit Usaha | Jumlah Sampel | <i>E. coli</i> <BMCM | <i>E. coli</i> >BMCM | Proporsi <i>E. coli</i> > BMCM (%) | Distribusi <i>E. coli</i> > BMCM (%) |
|-------|--------------|---------------|----------------------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | Cold Storage | 10 | 7 | 3 | 30% | 7% |
| 2 | Kios Daging | 10 | 5 | 5 | 50% | 11% |
| 3 | Retail | 58 | 32 | 26 | 45% | 58% |
| 4 | RPH-U | 30 | 19 | 11 | 37% | 24% |
| Total | | 108 | 63 | 45 | | 100% |



Gambar 5. Hasil pengujian *E. coli* berdasarkan jenis unit usaha



Gambar 6. Proporsi distribusi hasil uji *E. coli* diatas BMCM dari setiap unit usaha

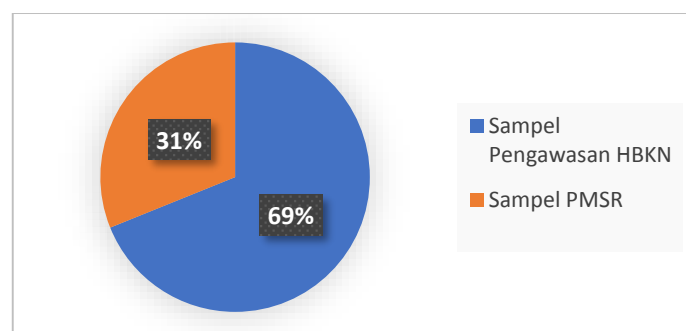
Berdasarkan data di Tabel 3, Kios Daging memiliki proporsi sampel dengan cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi, yaitu 50 %, sedangkan unit usaha Retail memiliki proporsi terhadap distribusi cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi yaitu 58%.

4. Persentase *E. coli* diatas BMCM dari sampel yang diperiksa berdasarkan tujuan pengambilan sampel aktif BPMSPH.

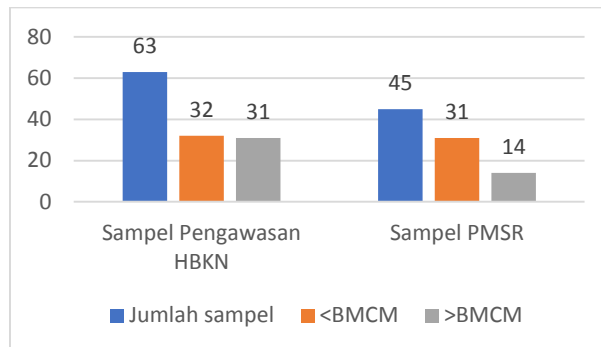
Tabel 4. Proporsi *E. coli* diatas BMCM berdasarkan tujuan pengambilan sampel

| Jenis Kegiatan | Jumlah sampel | < BMCM | > BMCM | Proporsi >BMCM (%) | Distribusi >BMCM (%) |
|------------------------|---------------|-----------|-----------|--------------------|----------------------|
| Sampel Pengawasan HBKN | 63 | 32 | 31 | 49% | 69% |
| Sampel PMSR | 45 | 31 | 14 | 31% | 31% |
| Total | 108 | 63 | 45 | | 100% |

Berdasarkan data di Tabel 4, kegiatan pengawasan Hari Besar Keagamaan Nasional (HBKN) memiliki proporsi sampel dan proporsi distribusi dengan cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi, yaitu 49% dan 69%.



Gambar 5. Proporsi distribusi hasil uji *E. coli* diatas BMCM dari tujuan pengambilan sampel



Gambar 6. Hasil pengujian *E. coli* berdasarkan tujuan kegiatan

PEMBAHASAN

Proporsi hasil uji sampel daging ayam melebihi BMCM menggambarkan nilai perbandingan jumlah hasil uji diatas BMCM dibandingkan dengan jumlah sampelnya berdasarkan kategori. Sedangkan distribusi hasil uji sampel daging ayam melebihi BMCM menggambarkan nilai perbandingan jumlah hasil uji diatas BMCM dibandingkan dengan total jumlah sampel yang diketahui juga bernilai diatas BMCM berdasarkan kategori.

Berdasarkan data hasil pengujian BPMSPPH pada wilayah aglomerasi DKI Jakarta tahun 2019, provinsi DKI Jakarta memiliki proporsi sampel yang tercemar *E. coli* melebihi BMCM paling tinggi, yaitu sebesar 49% serta dan menjadi provinsi dengan proporsi distribusi tercemar *E. coli* melebihi BMCM paling tinggi yaitu sebesar 42%. Hasil ini senada dengan penelitian Dewantoro *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa sampel daging ayam beku di DKI Jakarta memiliki tingkat prevalensi atau cemaran *E. coli* tertinggi melebihi BMCM (31.25%) dibandingkan Bekasi, Bogor, dan Serang. Hal tersebut menunjukkan bahwa masih rendahnya higiene dan buruknya sanitasi di tempat pemotongan maupun saat pengolahan atau pengemasan daging ayam di DKI Jakarta.

Lebih spesifik, merujuk pada hasil pengujian berdasarkan Kota/Kabupaten sebagai sentra penghasil daging ayam di wilayah aglomerasi DKI Jakarta maka diperoleh data bahwa Kota Tangerang Selatan memiliki proporsi sampel dengan cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi, yaitu 80%. Hal ini menggambarkan bahwa dari semua sampel daging ayam yang diambil di Kota Tangerang Selatan, terdapat 80% sampel uji dengan hasil uji diatas BMCM. Sedangkan Kota Jakarta Selatan dan Kota Depok memiliki proporsi distribusi cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi yaitu sebesar 18%. Artinya, kedua kota tersebut berkontribusi paling tinggi terhadap cemaran *E. coli* diatas BMCM pada wilayah aglomerasi DKI Jakarta.

Daging unggas adalah salah satu penyebab utama keracunan makanan pada manusia (*foodborne disease*). Olukemi *et al.* (2015) menyatakan bahwa sepanjang rantai industri pengolahan unggas merupakan lingkungan yang menguntungkan untuk pertumbuhan dan penularan berbagai bakteri baik yang bersifat pembusuk maupun patogen. Selama proses pemotongan hingga pengemasan karkas ayam dapat terkontaminasi oleh bakteri enteric, termasuk *E. coli* yang berasal dari kulit, bulu, organ pencernaan dan lingkungan di fasilitas pemotongan. Selama proses pengeluaran jeroan (eviserasi), mikroorganisme dapat dipindahkan dari karkas satu ke karkas yang lain melalui tangan pekerja, pisau dan alat pengeluaran jeroan. Selama proses penjualan di kios/retail daging juga dapat terkontaminasi oleh *E. coli* (Zhao *et al.* 2001) terkait dengan proses penanganan dan pengemasan produk (Schroeder *et al.* 2004).

Dari hasil pengujian BPMSPPH, rantai pengolahan industri unggas dimulai dari rumah potong hewan unggas (RPHU), Cold storage (Gudang penyimpanan), retail dan kios daging semuanya dapat ditemukan adanya cemaran *E. coli* melebihi batas maksimum cemaran. Namun dapat dilihat dari data pada Tabel 3, diperoleh data bahwa unit usaha berupa Kios Daging memiliki proporsi sampel melebihi BMCM sebesar 50%, artinya sebanyak 50% dari total sampel yang diambil di Kios daging memiliki cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi. Unit usaha Retail memiliki proporsi distribusi cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi yaitu 58%, sehingga dapat dikatakan hasil pengujian sampel yang diambil dari unit usaha retail menjadi sumber terbesar sampel yang tercemar *E. coli* diatas BMCM. Hal ini tidak berbeda dengan penelitian oleh Alvarez-Astargo *et al.* (2002) yang menemukan cemaran *E. coli* yang tinggi pada retail unggas di Spanyol.

Kios daging adalah unit usaha penjualan daging ayam yang berada di Kawasan pasar tradisional. Tidak berbeda jauh dengan Retail, retail merupakan unit usaha penjualan daging ayam yang berada di Kawasan pasar swalayan/supermarket. Kedua unit usaha ini langsung mendistribusi daging ayam ke konsumen akhir. Adapun kondisi kios daging di pasar tradisional umumnya memiliki sanitasi dan higiene personal dari pedagang yang lebih rendah daripada unit usaha lainnya. Hal ini terlihat dari proporsi cemaran *E. coli* diatas BMCM yang mencapai 50%. Menurut Sugiyono *et al.* (2015), hal ini disebabkan oleh kebiasaan pedagang yang tidak memisahkan jeroan dengan daging serta peralatan memotong yang kebersihannya kurang diperhatikan. Organ jeroan terutama usus merupakan habitat dari *E. coli*, sehingga *E. coli* dapat mencemari daging jika daging ayam tersebut kontak dengan isi usus ayam dan tangan pegawai yang mengolah daging tersebut (Nugroho, 2005). Namun demikian Yashoda *et al.* (2001) menyatakan meskipun proses eviscerasi berpengaruh signifikan terhadap peningkatan jumlah kontaminasi bakteri fekal, namun jumlah bakteri yang mengkontaminasi karkas menjadi lebih sedikit ditemukan pada karkas yang melalui proses preparasi yang lebih higienis. Bahkan keberadaan *E. coli* sama sekali tidak ditemukan pada karkas yang diproses secara higienis.

Berdasarkan tujuan pengambilan sampel aktif BPMSPH terdapat dua kegiatan yaitu Program Monitoring dan Surveilans Residu Cemaran Mikroba (PMSRCM) dan Program pengawasan Hari Besar Keagamaan Nasional (HBKN) di Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan tahun 2019. Kegiatan PMSR dilakukan secara terjadwal dua tahap dalam setahun, sedangkan kegiatan HBKN dilakukan menjelang hari raya Idul Fitri tahun 2019. Dari Tabel 4 dapat diketahui bahwa kegiatan pengawasan Hari Besar Keagamaan Nasional (HBKN) memiliki proporsi sampel dan proporsi distribusi dengan cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi, yaitu 49 % dan 69%. Hal ini juga didukung oleh peningkatan jumlah supply dan demand menjelang hari raya. Meningkatnya jumlah produk yang dijual, banyaknya pembeli diwaktu yang bersamaan serta adanya upaya pedagang untuk mencapai target penjualan menyebabkan pedagang seringkali kurang memperhatikan aspek higienitas produk daging yang dijual di unit usaha mereka. Oleh karena itu sangat penting untuk selalu dilakukan pengawasan produk pangan asal hewan khususnya daging ayam yang sangat mudah tercemar bakteri menjelang hari besar keagamaan nasional dan selanjutnya melakukan pembinaan pada unit usaha yang ditemukan banyak hasil cemaran diatas BMCM.

LIMITASI

Limitasi penelitian ini adalah 1) Terbatasnya jumlah sampel secara keseluruhan. 2) Jumlah sampel daging ayam dari setiap unit usaha dan kota/kabupaten tidak seimbang. 3) Kekurangan data faktor resiko untuk dianalisa lebih lanjut.

KESIMPULAN

Pada wilayah aglomerasi DKI Jakarta, provinsi DKI Jakarta memiliki proporsi sampel dan proporsi distribusi yang tercemar *E. coli* melebihi batas maksimum cemaran mikroba (BMCM) paling tinggi. Berdasarkan kota/kabupaten di wilayah aglomerasi ibukota, maka Kota Tangerang Selatan memiliki proporsi sampel dengan cemaran *E. coli* diatas BMCM tertinggi, yaitu 80 %, sedangkan Kota Jakarta Selatan dan Kota Depok memiliki proporsi distribusi cemaran *E. coli* diatas BMCM tertinggi yaitu 18%. Dari total 45 sampel daging ayam yang tercemar *E. coli* melebihi BMCM, unit usaha retail memiliki proporsi terhadap distribusi cemaran *E. coli* diatas BMCM paling tinggi yaitu 58%. Kegiatan pengawasan Hari Besar Keagamaan Nasional (HBKN) memiliki proporsi sampel dan proporsi distribusi dengan cemaran *E. coli* diatas BMCM lebih tinggi dibanding hasil uji sampel ketika kegiatan Program Monitoring dan Surveilans Residu Cemaran Mikroba (PMSRCM).

REKOMENDASI

1. Menyusun rencana pengambilan sampel pada kegiatan PMSRCM berbasis resiko (*risk based*) dari hasil analisis data, terutama pada wilayah atau unit usaha dengan hasil uji melebihi BMCM.
2. Melibatkan dan mensinkronisasi data dari Badan Pengawas Obat dan Makanan atau Dinas – Dinas terkait dalam menyusun program PMSRCM terkait dengan rekomendasi no.1.
3. Pengawasan dalam rangka HBKN sangat penting dilakukan untuk memastikan produk pangan asal hewan khususnya daging ayam tetap aman dan layak dikonsumsi.
4. Perbaikan Form pengambilan sampel, dengan menambahkan informasi terkait faktor resiko dan perbaikan tata cara dan penyederhanaan pengisian form agar lebih mudah untuk PPC di lapangan dan petugas pengisi data form di BPMSPH.
5. Upaya pembinaan pada unit usaha yang memiliki hasil uji diatas BMCM agar dapat lebih menerapkan higiene sanitasi dalam setiap tahapan rantai produksi daging ayam sampai tingkat akhir yaitu konsumen.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez-Astorga M, Capita R, Alonso-Calleja C, Moreno B, Garcia-Fernandez MC. 2002. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Sci.* (62):45-50.
- Davis GS, Waits K, Nordstrom L, Grande H, Weaver B, *et al.* 2018. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. *BMC Microbiol* 18(1):174.
- Dewantoro GI, Adiningsih MW, Purnawarman T, Sunartatie T, Afiff U. 2009. Tingkat Prevalensi *Escherichia Coli* dalam Daging Ayam Beku yang Dilalulintaskan melalui Pelabuhan Penyeberangan Merak. *J. Ilmu Pert. Indonesia* 15 (3): 211-216.
- Farrell David. 2013. *The role of poultry in human nutrition. Poultry Development Review*. Diunduh dari www.fao.org/3/i3531e/i3531e.pdf. [1 maret 2022].
- Kartikasari AM, Elziyad MT, Purnama, Hamid IS, Damayanti R, Fikri F, Praja RN. 2019. Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* Kontaminan pada Daging Ayam Broiler di Rumah Potong Ayam Kabupaten Lamongan. *J Med Vet* 2(1):66-71.
- Nugroho WS. 2005. *Aspek Kesehatan Masyarakat Veteriner Staphylococcus Bakteri Jahat yang Sering Disepelekan*. <http://weesnugroho.staff.ugm.ac.id> [1 April 2022].
- Olukemi AY, Osas IM, Olubukola OJ, Jeremiah OI. 2015. Bacterial Contamination Associated with Retail Chicken Carcasses in Osogbo, Nigeria. *NUJHS* 5(4): 45-50.
- Percival SL, Williams DW. 2014. *Escherichia coli. Microbiology of Waterborne Diseases*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>.
- Pusdatin Kementerian Pertanian. 2020. *Buku Outlook Komoditas Peternakan Daging Ayam*. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian.
- Schroeder CM, White DG, Meng J. 2004. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiol.* (21):249-255.
- Sugiyono, Kusuma A, Wanniatie V. 2015. Kandungan Mikroba pada Daging Sapi dari Beberapa Pasar Tradisional di Bandar Lampung. *J. Ilmiah Peternakan Terpadu* 3(2): 27-30.
- Yashoda KP, Sachindra NM, Sakhare PZ, Rao DN. 2001. Microbiological quality of broiler chicken carcasses processed hygienically in a small scale poultry processing unit. *J. Food Quality* (24):249-259.
- Zhao C, Ge B, Villena de J, Sudler R, Yeh E, *et al.* 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.* (67):5431-5436.

Identifikasi *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* Penyebab Resistensi Antibiotik Ceftazidim dan Cefotaxim pada Isolat *Escherichia coli* dari Sekum Ayam Broiler Tahun 2018-2020

Ajeng Herpianti Utari*, Oli Susanti, Attya Asuh Insani, Sani Susanty

Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH), Bogor

*E-mail korespondensi: aherpianti@gmail.com

ABSTRAK

Escherichia coli (*E. coli*) memiliki kemampuan beradaptasi di lingkungan dengan menghasilkan enzim beta-lactamase yang dapat bermutasi menjadi *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL). *E. coli* yang memproduksi ESBL dapat menyebabkan resistansi terhadap antibiotik golongan penisilin, monobaktam, azetronam serta sefalosporin generasi satu, dua dan tiga (kecuali cefimixim dan carbapenem). Pemakaian antibiotik beta-laktam yang tidak sesuai dapat menyebabkan terjadinya *multidrug resistance* (MDR). Hal ini menyebabkan semakin sulit pilihan antibiotik untuk pengobatan akibat infeksi bakteri penghasil ESBL, dan dampak ekonomi yang ditimbulkan akibat resistensi antibiotik semakin tinggi. Tujuan dari penelitian ini adalah melihat adanya hubungan enzim ESBL sebagai penyebab terjadinya resistensi antibiotik ceftazidim dan cefotaxim pada *E. coli*. Ceftazidim dan cefotaxim merupakan antibiotik golongan sefalosporin generasi ketiga yang berspektrum luas, dan efektif terhadap *E. coli*. Sampel merupakan isolat *E. coli* dari sekum ayam broiler yang dikoleksi pada tahun 2018-2020. Sampel sebanyak 429 isolat telah mengalami resistensi terhadap antibiotik ceftazidim dan cefotaxim. Pada penelitian ini sampel dilakukan pengujian konfirmasi fenotipik ESBL berdasarkan prosedur standar *Clinical and Laboratory Standards Institut (CLSI)*. Hasil yang diperoleh sebanyak 200 isolat *E. coli* yang telah resisten ceftazidim dan cefotaxim dikonfirmasi telah positif ESBL. Sehingga dapat disimpulkan bahwa 47% isolat *E. coli* yang berasal dari sekum ayam broiler yang mengalami resistensi ceftazidim dan cefotaxim disebabkan oleh enzim ESBL.

Kata kunci: Cefotaxim; Ceftazidim; *E. coli*; ESBL; Resistensi.

PENDAHULUAN

Escherichia coli termasuk dalam daftar patogen prioritas kritis yang ditetapkan oleh WHO. *E. coli* berbahaya terhadap kesehatan manusia dan mudah resistan terhadap antibiotik (WHO, 2017). *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang merupakan flora normal saluran pencernaan, namun beberapa serotipe patogen menjadi penyebab berbagai penyakit intestinal dan extraintestinal hingga bakteremia (Wibisono *et al.*, 2020). *E. coli* memiliki kemampuan dalam beradaptasi di lingkungan dengan menghasilkan enzim beta-laktamase yang dapat bermutasi menjadi *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL) (Fanada, 2021). *Escherichia coli* yang memproduksi ESBL dapat menyebabkan resistansi terhadap antibiotik yang memiliki struktur cincin beta-laktam seperti golongan penisilin, monobaktam, hingga sefalosporin generasi satu, dua dan ketiga, kecuali cepharmycin dan carbapenem (Yanestria *et al.*, 2022). Adanya infeksi akibat *E. coli* penghasil ESBL dapat memperberat kondisi pasien yang sedang dalam perawatan medis (Fanada, 2021). Bakteri penghasil ESBL juga berpotensi besar menjadi penyebab *multi drugs resistance* (MDR). MDR adalah kemampuan suatu bakteri melawan lebih dari 3 jenis atau lebih kelas antibiotik yang berbeda secara strukturnya dan dengan perbedaan target molekulnya (Sherestha *et al.*, 2017).

Resistensi antibiotik menjadi ancaman terbesar bagi kesehatan masyarakat secara global. Jika bakteri yang bersifat patogen mengalami resistansi terhadap satu atau lebih jenis antibiotik dapat menurunkan kemampuan antibiotik dalam pengobatan infeksi dan memperpanjang masa pengobatan, hal ini menyebabkan jenis antibiotik yang dapat digunakan dalam pengobatan infeksi terbatas. Sedangkan penemuan antibiotik baru untuk mengobati infeksi akibat bakteri resistan memerlukan waktu yang lama dengan biaya yang cukup besar, sehingga dikhawatirkan jumlah bakteri resistan semakin banyak, penyebaran AMR semakin luas. WHO memperkirakan pada tahun 2050 jika tidak ada program pencegahan dan pengendalian AMR akan terjadi kematian hingga 10.000.000 jiwa. Hal ini juga dapat menyebabkan kerugian perekonomian yang besar (WHO, 2021). Beta-laktam merupakan golongan antibiotik yang sering digunakan di peternakan unggas karena cukup efektif dan potensial melawan bakteri gram negatif dan positif, juga ditambahkan dalam pakan sebagai *feed additive* (Utari *et al.*, 2018). Berdasarkan pertimbangan tersebut, tujuan dari penelitian ini adalah melihat adanya kolerasi enzim ESBL sebagai penyebab terjadinya resistensi antibiotik ceftazidim dan cefotaxim pada *E. coli* yang berasal dari sekum ayam broiler.

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan

Sampel sebanyak 429 isolat *E. coli* yang resisten terhadap ceftazidim dan cefotaxim atau disebut *E. coli* presumtif ESBL. Sampel merupakan isolat arsip BPMSPH tahun 2018-2020 yang dikoleksi dari sekum ayam broiler pada kegiatan monitoring dan survailens AMR. Bakteri standar *Quality Control (QC) Strain: E. coli* ATCC 29522 sebagai kontrol negatif ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 sebagai kontrol positif ESBL. Bahan media yang digunakan untuk pengujian antara lain: *Mueller-Hinton Agar (MHA)*, *Nutrient Agar (NA)*, NaCl fisiologis 0.85%, cakram antibiotik Cefotaxime 30µg (CTX), Ceftazidime 30µg (CAZ), Cefotaxime/clavulanic acid 30µg/10µg (CTX-cla), dan Ceftazidime/clavulanic acid 30µg/10µg (CAZ-cla).

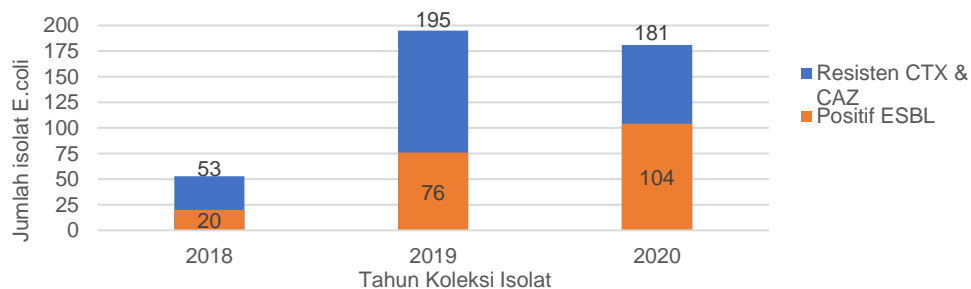
Alat-alat yang digunakan antara lain: *BioSafety Cabinet*, inkubator 35±2 °C, vortex, *Nephelometer*, larutan standar 0.5 *McFarland*, cawan petri steril 100 x 12 mm, *disposable ose*, *Single channel Micropipette* 10-100 µl, *swab cotton stick* steril, dan *yellow tip* steril.

Uji Konfirmasi Fenotipik ESBL

Uji konfirmasi *E. coli* penghasil ESBL dilakukan dengan metode *Combination Disk Test* berdasarkan CLSI M100 Edisi 32 tahun 2022. Sampel Isolat *E. coli* presumtif ESBL tahun 2018-2020 dilakukan pengujian viabilitas terlebih dahulu, pertama isolat ditanam pada media NA dan diinkubasi pada suhu 35 ± 2 °C selama 16-24 jam. Sebanyak 3-5 koloni *E. coli* yang tumbuh terpisah diambil dan dibuat larutan suspensi dengan konsentrasi 0,5 MC Farland kemudian diratakan pada permukaan media MHA menggunakan *cotton swab* steril. Cakram antibiotik CTX ditempatkan berseberangan dengan CTX-cla, dan CAZ berseberangan dengan CAZ-cla pada media MHA yang masing-masing telah mengandung sampel isolat, kontrol positif maupun kontrol negatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian konfirmasi ESBL merupakan pengujian konfirmasi secara fenotipik dari *E. coli*. Pengujian ini digunakan untuk mengkonfirmasi adanya ESBL pada isolat *E. coli* yang mengalami resisten terhadap antibiotik ceftazidim dengan nilai MIC ≥ 16 ppm dan cefotaxim dengan nilai MIC ≥ 4 ppm. Berdasarkan hasil pengujian konfirmasi ESBL dari 429 isolat *E. coli* yang resisten Ceftazidim dan Cefotaxim diperoleh hasil positif ESBL sebanyak 200 (47%), dengan rincian sebanyak 53 isolat *E. coli* tahun 2018, 195 isolat tahun 2019, dan 181 isolat tahun 2020. Tren *E. coli* ESBL dari tahun 2018 hingga 2020 mengalami peningkatan (Gambar 1), sejumlah 20 (5%) berasal dari isolat *E. coli* tahun 2018, 76 (18%) berasal dari isolat *E. coli* tahun 2019, dan 104 (24%) isolat yang berasal dari tahun 2020 (Tabel I).

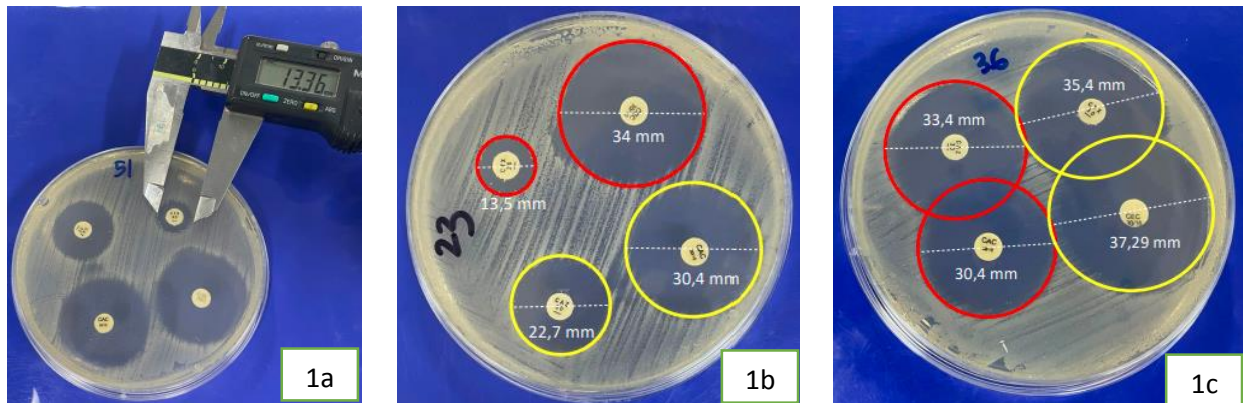


Gambar 1. Hasil Konfirmasi *E. coli* Positif ESBL

Pengujian konfirmasi fenotipik ESBL diasumsikan jika *E. coli* positif penghasil ESBL apabila tampak selisih diameter zona hambat yang terbentuk ≥ 5 mm antara antibiotik dengan penambahan clavulanic acid dengan tanpa clavulanic acid. Keberterimaan QC strain yaitu untuk *E. coli* ATCC 25922 peningkatan diameter zona yang terbentuk ≤ 2 mm untuk antimikroba yang diuji kombinasi dengan Clavulanic acid dengan tanpa Clavulanic acid, untuk *K. pneumoniae* ATCC 700603 peningkatan diameter zona yang terbentuk ≥ 5 mm Ceftazidim-Clavulanic acid dengan Ceftazidim; Peningkatan di zona diameter ≥ 3 mm Cefotaxim-Clavulanic acid dengan Cefotaxim (CLSI, 2022).

Tabel 1. Hasil Pengujian Konfirmasi Fenotipik ESBL Isolat *E. coli* presumtif ESBL tahun 2018-2020

| Tahun Koleksi Isolat | Jumlah Resistensi CTX & CAZ | Jumlah Positif ESBL | Persentase Positif ESBL |
|----------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------------|
| 2018 | 53 | 20 | 5% |
| 2019 | 195 | 76 | 18% |
| 2020 | 181 | 104 | 24% |
| TOTAL | 429 | 200 | 47% |



Gambar 2. Zona Hambat yang Dihasilkan dari Pengujian Konfirmasi ESBL: (1a) Pengukuran zona hambat dengan kaliper, (1b) ESBL Positif, (1c) ESBL Negatif.

Salah satu penyebab terjadinya resistensi *E. coli* terhadap ceftazidim dan cefotaxim adalah munculnya enzim ESBL yang menghambat kemampuan antibiotik dalam menghambat *E. coli*. Pada dasarnya beta-laktamase menyebabkan resistensi dengan cara memecah struktur antibiotik, mekanismenya adalah membuka cincin beta-laktam. Sehingga menghalangi terjadinya ikatan cincin beta-laktam dengan penisilin binding protein (PBPs) yang seharusnya dapat menghambat sintesis dinding sel bakteri (Forbes et al., 2007). Extended Spectrum Beta-lactamase (ESBL) adalah enzim yang dimediasi oleh plasmid. Hasil mutasi dari enzim beta laktamase TEM 1, TEM-2, OXA-10, CTX-M dan SHV-1 yang bisa ditemukan pada famili Enterobacteriaceae yang secara normal akan memberikan resistensi pada penisilin dan sefalosporin generasi pertama. Gen-gen tersebut mengalami mutasi dan berubah konfigurasi asam aminonya di bagian aktif dari beta-laktamase. Paparan dari sejumlah besar antibiotik golongan beta-laktam dapat menginduksi mutasi yang menyebabkan meluasnya rentang substrat target enzim hingga sefalosporin generasi ketiga kecuali cepharmycin dan carbapenem (Chouchani et al., 2007). Plasmid termasuk ke dalam mobile genetic elements (MGE) yang paling banyak berperan dalam membawa gen multidrug resistant. Sehingga gen pembawa ESBL dapat dipindahkan ke bakteri lain melalui proses transfer gen secara horizontal. Perpindahan ini menyebabkan penyebaran resistensi antar strain dan spesies. ESBL diinhibisi oleh beta-laktamase inhibitor seperti clavulanate, sulbactam dan tazobactam. Penambahan inhibitor bertujuan untuk menahan betalaktamase diproduksi lebih jauh (Rupp et al., 2003).

E. coli penghasil ESBL di lingkungan dapat berpotensi menyebabkan penyakit zoonotik, baik melalui kontak lingkungan yang tercemar maupun dari konsumsi produk hewan yang terkontaminasi. Penyebaran *E. coli* penghasil ESBL kemungkinan besar berasal dari saluran pencernaannya atau berasal dari lingkungan kandang yang telah terkontaminasi feses yang mengandung *E. coli* penghasil ESBL. Jika proses penyembelihan dan penanganan tidak menerapkan higiene dan sanitasi, maka karkasnya juga dapat terkontaminasi (Harijani et al., 2020). Menurut Wardhana et al (2020) dilaporkan 90.03% prevalensi ditemukannya kontaminasi *E. coli* penghasil ESBL pada karkas ayam broiler di pasar tradisional Surabaya. Pada penelitian yang dilakukan Yanestria et al. (2022) diperoleh data bahwa seluruh *E. coli* penghasil ESBL (100%) telah mengalami *Multi Drug Resistance* (MDR). Permasalahan dari MDR diperparah oleh kemampuan bakteri dalam mentransfer materi genetik yang membawa sifat resistensi dari satu bakteri ke bakteri lainnya secara vertikal melalui mutasi genetik dan secara horizontal melalui konjugasi, transduksi dan transformasi. Melalui Penelitian ini diharapkan program monitoring yang telah dilakukan BPMSPPH dapat secara rutin terus dilakukan untuk melihat gambaran pola resistensi terutama yang diakibatkan oleh ESBL.

KESIMPULAN

Berdasarkan pengujian konfirmasi ESBL terhadap isolat *E. coli* yang telah mengalami resistensi cefotaxim dan ceftazidim, dari 429 isolat sampel diperoleh hasil sebesar 200 (47%) *E. coli* positif ESBL. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *E. coli* yang berasal dari sekum ayam broiler yang telah dikoleksi dari tahun 2018-2020 mengalami resistensi cefotaxim dan ceftazidim yang karena *E. coli* tersebut telah memproduksi ESBL. Monitoring rutin dan kajian lanjutan mengenai pola gen pembawa ESBL pada *E. coli* terutama yang berasal dari peternakan unggas perlu dilakukan lebih lanjut untuk mengetahui faktor munculnya resistensi akibat ESBL.

DAFTAR PUSTAKA

- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2022. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing. 3st edition. Wayne (US): Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Chouchani C, Ben-Achour N, M'charek A, Belhadj O. 2007. Cefotaxime and ceftazidime-resistant *Escherichia coli* isolate producing TEM-15 β -lactamase from a Tunisian hospital. *C. R. Biologies* 330 (8) 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2007.03.017>.
- Fanada M.I, Maryani, Primaningtyas W. 2021. Deteksi Kuman Penghasil Extended Spectrum Beta-Lactamase(ESBL) pada Hewan Ternak di Surakarta. *SEAJCEEEM* 2 (1) : 1-10.
- Forbes BA ; Weissfeld AS; Sahm DF, 2007. Laboratory Methods and Strategies for Antimicrobial Susceptibility Testing . In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology . Philadelphia: Elsevier, pp. 187-213.
- Harijani N, Oetama SJT, Soepranionondo K, Effendi MH, Tyasningsih W. 2020. Biological hazard on multidrug resistance (MDR) of *Escherichia coli* collected from cloacal swab of broiler chicken on wet markets Surabaya. *Indian J Forensic Med Toxicol* 14 (4): 3239-3244.
- Rupp ME, Fey PD. 2003. Extended Spectrum B-lactamase (ESBL)- Producing Enterobacteriaceae Consideration for Diagnosis, Prevention and Drug Treatment. *Diagnosis Microbiology Infection Diseases*, 63(4), pp. 353-365.
- Shrestha A, Bajracharya AM, Subedi H, Turha RS, Kafle S, Sharma S, et al. 2017 Multi-drug resistance and extended spectrum beta lactamase producing Gram negative bacteria from chicken meat in Bharatpur Metropolitan, Nepal. *BMC Res Notes* 10 (1):1–5.
- Utari A.H, Retnowati A, Andriani M.D, Anisatun H, Riandi A, Nur. E. 2018. Tren Hasil Pengujian Residu Antibiotik pada Telur Ayam di Indonesia Tahun 2015- 2017. *Proc. of the 20th FAVA CONGRESS & The 15th KIVNAS PDHI* : 299-301.
- Wardhana DK, Effendi MH, Harijani N, Ooi H. 2020. Detection of extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in meat chicken from traditional market in Surabaya, East Java, Indonesia. *Indian J Publ Health Res Dev* 11 (1): 1353-1357.
- Wibisono, F.J. Sumiarto, B., Untari, T., Effendi, M.H., Permatasari, D.A., Witaningrum. A.M. 2020. The Presence Of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* On Layer Chicken Farms In Blitar Area, Indonesia. *BIODIVERSITAS*, 21 (6): 2667-2671.
- [WHO] World Health Organization. 2021. Antimicrobial Resistance. [diakses 2022 Nov 10]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobialresistance>.
- [WHO] World Health Organization. 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. [diakses 2022 Nov 11]. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Yanestria SM, Dameanti FNAEP, Musayannah BG, Pratama JWA, Witaningrum AM, Effendi MH, Ugbo EN. 2022. Antibiotic resistance pattern of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from broiler farm environment in Pasuruan district, Indonesia. *Biodiversitas* 23: 4460-4465.

Identifikasi Fragmen DNA Babi pada Sampel Gelatin Menggunakan Metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* (qPCR)

Septiana Kurnia Putri¹, Puji Rahayu^{2*}

¹Mahasiswa Program Sarjana Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

²Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*E-mail korespondensi : puji_latif@yahoo.co.id

ABSTRACT

Gelatin is a protein obtained by hydrolysis of collagen from animal skin and bone that has great importance in many industry. Domestic gelatin is generally obtained by import. The raw materials used in gelatin production are highly from porcine sources, so it is necessary to analyze the origin of gelatin to guarantee the halal source of gelatin for Muslim's Indonesia. The aim of this research was to identify the presence of pork DNA fragments in gelatin by real-time PCR methods. The samples consisted of 53 gelatins. They were extrated according to the procedure of DNeasy mericon Food Manual Book. The result of extracted gelatins was quantified by nanodrop spectrofotometer 2000c and examined by a commercial kit. The amplification process of gelatins was carried out according to the procedure of DNeasy mericon Pig Kit Handbook. The result showed that gelatins with pork DNA can be identified by Ct value < 35. There were 4 samples positive contained pork DNA, while 49 samples were negatives. Real time PCR methods can be used to identify the presence of pork DNA fragments in gelatin samples.

Keywords: DNA, gelatin, pork, real time PCR

PENDAHULUAN

Produk asal hewan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia selain daging adalah kulit dan tulang. Salah satu pemanfaatan kulit dan tulang asal hewan adalah untuk dijadikan sebagai gelatin. Gelatin merupakan salah satu jenis protein yang diperoleh melalui hidrolisis parsial kolagen dari kulit dan tulang hewan. Gelatin berfungsi sebagai zat pembentuk gel, zat pengental, zat pengemulsi, zat pembentuk film, dan zat pensuspensi (Aisyah *et al.* 2014). Pemanfaatan gelatin sudah sangat luas dan banyak digunakan untuk keperluan berbagai sektor industri, diantaranya industri makanan, farmasi, kosmetik, produk kedokteran, dan fotografi. Gelatin pada industri makanan digunakan untuk membuat es krim, marshmallow, permen karet, mayonaise, dan jeli, sedangkan gelatin pada industri farmasi banyak digunakan dalam tablet, pembuatan kapsul keras dan lunak, enkapsulasi vitamin, dan lain-lain (Nhari *et al.* 2012).

Pemenuhan kebutuhan gelatin di Indonesia umumnya diperoleh dengan cara impor dari beberapa negara seperti Jepang, Cina, India, Perancis, Brazil, Jerman, Argentina, dan Australia (BPS 2015). Sekitar 90% gelatin yang beredar di Indonesia adalah gelatin impor (Said *et al.* 2011). Sumber gelatin utama berasal dari babi dan sapi. Produksi gelatin yang berasal dari kulit babi mencapai 46%, kulit sapi 29,4%, tulang sapi 23,1%, dan sumber alternatif lainnya 1,5% dari total produksi gelatin dunia (Karim dan Bhat 2009). Data tersebut menunjukkan bahwa produksi gelatin yang berasal dari produk asal hewan babi adalah yang tertinggi dan masih mendominasi pasaran dunia, sehingga diperlukan adanya pengujian terhadap produk gelatin babi.

Pengujian ini dilakukan untuk memeriksa asal bahan gelatin yang diimpor. Gelatin yang diimpor harus memenuhi persyaratan sertifikat hasil uji yang diterbitkan oleh laboratorium uji yang kompeten dan diakui oleh pemerintah setempat. Asal bahan gelatin yang diimpor dari negara asal harus sesuai dengan sertifikat hasil uji yang disertakan saat gelatin tersebut diuji di Indonesia. Selain itu, aspek kehalalan produk gelatin menjadi penting karena Indonesia merupakan negara dengan jumlah muslim terbesar di dunia. Jumlah muslim di Indonesia pada tahun 2020 diperkirakan sebanyak 229 juta atau 87,2% dari populasi penduduk Indonesia yang berjumlah 263 juta jiwa. Konsumen yang beragama islam diharamkan untuk mengkonsumsi produk babi dan turunannya, sehingga diperlukan suatu metode identifikasi keberadaan DNA babi pada gelatin

untuk memberikan jaminan kehalalan sumber gelatin bagi konsumen muslim Indonesia. Hal ini juga berkaitan dengan pemakaian gelatin pada produk makanan yang ditinjau dalam UU Republik Indonesia Nomor 8 Tahun 1999 tentang perlindungan konsumen.

Metode identifikasi gelatin babi dapat dilakukan dengan teknik presipitasi kimia, *Enzym-Link Immunosorbent Assay* (ELISA), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Tandem Mass Spectrometry* (LCMS/MS), analisis berbasis DNA menggunakan *real time Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan lain-lain. Metode identifikasi gelatin babi yang paling baik diantara berbagai metode tersebut adalah metode LCMS/MS atau *real time PCR*. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Tandem Mass Spectrometry* (LCMS/MS) merupakan teknik yang menganalisis marker protein spesifik dari sampel gelatin babi yang dihasilkan melalui teknik *Principal Component Analysis* (PCA) dengan cara menghidrolisis gelatin menggunakan enzim proteolitik dari tripsin. Tripsin akan memotong ikatan peptida antara gugus karboksil dari arginin atau gugus karboksil dari lisin dan gugus amino dari asam amino yang berdekatan (Salamah *et al.* 2019).

Real time PCR merupakan metode yang dapat mengamplifikasi DNA dengan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. *Real time PCR* dapat mendeteksi adanya cemaran DNA babi pada berbagai produk dengan level cemaran yang rendah yaitu 1% (Cai *et al.* 2012). Prinsip kerja *real time PCR* adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi sinyal fluoresen yang akan meningkat seiring dengan bertambahnya amplifikasi DNA (Pardal 2010). *Real time PCR* merupakan metode identifikasi DNA yang umum dan sering digunakan yang salah satunya digunakan sebagai metode identifikasi fragmen DNA babi pada sampel gelatin. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi fragmen DNA babi pada sampel gelatin menggunakan metode *real time PCR*. Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi tentang keberadaan fragmen DNA babi pada sampel gelatin, sehingga produk yang berasal dari gelatin dapat terjamin keamanan dan kehalalannya bagi masyarakat. Penelitian ini juga diharapkan bermanfaat untuk membantu pemerintah dalam melakukan pengawasan dan peredaran gelatin di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Pengujian sampel gelatin dilakukan di laboratorium Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH) dengan alamat Jl. Pemuda Nomor 29 A, Tanah Sareal, Kecamatan Tanah Sareal, Kota Bogor, Jawa Barat.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan digital, spatula, *microtube*, rak tube, *micropipette* volume 1-1000 μ l, *ep-tips*, rak tube, *receiver tube*, *green spin filter*, *tube shaker*, *nanodrop spectofotometer* 2000c, *tissue* tanpa serat, *minispin plus*, *thermomixer comfort*, *PCR Cabinet*, dan instrumen *Real-time thermal cycler Rotor-Gene Q*.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel gelatin, komersial ekstraksi DNeasy *mericon* Food Kit (Qiagen) (*Lysis Buffer*, *Proteinase K*, *Binding Buffer*, *Pre Wash Buffer*, *Washing Buffer*, *Delution Buffer*), *mericon* Pig Kit (Qiagen) (*mericon* Pig Assay, *Internal Control*, *Positive Control*, *Multiplex PCR Master Mix*, *QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer*, *RNase-free water*, *positive control*, *negative control*, dan *no template control*.

Metode Penelitian

Ekstraksi fragmen DNA dari sampel gelatin

Ekstraksi DNA merupakan suatu proses yang bertujuan untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen lainnya seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Penggunaan kit komersial dalam proses ekstraksi DNA saat ini banyak dilakukan karena lebih praktis dan efisien (Syahputra *et al.* 2016). Sampel gelatin diekstraksi sesuai dengan prosedur standar dari DNeasy *mericon* Food Manual Book. Sebanyak 200 mg sampel gelatin ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam *reaction tube* berukuran 2 ml. Selanjutnya ditambahkan *Lysis Buffer* (Code L) sebanyak 580 μ l dan *Proteinase K* (Code K) sebanyak 20 μ l, kemudian dihomogenkan menggunakan alat *tube shaker* selama 2-3 detik. Setelah homogen, diinkubasi pada alat *thermomixer comfort* selama 30 menit dengan suhu 65°C. Sampel kemudian disentrifugasi menggunakan alat *mini spin plus* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dari sampel yang telah disentrifugasi dimasukkan kedalam *green spin filter* (Code F) dan *receiver tube* (Code R) yang telah disiapkan

sebelumnya, kemudian disentrifugasi kembali. Setelah itu, cairan yang ada pada *receiver tube* dibuang.

Kemudian sebanyak 250 μ l *binding buffer* (Code B) ditambahkan ke dalam filtrat dan disentrifugasi kembali. Cairan yang ada pada *receiver tube* dibuang kembali. Selanjutnya sebanyak 550 μ l *pre-wash buffer* (Code P) ditambahkan ke dalam filtrat dan disentrifugasi. Cairan yang ada pada *receiver tube* kemudian dibuang. Sentrifugasi dilakukan kembali untuk memastikan semua cairan berada di dasar *receiver tube* kemudian cairan tersebut dibuang, sehingga didapatkan sampel DNA yang kering pada *green spin filter*. Selanjutnya *elution buffer* (Code X) dihangatkan menggunakan alat *thermomixer comfort* pada suhu 65°C selama 3 menit, kemudian dimasukkan ke dalam *green spin filter* dan *receiver tube* sebanyak 200 μ l. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 3 menit menggunakan alat *thermomixer comfort*. Setelah itu, disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Kemudian *green spin filter* dibuang dan hasil ekstraksi DNA yang telah dielusi terdapat pada *receiver tube*.

Kuantifikasi hasil ekstraksi DNA dari sampel gelatin

Kuantifikasi hasil ekstraksi DNA dilakukan untuk menunjukkan jumlah, kualitas, dan kemurnian DNA yang diperoleh menggunakan alat *nanodrop spectrofotometer* 2000c. Alat *nanodrop spectrofotometer* 2000c dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan cairan *Nuclease Free Water* (NFW) sebanyak 2 μ l. Kemudian cairan NFW pada alat *nanodrop spectrofotometer* 2000c dikeringkan menggunakan tissue tanpa serat. Selanjutnya sebanyak 2 μ l hasil ekstraksi DNA ditetaskan pada alat *nanodrop spectrofotometer* 2000c. Hasil ekstraksi DNA dengan kemurnian yang baik ditentukan oleh nilai absorbansi pada panjang gelombang 260/280 yang berkisar antara 1,8 - 2,0 dan panjang gelombang 260/230 yang berkisar antara 2,0 - 2,2.

Pengujian sampel menggunakan *real time* PCR

Setiap sampel hasil ekstraksi DNA, *negative control* (NC), *positif control* (PC), dan *No Template Control* (NTC) disiapkan dan diberi label. Selanjutnya preparasi *master mix* dilakukan dengan mengacu pada *Master Mix mericon* Pig Kit. Volume *master mix* yang ditambahkan pada setiap sampel dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Volume master mix} = (\text{Jumlah sampel} \times 10) \pm \text{faktor koreksi } 10\%$$

Preparasi *master mix* dilakukan di dalam PCR *Cabinet* untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada kit *master mix*. *Master mix* dimasukkan ke dalam *microtube* kemudian dihomogenkan dengan menggunakan alat *spin down*. Selanjutnya, setiap sampel sebanyak 10 μ l masing-masing ditambahkan dengan 10 μ l *master mix* pada *microtube*, kemudian dihomogenkan menggunakan *micropipet* dan *ep-tips*. Setelah itu digunakan alat *spin down* untuk membuat sampel berada di dasar tabung. Proses amplifikasi dilakukan sesuai dengan prosedur standar dari DNeasy *mericon* Pig Kit Handbook. Setiap sampel termasuk NC, PC, dan NTC dimasukkan ke dalam alat *real time* PCR. Amplifikasi DNA pada alat *real time* PCR akan dilakukan sebanyak 45 siklus selama 1 jam. Program amplifikasi DNA pada alat *real time* PCR yaitu denaturasi awal (HOLD) 95°C selama 5 menit, denaturasi 95°C selama 15 detik, *annealing* 60°C selama 23 detik, dan *extension* 72°C selama 10 detik.

Mericon Pig Kit digunakan untuk melihat ada atau tidaknya DNA babi pada sampel gelatin. *Mericon* Pig Kit memiliki dua *dye*, yaitu *dye* FAM dan VIC. Pewarna reporter FAM digunakan untuk mendeteksi ada atau tidaknya kurva amplifikasi DNA babi pada sampel gelatin dan PC dengan *channel Green* (FAM), sedangkan pewarna reporter MAX digunakan untuk deteksi *internal control* dengan *channel Yellow* (VIC). Interpretasi hasil positif dinyatakan apabila sampel DNA menunjukkan adanya proses amplifikasi pada *detection system* yang dapat diidentifikasi dengan nilai *cycle threshold* (Ct) < 35, sedangkan hasil negatif ditunjukkan dengan gambaran grafik yang datar karena tidak ada proses amplifikasi. Jika nilai Ct berada diantara 35-45, maka dilakukan pengujian ulang.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil kuantifikasi DNA pada *nanodrop spectrofotometer* 2000c dan nilai Ct pada *real time* PCR akan diolah secara analisis deskriptif dengan menggunakan *microsoft excel*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kuantifikasi hasil ekstraksi fragmen DNA dari sampel gelatin

Kuantifikasi hasil ekstraksi DNA merupakan suatu prosedur yang dilakukan untuk menunjukkan konsentrasi, kualitas, dan kemurnian DNA menggunakan *nanodrop spectrophotometer* 2000c. Sampel yang akan diperiksa harus jernih dan larut sempurna, serta tidak ada partikel koloid ataupun suspensi. Data nilai konsentrasi dan kemurnian DNA dari 53 sampel gelatin yang diterima oleh Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH) pada tahun 2019 dan 2020 dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data nilai konsentrasi dan kemurnian DNA sampel gelatin (n=53)

| | Konsentrasi DNA (ng/ μ L) | Kemurnian DNA | |
|----------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| | | 260/280 | 260/230 |
| Rata-rata | 28,26 \pm 15,79 | 1,91 \pm 0,11 | 1,49 \pm 0,51 |
| Nilai minimum | 10,40 | 1,43 | 0,18 |
| Nilai maksimum | 78,40 | 2,39 | 2,25 |

Hasil ekstraksi DNA dari sampel gelatin menunjukkan nilai konsentrasi yang bervariasi dengan nilai rata-rata konsentrasi sebesar 28,26 \pm 15,79 ng/ μ L. Nilai konsentrasi terkecil adalah 10,40 ng/ μ L dan nilai konsentrasi terbesar adalah 78,40 ng/ μ L. Semua sampel gelatin memiliki nilai konsentrasi yang baik dan telah memenuhi standar untuk proses amplifikasi pada *real time* PCR. Menurut Innis *et al.* (1990), konsentrasi DNA templat yang diperlukan untuk proses amplifikasi pada PCR berkisar antara 10-100 ng/ μ L. Konsentrasi DNA akan berpengaruh pada kualitas fragmen hasil amplifikasi, sehingga konsentrasi DNA yang didapat harus baik dan memenuhi syarat (Haris *et al.* 2003). Pemeriksaan konsentrasi DNA dari hasil ekstraksi sampel gelatin penting dilakukan karena gelatin memiliki kandungan fragmen DNA yang rendah. Menurut Khayyira *et al.* (2018), gelatin diperoleh dari hidrolisis kolagen yang mengalami berbagai proses dalam pembuatannya seperti pemanasan, perendaman asam, pencucian, dan pengeringan sehingga DNA dalam gelatin dapat terdegradasi dan terpecah menjadi fragmen-fragmen DNA yang kecil.

Hasil ekstraksi DNA dari sampel gelatin menunjukkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260/280 dengan nilai rata-rata sebesar 1,91 \pm 0,11. Nilai absorbansi pada setiap sampel bervariasi, yaitu diantara rentang 1,43 – 2,39. Hasil ekstraksi DNA dengan kemurnian yang baik ditentukan oleh nilai absorbansi 260/280 yang berkisar antara 1,8 – 2,0 (Sambrook *et al.* 2001). Nilai rata-rata menunjukkan bahwa sampel memiliki nilai absorbansi 260/280 yang baik. Sebanyak 41 sampel (77,36%) memiliki nilai absorbansi 260/280 yang normal, tetapi terdapat sampel yang memiliki nilai absorbansi 260/280 dibawah 1,8 atau diatas 2,0. Sampel dengan nilai absorbansi 260/280 dibawah 1,8 berjumlah 4 sampel (7,55%), sedangkan sampel dengan nilai absorbansi 260/280 diatas 2,0 berjumlah 8 sampel (15,09%).

Nilai absorbansi 260/280 di bawah 1,8 menunjukkan bahwa DNA pada sampel masih terdapat kontaminasi protein dan polisakarida (Rosilawati 2002). Faktor yang berpengaruh pada nilai absorbansi 260/280 diatas 2,0 adalah adanya kontaminasi oleh protein, RNA, maupun pengotor lainnya yang pada saat proses ekstraksi ikut larut dalam sampel (Rahmalia *et al.* 2020). Selain itu, nilai absorbansi diatas 2,0 disebabkan oleh adanya kontaminasi fenol pada DNA. Hal ini terjadi karena fenol memiliki serapan maksimal di panjang gelombang 270 nm dan mampu memberi sumbangan kecil serapan di panjang gelombang 260 nm (Wirajana *et al.* 2013). Pembacaan pada absorbansi 260/280 bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya kontaminasi nukleotida dan protein pada DNA hasil ekstraksi (Rahmalia *et al.* 2020).

Hasil pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 260/230 menunjukkan nilai absorbansi dengan nilai rata-rata 1,49 \pm 0,51. Nilai absorbansi 260/230 dari semua sampel bervariasi, dimulai dari 0,18 hingga 2,25. Nilai absorbansi 260/230 yang normal berkisar antara 2,0 – 2,2 (Rahmalia *et al.* 2020). Nilai rata-rata menunjukkan bahwa sampel memiliki nilai absorbansi 260/230 dibawah nilai normal. Sebanyak 44 sampel (83,02%) memiliki nilai absorbansi dibawah 2,0. Sampel yang memiliki nilai absorbansi antara rentang 2,0 – 2,2 berjumlah 9 sampel (16,98%). Nilai absorbansi yang lebih kecil dari 2,0 menunjukkan bahwa pada sampel DNA kemungkinan terkontaminasi oleh karbohidrat, fenol dari ekstraksi DNA, dan residu *guanidine (iso)thiocyanate* (GITC). Menurut Munk *et al.* (2010), keberadaan GITC pada sampel tidak akan mengganggu proses amplifikasi pada *real time* PCR. Nilai absorbansi 260/230 dibawah 2,0 pada beberapa kasus tidak memiliki pengaruh yang besar terhadap hasil *real time* PCR, sehingga proses amplifikasi pada *real time* PCR masih dapat dilakukan (Rahmalia *et al.* 2020).

Prinsip kerja *nanodrop spektrofotometer* adalah DNA murni memiliki kemampuan untuk menyerap cahaya ultraviolet (UV) karena adanya basa purin dan pirimidin (Fatchiyah *et al.* 2011). Pemeriksaan nilai konsentrasi dan kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/280 dan 260/230 penting dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi pada DNA hasil ekstraksi dan untuk mengevaluasi prosedur pelaksanaan ekstraksi sampel. Proses ekstraksi DNA harus dilakukan dengan baik, benar, dan bebas dari kontaminasi agar DNA hasil ekstraksi yang diperoleh memiliki kualitas yang baik (Tenriulo *et al.* 2001). Teknik ekstraksi DNA yang tepat memiliki peran penting dalam keberhasilan teknik PCR (Tan dan Yiap 2009). Teknik PCR mensyaratkan komponen templat DNA yang digunakan memiliki konsentrasi dan kemurnian yang tinggi, sehingga proses amplifikasi dapat berjalan dengan optimal dan menunjukkan hasil yang akurat (Syahputra *et al.* 2016).

Hasil amplifikasi DNA dari sampel gelatin

Hasil amplifikasi DNA sampel gelatin pada *real time* PCR menunjukkan bahwa dari 53 sampel terdapat 4 sampel gelatin (7,55%) yang positif mengandung DNA babi. Semua sampel gelatin yang positif menunjukkan proses amplifikasi yang ditandai dengan terbentuknya grafik eksponensial pada *detection system*. Data hasil *real time* PCR dari sampel gelatin dengan hasil positif dapat dilihat pada Tabel 2.

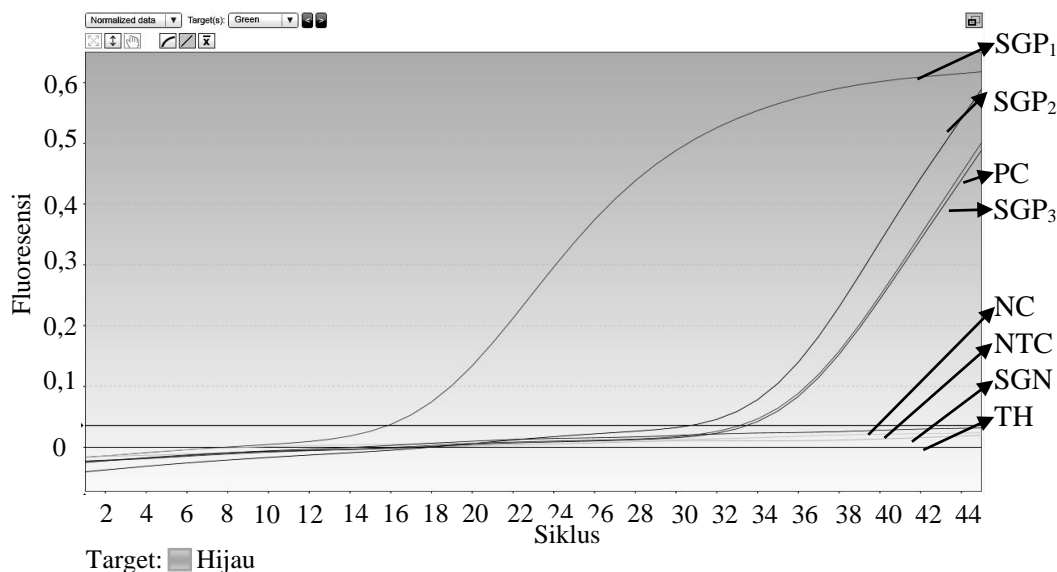
Tabel 2. Data hasil *real time* PCR positif

| No | Kode sampel gelatin | Nilai Ct |
|-----------|---------------------|--------------|
| 1 | SG 9 | 16,89 |
| 2 | SG 15 | 23,24 |
| 3 | SG 27 | 27,67 |
| 4 | SG 47 | 31,76 |
| Rata-rata | | 24,89 ± 6,37 |

Keterangan: SG = Sampel gelatin

Rata-rata nilai *cycle threshold* (Ct) dari sampel gelatin yang positif adalah 24,89 ± 6,37. Secara berturut-turut nilai Ct sampel gelatin dari yang terendah sampai yang tertinggi adalah SG 9, SG 15, SG 27, dan SG 47 (Tabel 2). Perbedaan nilai Ct pada sampel gelatin disebabkan oleh perbedaan konsentrasi DNA babi yang terkandung dalam masing-masing sampel. SG 9 memiliki nilai Ct yang terendah yaitu sebesar 16,89. Hal ini kemungkinan disebabkan karena jumlah konsentrasi DNA babi yang terdeteksi pada SG 9 lebih tinggi dibandingkan dengan sampel lainnya, sehingga kurva amplifikasi pada SG 9 teramplifikasi lebih awal (Cahyaningsari *et al.* 2019). Meskipun terdapat perbedaan, nilai Ct pada semua sampel gelatin berada pada batas kriteria yang dipersyaratkan oleh kit komersial yang digunakan yaitu Ct < 35, sehingga sampel dapat diinterpretasikan sebagai hasil positif. Sebagian besar sampel gelatin yang positif merupakan gelatin non pangan yang digunakan pada industri seperti fotografi dan elektroplating (pelapisan logam). Menurut Rahmawati dan Hasdar (2017), gelatin pada bidang fotografi dimanfaatkan untuk memperpanjang daya simpan foto, sedangkan gelatin pada bidang elektroplating (pelapisan logam) digunakan untuk memperlambat laju korosi pada logam (Hermanto dan Sulistijono 2015). Selain sampel gelatin yang positif mengandung DNA babi, hasil positif juga ditunjukkan oleh *positif control* karena memiliki kandungan DNA babi.

Sebanyak 49 sampel lainnya (92,45%) merupakan sampel gelatin dengan hasil *real time* PCR negatif. Hasil negatif ditunjukkan dengan tidak adanya proses amplifikasi pada *detection system* dan ditandai dengan gambaran grafik yang datar. *No Template Control* (NTC) merupakan sampel kosong yang biasanya berisi *Nuclease Free Water* (NFW) yang digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya kontaminasi pada sampel DNA saat melakukan proses ekstraksi. Proses ekstraksi yang baik ditunjukkan apabila gambaran grafik pada NTC adalah datar dan tidak ada proses amplifikasi. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada *negatif control* karena tidak mengandung DNA babi. *Negatif control* yang digunakan merupakan sampel yang mengandung DNA selain babi, yaitu sampel yang mengandung DNA sapi. Hasil amplifikasi DNA dari sampel gelatin, *positif control*, *negatif control*, dan NTC dapat dilihat pada Gambar 1.



Keterangan: SGP₁ = Sampel Gelatin Positif 1; SGP₂ = Sampel Gelatin Positif 2; SGP₃ = Sampel Gelatin Positif 3; PC = Positive Control; NC = Negative Control; NTC = No Template Control; SGN = Sampel Gelatin Negatif; TH = Threshold

Gambar 1. Gambar hasil amplifikasi DNA dari sampel gelatin, positif control, negatif control, dan NTC

Setiap pengujian dengan *real time* PCR yang menggunakan probe memerlukan *internal control* yang akan terdeteksi selama proses amplifikasi oleh pewarna reporter MAX dengan *channel Yellow* (VIC). *Internal control* terdapat di dalam *mericon* Pig Kit yang digunakan untuk memberikan informasi tentang keberadaan inhibitor pada sampel yang diuji dan menunjukkan keberhasilan keseluruhan proses PCR. Menurut Zambenedetti *et al.* (2017), *internal control* diperlukan untuk mencegah hasil negatif palsu yang mungkin disebabkan oleh inhibitor maupun kontaminasi yang terjadi karena prosedur uji tidak dilakukan dengan baik dan benar. *Internal control* juga digunakan sebagai kontrol kualitas pengujian pada *real time* PCR yang harus selalu teramplifikasi (Boonham *et al.* 2016). Salah satu kontrol kualitas pengujian pada *real time* PCR yang menggunakan probe adalah *internal control* harus selalu teramplifikasi. Teramplifikasinya *internal control* menunjukkan bahwa prosedur pengujian yang dilakukan sudah benar dan kit yang digunakan pada pengujian *real time* PCR dalam keadaan yang baik.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Real time PCR merupakan metode uji yang dapat digunakan untuk memeriksa adanya kandungan fragmen DNA babi pada sampel gelatin. Hasil uji sampel gelatin dari tahun 2019-2020 menunjukkan bahwa masih terdapat sampel gelatin yang mengandung DNA babi. Sebagian besar sampel gelatin yang positif mengandung DNA babi merupakan gelatin non pangan.

Saran

Saran untuk penelitian ini adalah perlu dilakukannya pengujian dan pengawasan berkelanjutan mengenai adanya kandungan DNA babi pada gelatin sebagai upaya untuk menjamin ketentraman batin masyarakat terkait aspek halal terhadap gelatin yang beredar.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah NM, Nurul H, Azhar ME, Fazilah A. 2014. Poultry as an alternative source of gelatin. *Health Environ J.* 5(1): 37-49.
- Boonham N, Tomlinson J, Mumford R. 2016. *Molecular Methods in Plant Disease Diagnostic: Principles and Protocols*. Wallingford (UK): CABI.
- BPS. 2015. Statistik Perdagangan Luar Negeri. Maret 2015. Vol. 3842508. Jakarta: Badan Pusat Statistik. <http://www.bps.go.id>. Diakses pada 15 Januari 2021.

- Cahyaningsari D, Latif H, Sudarnika E. 2019. Identifikasi penambahan daging babi pada pangan berbahan dasar daging sapi menggunakan ELISA dan qPCR. *Acta Vet Indones.* 7(2): 17-25.
- Cai H, Gu X, Scanlan MS, Ramatlapeng DH, Lively CR. 2012. Real-time PCR assays for detection and quantitation of porcine and bovine DNA in gelatin mixtures and gelatin capsules. *JFCA.* 25(1): 83–87. DOI: 10.1016/j.jfca.2011.06.008.
- Fatchiyah, Arumingtyas EL, Widyarti S, Rahayu S. 2011. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis.* Jakarta (ID): Erlangga.
- Haris N, Aswidinnoor H, Mathius NT, Purwantara A. 2003. Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) berdasarkan metode *amplified fragment length polymorphisms* (AFLP). *Menara Perkebunan.* 71(1): 1- 15. DOI: <http://dx.doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v71i1.180>.
- Hermanto K, Sulistijanto. 2015. Pengaruh pencampuran konsentrasi H_2CrO_4 dan gelatin dalam elektrolit gel terhadap ketebalan dan kekuatan lekat lapisan krom pada baja dengan metode elektroplating. *Jurnal Teknik ITS.* 4(1): 23- 28.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* New York (USA): Academic Press.
- Karim AA, Bhat R. 2009. *Fish Gelatin: Properties, Challenges, and Prospects as an Alternative to Mammalian Gelatins.* New York (US): Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>.
- Khayyira AS, Estepane VM, Malik A. 2018. Rapid PCR-based detection optimization of porcine DNA in gelatin capsule shell. *Int J App Pharm.* 10(6): 217-223.
- Munk B, Bauer C, Gronauer A, Lebuhn M. 2010. Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. *Eng Life Sci.* 10: 496–508.
- Nhari RMH, Ismail RA, Cheman YB. 2012. Analytical methods for gelatin differentiation from bovine and porcine origins and food products. *J Food Sci.* 77(1): 42–46. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02514.x.
- Pardal SJ. 2010. Menguji ekspresi gen menggunakan real time PCR. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian.* 32: 13-14.
- Rahmania YL, Widayat, Agustini TW, Suzery MI, Albaari AN. 2020. Pengukuran kandungan DNA babi dalam berbagai produk pangan dengan metode *real time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). *IJHR.* 3(2): 129-133. DOI: <https://doi.org/10.14710/halal.v3i2.10276>.
- Rahmawati YD, Hasdar M. 2017. Kualitas viskositas dan kekuatan gel gelatin kulit domba yang dihidrolisis menggunakan larutan NaOH. *Agrisaintifika.* 1(1): 70-74.
- Rosilawati ML, Sudarmono P, Ibrahim F. 2002. Sensitivitas metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dalam mendeteksi isolat klinis *Mycobacterium tuberculosis*. *J Kedokter Trisakti.* 21(1): 7-14.
- Said MI, Triatmojo S, Erwanto Y, Fudholi A. 2011. Karakteristik gelatin kulit kambing yang diproduksi melalui proses asam dan basa. *Agritech.* 31(3): 190-200. DOI: <https://doi.org/10.22146/agritech.9744>.
- Salamah N, Erwanto Y, Martono S, Maulana I, Rohman A. 2019. Differentiation of bovine and porcine gelatines using LCMS/MS and chemometrics. *Int J App Pharm.* 11(4): 159-163.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual Third Edition.* New York (USA): Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Syahputra A, Mutaqin KH, Damayanti TA. 2016. Komparasi metode isolasi DNA patogen antraknosa dan bulai untuk deteksi PCR. *J Fitopatol Indones.* 12(4): 124-132. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.12.4.124>.
- Tan SC, Yiap BC. 2009. Review article DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotech.* 2009: 1–10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2009/574398>.
- Tenriulo A, Suryati E, Parenregi A, Rosmiat. 2001. Ekstraksi DNA rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dengan metode fenol kloroform. *Marina Chimica Acta.* 2(2): 6-10.
- Wirajana IN, Yuliana DA, Ratnayani K. 2013. Isolasi DNA Metagenomik dari Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali. *Jurnal Kimia.* 7(1): 19-24.
- Zambenedetti MR, Pavoni DP, Dallabona AC, Dominguez AC, Poersch CDO, Fragozo SP, Krieger MA. 2017. Internal control for *real-time* Polymerase Chain Reaction based on MS2 bacteriophage for RNA viruses diagnostics. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 112(5): 339-347.

Verifikasi Metode Pengujian *Enterobacteriaceae* Berdasarkan ISO 16140-3:2021

Ika Kartika Syarifah^{*}, Zeze Zakiah, Mohammad Gaody, Kanti Puji Rahayu, Ery Novarieta

Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

^{*}E-mail korespondensi: ika.syarifah@gmail.com

ABSTRAK

Metode standar yang diverifikasi adalah elemen yang sangat penting dan diperlukan dalam pengujian untuk menunjukkan bahwa laboratorium mampu melakukan metode uji dengan benar. Metode verifikasi yang digunakan untuk pengujian *Enterobacteriaceae* yaitu verifikasi implementasi menggunakan sampel daging ayam untuk menentukan nilai *intralaboratory reproducibility standard deviation*. Pengujian dilakukan sebanyak 12 kali dengan 3 level populasi koloni (High, Intermediet, Low). Hasil S_{IR} pada studi ini diperoleh nilai sebesar 0,14. Verifikasi metode uji *Enterobacteriaceae* berdasarkan SNI ISO 21528-2:2017 menggunakan sampel daging ayam yang dikerjakan oleh 2 analis diperoleh hasil memenuhi persyaratan dan laboratorium mampu melakukan pengujian *Enterobacteriaceae* dengan valid.

Kata Kunci: *Enterobacteriaceae*; *Intralaboratory reproducibility standard deviation*; Verifikasi

PENDAHULUAN

Verifikasi metode adalah proses yang menunjukkan atau mengumpulkan bukti bahwa suatu metode yang digunakan oleh laboratorium sesuai dengan spesifikasi dan cocok untuk tujuan yang dimaksudkan (ISO 2021). Metode referensi yang distandarisasi dan diverifikasi adalah elemen yang sangat penting dan diperlukan dalam pengujian untuk menjamin keamanan pangan maupun pakan termasuk lingkungan produksinya. Metode standar seperti Standar Nasional Indonesia – *International Organization for Standardization* (SNI ISO) yang digunakan oleh laboratorium dan telah diverifikasi akan mengarah pada peningkatan pengakuan dan pembuktian yang lebih baik dari kriteria mikrobiologi dan juga dapat meningkatkan perlindungan konsumen (Biesta-Peters *et al.* 2018). Akhirnya, kualitas hasil pengujian yang dihasilkan oleh laboratorium yang terakreditasi dapat ditingkatkan karena verifikasi dan implementasi data validasi metode standar sebagai bagian dari sistem mutu berdasarkan ISO/IEC 17025 (ISO 2005).

Selama satu dekade terakhir ini, *Enterobacteriaceae* menjadi bagian penting sebagai indikator kebersihan untuk verifikasi proses dalam produksi pangan. Famili *Enterobacteriaceae* digunakan sebagai parameter kriteria higiene proses untuk berbagai produk pangan, seperti susu bubuk, susu formula bayi, susu pasteurisasi dan produk turunan susu lainnya; daging sapi, daging ayam dan produk daging olahannya; serta produk telur. Untuk menguji kesesuaian terhadap kriteria ini, digunakan standar SNI ISO 21528 bagian 1 (deteksi) dan bagian 2 (perhitungan koloni) sebagai metode analisis yang wajib digunakan untuk tujuan ini (SNI ISO 2017).

International Organization for Standardization 16140 bagian 3 tahun 2021 merupakan protokol untuk verifikasi metode referensi atau metode standard pada *single laboratory*. Verifikasi terdiri dari 2 bagian yaitu verifikasi implementasi dan *food items verification*. Verifikasi implementasi adalah untuk menunjukkan bahwa laboratorium mampu melakukan metode uji dengan benar. Laboratorium menggunakan satu jenis pangan yang digunakan dalam studi validasi (untuk metode kualitatif) dan jenis pangan apa pun dalam lingkup validasi (untuk metode kuantitatif) dan kemudian membandingkan hasil yang diperoleh dari verifikasi dengan hasil yang diperoleh dari validasi (yang diperoleh dari studi internasional interlaboratori yang tercantum pada metode referensi yang digunakan). *Food items verification* tujuannya adalah untuk menunjukkan bahwa laboratorium mampu menguji semua jenis pangan yang terdapat didalam lingkup pengujian di laboratorium (ISO 2021). Tujuan dari studi ini adalah melakukan verifikasi pengujian *Enterobacteriaceae* menggunakan metode uji berdasarkan SNI ISO 21528-2 tahun 2017. Metode verifikasi yang digunakan adalah berdasarkan ISO 16140-3 tahun 2021 yaitu verifikasi implementasi menggunakan sampel daging ayam untuk menentukan nilai *intralaboratory reproducibility standard deviation*.

MATERI DAN METODE

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan adalah daging ayam giling steril (dengan proses autoclave), *peptone salt solution* (PSS), *destilated water* (DW), *violet red bile glucose agar* (VRBG agar), *nutrient agar* (NA agar), *plate count agar* (PCA), pereaksi oksidase, *mineral oil*, *glucose OF medium*, dan biakan *Escherichia coli* ATCC 25922 pada kekeruhan 0.5 McFarland (koloni bakteri diperkirakan kira-kira berjumlah $1,0 \times 10^8$ cfu/gram).

Peralatan yang digunakan adalah timbangan, plastik steril, *stomacher*, *incubator*, *autoclave*, *waterbath*, McFarland densitometer, gelas ukur steril, pipet steril, cawan petri steril, ose, tabung reaksi steril dan *vortex*.

Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Pelaksanaan verifikasi uji dilakukan di Laboratorium Cemaran Mikroba lantai 1 di Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH) Bogor pada tanggal 5 Juli 2022 oleh 2 orang analis (analis A dan B).

Spiking Sampel

Jumlah sampel untuk kegiatan verifikasi ini adalah 12 sampel porsi uji untuk setiap analis. Setiap porsi uji terdiri dari 25 gram daging ayam (steril) yang ditambahkan dengan 225 ml PSS. Skema spiking jumlah koloni yang digunakan setiap porsi uji yaitu:

- Level High : 800 koloni *E. coli* dengan 4x pengulangan uji (**H1 – H4**)
- Level Intermediet : 80 koloni *E. coli* dengan 4x pengulangan uji (**I1 – I4**)
- Level Low : 8 koloni *E. coli* dengan 4x pengulangan uji (**L1 – L4**)

Untuk memperoleh jumlah koloni tersebut, berdasarkan jumlah biakan koloni *E. coli* pada 0.5 McFarland ($1,0 \times 10^8$) maka dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Spiking H} = \frac{800 \times 25}{1,0 \times 10^8} = 2 \text{ ml pada pengenceran } 10^{-4}$$

$$\text{Spiking I} = \frac{80 \times 25}{1,0 \times 10^8} = 2 \text{ ml pada pengenceran } 10^{-5}$$

$$\text{Spiking L} = \frac{8 \times 25}{1,0 \times 10^8} = 2 \text{ ml pada pengenceran } 10^{-6}$$

Skema spiking sampel untuk mendapatkan jumlah koloni yang diinginkan pada setiap porsi uji dijabarkan pada Gambar 1.

Metode Uji *Enterobacteriaceae*

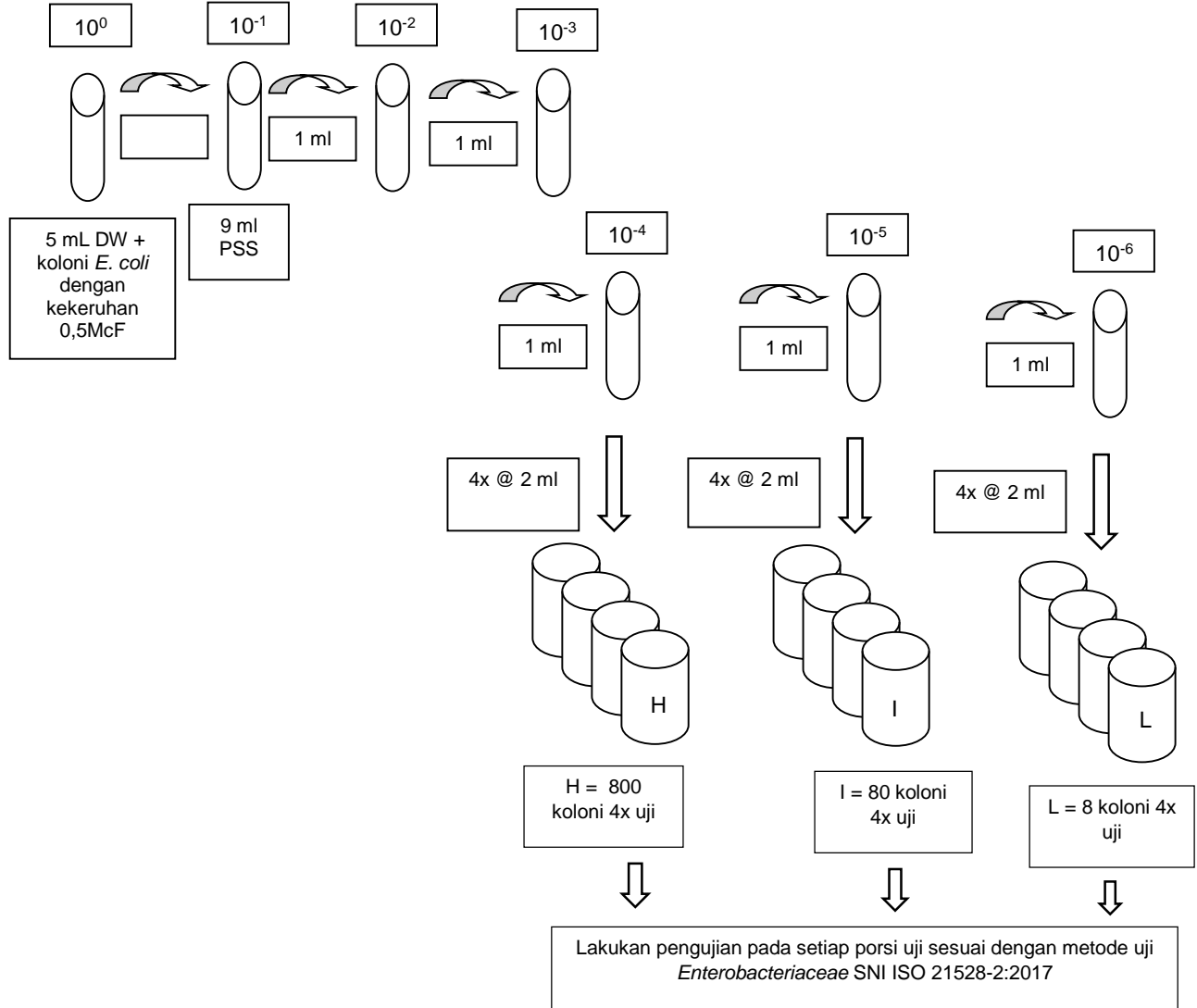
Metode uji *Enterobacteriaceae* pada penelitian ini berdasarkan pada SNI ISO 21528-2:2017 tentang Mikrobiologi rantai pangan - Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi *Enterobacteriaceae* bagian 2: Perhitungan koloni. Setiap pengujian melakukan uji sebanyak 12 kali, yaitu terdiri dari 4 kali pengulangan uji pada level High (H), 4 kali pengulangan uji pada level Intermediet (I), 4 kali pengulangan uji pada level Low (L).

Pada level H uji dilakukan hingga pengenceran 10^{-3} , pada level I uji dilakukan hingga pengenceran 10^{-2} , sedangkan pada level L uji dilakukan hingga pengenceran 10^{-1} . Masing-masing cawan petri dipipet sebanyak 1 ml dari setiap pengenceran secara simplo. Tiap cawan petri yang berisi inokulum dituang VRBG agar sebanyak ± 15 ml (suhu agar 44°C - 47°C). Selanjutnya inokulum dihomogenkan dengan agar secara hati-hati dengan gerakan horizontal, kemudian dibiarkan memadat. Selanjutnya ditambahkan kembali sebanyak 5 ml-10 ml VRBG agar ke atas permukaan agar yang sebelumnya telah memadat. Inkubasi di inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam ± 2 jam dengan posisi tutup cawan petri berada dibawah.

Karakteristik koloni terduga *Enterobacteriaceae* adalah berwarna pink hingga kemerahan atau keunguan dengan atau tanpa adanya *halo*. Pilih secara acak 5 koloni, kemudian subkultur ke media NA. Lakukan uji biokimia reaksi oksidase dan fermentasi glukosa. Perhitungan koloni dilakukan berdasarkan ISO 7218:2007 tentang *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*.

Analisis Data

Data yang dihasilkan dari hasil penelitian ini dianalisis secara statistik dan disajikan dalam bentuk tabel.



Gambar 1. Skema persiapan spiking koloni *E.coli* pada setiap porsi uji

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil verifikasi yang diperoleh sesuai dengan yang diharapkan. Jumlah koloni pada level H diperoleh hasil antara 650 sampai 970 koloni. Pada level I diperoleh koloni antara 50 sampai 160, sedangkan pada level L diperoleh antara 6 sampai 10 koloni. Pada salah satu level L terdapat sampel yang tidak ditumbuhi oleh koloni *E.coil*. Hasil verifikasi dijabarkan pada Tabel 1. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Tabel 1. maka perhitungan statistik hasil intralaboratori reproduibilitas standar deviasi dihitung pada Tabel 2.

Nilai keberterimaan dari *intralaboratory reproducibility standard deviation* pada metode yang diverifikasi (S_{IR}) adalah $\leq 2 \times$ nilai terendah dari rata-rata nilai *intralaboratory reproducibility standard deviation food items* yang digunakan pada studi validasi (S_R). Nilai S_R diperoleh dari rata-rata nilai terendah hasil studi validasi pada dokumen SNI ISO 21528-2:2017, dimana nilai S_R adalah 0,18. Sehingga, nilai batas penerimaannya yaitu $\leq 0,36$ ($2 \times 0,18$).

Tabel 1. Hasil verifikasi pengujian *Enterobacteriaceae*

| No Sampel | A (cfu/g) | B (cfu/g) |
|-----------|----------------|-----------|
| 1 | 720 | 910 |
| 2 | 650 | 970 |
| 3 | 830 | 800 |
| 4 | 690 | 870 |
| 5 | 80 | 80 |
| 6 | 60 | 90 |
| 7 | 70 | 130 |
| 8 | 50 | 160 |
| 9 | 10 | 10 |
| 10 | 10 | 10 |
| 11 | 10 | 10 |
| 12 | Tidak ada data | 6 |

Tabel 2. Hasil perhitungan verifikasi kuantitatif pengujian *Enterobacteriaceae*

| No Sampel | A (cfu/g) | B (cfu/g) | log 10 A (yA) | log 10 B (yB) | yA-yB | (yA-yB) ² |
|-----------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------------------|----------------------|
| 1 | 720 | 910 | 2,857332496 | 2,959041392 | -0,1017089 | 0,0103447 |
| 2 | 650 | 970 | 2,812913357 | 2,986771734 | -0,1738584 | 0,0302267 |
| 3 | 830 | 800 | 2,919078092 | 2,903089987 | 0,01598811 | 0,0002556 |
| 4 | 690 | 870 | 2,838849091 | 2,939519253 | -0,1006702 | 0,0101345 |
| 5 | 80 | 80 | 1,903089987 | 1,903089987 | 0 | 0 |
| 6 | 60 | 90 | 1,77815125 | 1,954242509 | -0,1760913 | 0,0310081 |
| 7 | 70 | 130 | 1,84509804 | 2,113943352 | -0,2688453 | 0,0722778 |
| 8 | 50 | 160 | 1,698970004 | 2,204119983 | -0,50515 | 0,2551765 |
| 9 | 10 | 10 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 10 | 10 | 10 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 11 | 10 | 10 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 12 | - | 20 | - | 1,301029996 | not used | not used |
| | | | | | SUM | 0,409424 |
| | | | | | SUM/(2x10) | 0,0204712 |
| | | | | | S_{IR} | 0,1430776 |

Hasil S_{IR} pada studi ini diperoleh nilai sebesar 0,14. Nilai tersebut diperoleh dengan perhitungan statistika yang dijelaskan pada Tabel 2. Berdasarkan hasil tersebut dimana nilai S_{IR} kurang dari nilai S_R sehingga verifikasi pada metode uji *Enterobacteriaceae* yang dilakukan pada studi ini valid dan memenuhi syarat.

Angka S_R yang diperoleh pada dokumen SNI ISO 21528-2:2017 merupakan hasil dari validasi atas perintah Komisi Eropa (*European Commission*) di bawah mandat M/381. Empat belas laboratorium dari tujuh negara Eropa berpartisipasi dalam uji coba kolaboratif, yang diselenggarakan oleh Otoritas Keamanan Produk Makanan dan Konsumen Belanda (*The Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority*) Wageningen/Utrecht, Belanda. Lima matriks berbeda dari kategori makanan yang berbeda dipilih untuk diuji dalam uji kolaboratif, untuk memvalidasi metode secara horizontal, menurut ISO 16140. Matriks tersebut termasuk daging, tiramisu, susu formula, telur cair, salmon asap (hanya metode deteksi/kualitatif) dan pakan ternak (hanya metode perhitungan koloni/kuantitatif). Daging mentah dan telur cair secara alami terkontaminasi dan matriks lainnya secara artifisial terkontaminasi dengan campuran empat strain *Enterobacteriaceae* yang berbeda.

Metode deteksi Enterobacteriaceae menunjukkan spesifisitas dan sensitivitas di atas 95% untuk semua matriks. Metode perhitungan koloni memiliki batas repeatability r sebesar 0,37 (dinyatakan sebagai selisih antara hasil uji transformasi log₁₀) dan batas reproducibility R sebesar 0,87 yang dinyatakan sebagai selisih antara hasil pengujian transformasi log₁₀ (Biesta-Peters *et al.* 2018).

KESIMPULAN

Verifikasi metode uji *Enterobacteriaceae* berdasarkan SNI ISO 21528-2:2017 menggunakan sampel daging ayam yang dikerjakan oleh 2 analis diperoleh hasil memenuhi persyaratan dimana nilai S_{IR} yang diperoleh kurang dari nilai S_R . Laboratorium BPMSPPH mampu melakukan pengujian *Enterobacteriaceae* dengan valid sesuai dengan metode verifikasi ISO 16140-3:2021.

DAFTAR PUSTAKA

- Biesta-Peters, EG., Kinders, SM., de Boer, E. (2018). Validation by an interlaboratory collaborative trial of EN ISO 21528 -microbiology of the food chain - horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. *J.I. Foodmicro*, 05(006).
- [ISO] International Organization for Standardization. (2005). EN ISO/IEC 17025 General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. Geneva.
- [ISO] International Organization for Standardization. (2021). ISO 16140:3 - Protocol for the Verification of Reference Methods and Validated Alternative Methods in a Single Laboratory. Geneva.
- [SNI-ISO] Standar Nasional Indonesia - International Organization for Standardization. (2017). SNI ISO 21528 - Microbiology of the Food Chain – Horizontal Methods for the Detection and Enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony- Count Technique. International Organization for Standardization, Geneva.

Validasi Metode Pengujian Penyakit Mulut dan Kuku Menggunakan Reverse Transcription Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Hanif Anisatun*, Innes Maulidya, Puji Rahayu

Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan

*E-mail korespondensi: hanif.anisatun@pertanian.go.id

ABSTRAK

Penyakit Mulut dan Kuku saat ini menjadi isu strategis nasional yang mendapatkan perhatian khusus untuk segera ditangani. Dalam rangka menjamin produk hewan yang ASUH dan bebas dari PMK diperlukan suatu metode yang memenuhi standar reliabilitas, akurasi, dan presisi sesuai tujuan yang diharapkan sehingga harus dilakukan validasi terhadap metode tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memvalidasi penggunaan metode *pengujian reverse transcription real-time polymerase chain reaction* (RT-qPCR) untuk identifikasi penyakit mulut dan kuku pada produk hewan. Berdasarkan hasil validasi pengujian PMK dengan primer 3D dan primer UTR menggunakan real time PCR diperoleh hasil bahwa metode uji PMK menggunakan *real time PCR* dinyatakan *robust*. Presisi reproduibilitas dan intra reproduibilitas memenuhi syarat. *Limit of detection* pengujian ini terhadap primer 3D dan UTR adalah masing-masing sebesar 10^0 atau 10 copy RNA, selain itu tidak terjadi reaksi silang terhadap uji spesifisitas.

Kata kunci : Validasi, PMK, RT-qPCR

PENDAHULUAN

Penyakit Mulut dan Kuku (PMK) dinyatakan kembali mewabah di Indonesia sejak Mei 2022 berdasarkan Surat Rekomendasi Pejabat Otoritas Veteriner Nasional Nomor: 07002/PK.300/F4/OS/2002 tanggal 7 Mei 2022 setelah sebelumnya dinyatakan bebas oleh OIE pada tahun 1990. Wabah PMK saat ini menjadi isu strategis nasional yang mendapatkan perhatian khusus untuk segera ditangani karena dampaknya yang tidak hanya menginfeksi ternak, namun juga berdampak pada perekonomian negara dan penghidupan secara ekonomi bagi peternak, serta kebutuhan pangan hewani masyarakat. Hingga november 2022 tercatat 16 provinsi dengan laporan kasus aktif PMK (Kementan, 2022). PMK disebabkan oleh virus RNA yang termasuk ke dalam genus *Aphthovirus*, family *Picornaviridae*. Virus ini memiliki 7 serotype, yaitu A, O, C, South African Teritorry (SAT) 1, 2, 3, dan Asia 1 (Kozat *et al.*, 2015). Diagnosa PMK di lapangan dapat dilihat dari gejala klinis yang muncul, seperti adanya lepuh atau lesi pada gusi, mukosa mulut, dan lidah, hipersalivasi, serta luka pada bagian kuku, sedangkan diagnosa di laboratorium dapat dilakukan dengan isolasi, uji serologi seperti ELISA dan molekuler dengan PCR. Pengujian menggunakan PCR merupakan uji yang direkomendasikan oleh OIE (OIE, 2012).

Untuk mengkonfirmasi bahwa suatu metode memenuhi standar reliabilitas, akurasi, dan presisi sesuai tujuan yang diharapkan maka harus dilakukan validasi terhadap metode tersebut (Ahuja dan Dong, 2005). Dalam validasi metode, terdapat empat tahapan yang harus dilalui, yaitu perencanaan, pelaksanaan, pengolahan dan evaluasi data, serta pelaporan (perekaman) hasil. Terdapat beberapa parameter validitas metode pengujian, diantaranya adalah *robustness*, reproduibilitas, *limit of detection*, dan spesifisitas. *Robustness* dapat diartikan sebagai pengukuran kapabilitas dari suatu metode untuk tetap tidak terpengaruhi oleh adanya variasi parameter metode yang kecil (Yuwono dan Indrayanto, 2005). Reprodusibilitas merupakan pengulangan pengujian yang bertujuan untuk mengukur keragaman nilai hasil pengujian terhadap sampel yang sama dengan analisis dan peralatan yang berbeda yang dilakukan pada satu atau lebih laboratorium dalam waktu yang sama atau berbeda. Limit deteksi adalah konsentrasi analit terendah yang masih dapat dideteksi meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Spesifisitas merupakan kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dengan adanya komponen - komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks (USP XXXVII, 2014).

Saat ini BPMSPH ditunjuk menjadi salah satu laboratorium yang bertugas melakukan pengujian PMK pada produk asal hewan. Sebagai laboratorium pengujian yang telah terakreditasi ISO 17025:2017, BPMSPH memiliki kewajiban untuk melakukan proses validasi, termasuk melakukan validasi terhadap metode pengujian PMK menggunakan PCR sesuai dengan klausul 7.2 ISO/IEC 17025:2017.

MATERI DAN METODE

Pengujian dilakukan pada sampel produk pangan asal hewan beserta turunannya seperti daging, kulit, bulu, organ jeroan, cairan sputum, swab lesi, limfoglandula, atau material lain yang diduga mengandung virus PMK. Pengujian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan (BPMSPH), Bogor.

Alat yang digunakan dalam pengujian ini adalah microcentrifuge, vortex, *biosafety cabinet class*, micropipet dan microtips dengan filter masing-masing untuk ukuran 0.1-2.5 µl; 2-20 µl; 20-200 µl dan 100-1000 µl, tabung microcentrifuge 1.5 ml dan 2 ml, tabung conical 15 ml, mesin *realtime rotorgene* by Qiagen, microsmash tomy, gunting, dan pinset steril.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan KiCqStart™ One-Step Probe RT-qPCR, QIAamp Viral RNA kit by Qiagen® yang berisi AVL buffer, Carrier RNA, AW1, AW2, AVE buffer, received tubes, QIAmp mini column disertai dengan bahan tambahan 99.8% ethanol (ethanol absolut) dan PBS steril yang tidak disertai dalam KIT. Bahan acuan (kontrol positif) yang digunakan adalah bahan acuan terstandar berupa RNA sintetik dengan jumlah 10⁶ copy RNA.

Primer dan Probe Sequence Uji Realtime RT-PCR PMK yang diperoleh dari manufaktur umumnya berbentuk kering beku atau *desalted* dengan satuan konsentrasi nanomol (nmol). Uji PCR menggunakan *working solution primer* dengan konsentrasi 20 µM untuk *primer forward* dan *primer reverse*, sedangkan probe menggunakan konsentrasi 10 µM. Sebelum digunakan, dilakukan pembuatan *working solution* (primer/probe) *stock* konsentrasi 100 µM dengan rumus 1 nmol primer *desalted* x 10 µl buffer TE atau *Nuclease Free Water* (NFW). Untuk mendapatkan *working solution primer* 20 µM, ke dalam *working solution stock* ditambahkan 8 bagian NFW atau buffer TE. *Primer/Probe Sequence* dalam validasi metode yang digunakan tertulis pada Tabel 1.

Tabel 1. Primer/Probe Sequence

| Primer | Sequence |
|--------|---|
| UTR | 5'UTR Forward primer: CACYT-YAAGR-TGACA-YTGRT-ACTGG-TAC; 5'UTR Reverse primer: CAGAT-YCCRA-GTGWC-ICITG-TTA, Labelled probe: FAM-CCTCG- GGGTA-CCTGA-AGGGC-ATCC-TAMRA |
| 3D | 3D Forward primer: ACTGG-GTTTT-ACAAA-CCTGT-GA; 3D Reverse primer: GCGAG-TCCTG-CCACG-GA Labelled probe: FAM-TCCTT-TGCAC-GCCGT- GGGAC-TAMRA. |

Identifikasi viral RNA PMK pada produk pangan asal hewan menggunakan teknik *Realtime PCR/Quantitative PCR (qPCR)*. Spesimen diekstraksi sesuai standar prosedur Viral RNA Kit (Qiagen, Germany). RNA hasil ekstraksi dapat langsung digunakan untuk amplifikasi PCR dan dapat disimpan pada suhu -20°C hingga -80°C untuk penyimpanan yang lebih lama.

Amplifikasi. Proses amplifikasi diawali dengan penambahan *master mix* PCR. Volume total untuk 1 reaksi pengujian adalah 25 µl (20 µl *master mix* + 5 µl RNA contoh). Untuk pengujian dengan jumlah contoh lebih dari 1 (n>1), reaksi pengujian dilakukan dengan mengalikan masing-masing komponen *master mix* dengan jumlah reaksi yang dibutuhkan kemudian *dialiquot* masing-masing sesuai dengan jumlah reaksi. Untuk menjamin mutu atau sebagai *Quality Assurance*, setiap pengujian wajib menyertakan paling sedikit 1 (satu) kontrol positif (PTC), 1 (satu) kontrol negatif (NTC), dan EC (*extraction control*). Komponen *master mix* untuk pengujian Real-Time PCR tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Komponen master mix untuk pengujian realtime PCR

| Komponen | Volume 1 reaksi (µl) |
|---------------------------|----------------------|
| 1 step RT-qPCR Master Mix | 12.5 |
| Nuclease Free Water | 2 |
| Primer Forward | 2 |
| Primer Reverse | 2 |
| Probe | 1.5 |
| Total Master Mix | 20 |
| RNA | 5 |

Profil PCR/Set Up Temperatur. Program amplifikasi pada metode uji qPCR, yaitu dengan cDNA sintesis 50°C selama 10 menit, *aktivasi enzim (HOLD)* 95°C selama 1 menit, kemudian dengan *2-step cycling* (diulang sebanyak 50 kali) dengan kondisi PCR seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Kondisi PCR

| Primer | Kondisi Reaksi |
|--------|-----------------------------------|
| UTR | 50°C 2 min, 95°C 10 min |
| 3D | 95°C 15 sec, 60°C 1 min, 50 cycle |

Analisis dan Interpretasi hasil. Analisis dan Interpretasi hasil pengujian RT-PCR dilakukan menggunakan software yang tersedia dalam mesin RT-PCR Rotorgene Qiagen. Penetapan hasil dilakukan dengan menentukan nilai *threshold* (Th) dan *Cycle Threshold* (Ct). Th adalah suatu level normalisasi dari sinyal reporter yang digunakan untuk menentukan Ct. Ct adalah siklus pada saat sinyal *fluorescent reporter* (berhubungan dengan akumulasi amplicon tertentu) yang menembus batas Th. Hasil analisis uji contoh dapat diinterpretasi **Positif** apabila memiliki kurva amplifikasi dengan karakteristik mirip dengan kontrol positif (Ct < 45), sedangkan hasil **Negatif/undetectable** dinyatakan apabila tidak ada kurva amplifikasi dengan karakteristik mirip kontrol positif (Ct > 50). Hasil dinyatakan **Indeterminate** (tidak dapat ditentukan)/**Dubius** jika Ct berada pada rentang 45 hingga 50.

HASIL DAN PEMBAHASAN

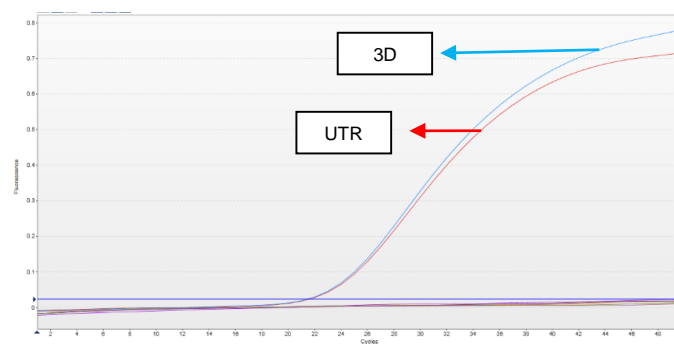
PMK adalah penyakit mamalia yang paling menular dan memiliki potensi besar untuk menyebabkan kerugian ekonomi yang besar pada hewan berkuku belah yang rentan. *Real-time Reverse Transcriptase* PCR (rRT-PCR) adalah teknik yang dikembangkan untuk analisis terhadap molekul RNA hasil transkripsi yang terdapat dalam jumlah sangat sedikit di dalam sel. Dikarenakan PCR tidak dapat dilakukan dengan menggunakan RNA sebagai cetakan, maka terlebih dahulu dilakukan proses transkripsi balik (*reverse transcriptase*) terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul cDNA (*complementary DNA*). Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Pengujian ini menggunakan 4 parameter validasi metode analisis yang meliputi robustness, reproduibilitas, intrareproduktibilitas, limit deteksi dan spesifisitas. Validasi terhadap suatu metode analisa menjadi faktor yang penting karena metode analisa yang telah dibuktikan hasil pengukurannya dapat dipertanggung jawabkan dan dipergunakan sebagai landasan dalam pengujian berikutnya.

Robustness

Sebagai pengukuran kapabilitas dari suatu metode untuk tetap tidak terpengaruhi oleh adanya variasi parameter metode yang kecil (Yuwono dan Indrayanto, 2005) maka parameter uji *robustness* dilakukan dengan mengurangi volume *Probe Master Mix* menjadi 10 µl per sampel RNA (rutin digunakan 12.5 µl per sampel RNA) pada masing-masing primer secara duplo. Jumlah DNA per sampel yang diuji adalah 10³. Hasil uji yang diperoleh dijabarkan pada Tabel 4. Hasil pengujian terhadap kelompok sampel positif dengan rRT-PCR menunjukkan bahwa seluruh sampel DNA teramplifikasi pada *detection system* dengan rata-rata nilai *cycle threshold* (Ct) yang dihasilkan pada primer 3D sebesar 24,48 ± 0.2 dan primer UTR sebesar 26.16 ± 0.02. Metode *real-time* PCR pada pengujian *robustness* mampu mendeteksi DNA PMK pada seluruh sampel, yang ditunjukkan dengan adanya amplifikasi. Pengujian ini sesuai dengan pernyataan Nicolas *et al.* (2002), bahwa *real-time* PCR dengan adalah teknik sederhana yang dapat diandalkan dan terbukti efektif untuk deteksi. Kurva *real time* PCR hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 4. Hasil *robustness* uji PMK menggunakan *real time* PCR

| Jenis Primer | Volume <i>Probe Master Mix</i> | Jumlah RNA | Hasil PCR (duplo) | | Rata-rata Ct ± SD | Min-Max Ct |
|--------------|--------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|---------------|
| | | | a (Ct) | b (Ct) | | |
| 3D | 10 µl | 10 ³ | Positif (24.34) | Positif (24.62) | 24,48 ± 0.2 | 24.34 – 24.62 |
| UTR | 10 µl | 10 ³ | Positif (26.17) | Positif (26.14) | 26,16 ± 0.02 | 26.14 – 26.17 |



Gambar 1. *Robustness*

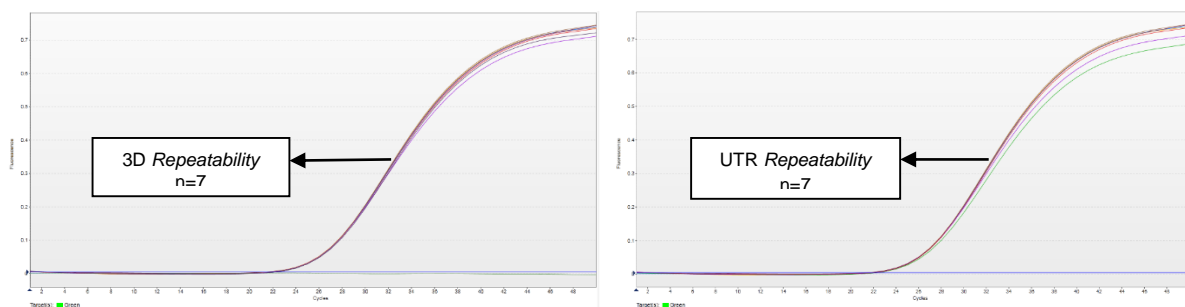
Repeatability

Repeatability dilakukan dengan 7 kali pengulangan pada sampel positif (jumlah RNA 10^3) dan 7 kali pengulangan menggunakan sampel negatif pada masing-masing primer. Hasil uji yang diperoleh dijabarkan pada Tabel 5.

Tabel 5. *Repeatability* uji PMK menggunakan *real time* PCR

| Jenis Primer | Sampel | Hasil uji pengulangan (Ct) | | | | | | | Rata-rata Ct \pm SD | Min-Max Ct |
|--------------|--------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|---------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | |
| 3D | Positif (10^3) | Positif (24.69) | Positif (24.93) | Positif (24.78) | Positif (24.88) | Positif (24.76) | Positif (25.02) | Positif (24.86) | 24,85 \pm 0.1 | 24.69 – 25.02 |
| | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | - | - |
| UTR | Positif (10^3) | Positif (25.97) | Positif (26.19) | Positif (26.05) | Positif (26.13) | Positif (26.00) | Positif (26.29) | Positif (26.12) | 26.11 \pm 0.1 | 25.97 – 26.29 |
| | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) | - | - |

Hasil pengujian terhadap kelompok sampel positif dengan rRT-PCR menunjukkan bahwa seluruh sampel DNA teramplifikasi pada *detection system* dengan rata-rata nilai *cycle threshold* (Ct) yang dihasilkan pada primer 3D sebesar $24,85 \pm 0.1$ dan primer UTR sebesar 26.11 ± 0.1 . Hasil pengujian terhadap kelompok sampel negatif yang digunakan dalam penelitian ini tidak memperlihatkan adanya amplifikasi sehingga tidak ada nilai Ct yang dihasilkan (Gambar 2).



Gambar 2. *Repeatability*

Intra Reproducibility

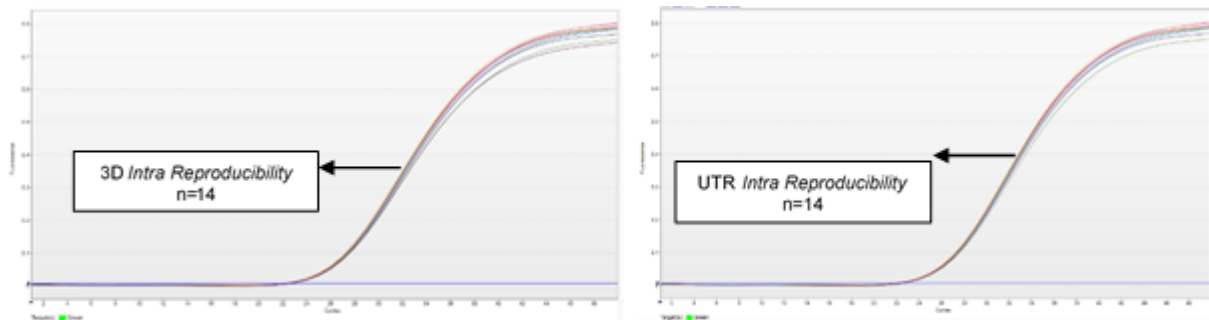
Intra reproducibility dilakukan dengan 7 kali pengulangan pada sampel positif (jumlah RNA 10^3) dan 7 kali pengulangan menggunakan kontrol negatif. Pengujian ini dilakukan dengan mencari nilai p melalui uji T terhadap hasil dari dua pengujian. Hasil uji T terhadap dua pengujian dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Uji T terhadap nilai *cycle threshold* (Ct) kerbau dengan qPCR

| Jenis Primer | Jenis Sampel | n | % positif teramplifikasi | Rataan Ct \pm SD ¹⁾ | Min-Max Ct ²⁾ | Nilai p ³⁾ |
|--------------|--------------|---|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 3D | Penguji 1 | 7 | 100 | 24,85 \pm 0.1 | 24.69 – 25.02 | 0,085566 |
| | Penguji 2 | 7 | 100 | 25,03 \pm 0,34 | 24,73 – 25,85 | |
| UTR | Penguji 1 | 7 | 100 | 26.11 \pm 0.1 | 25.97 – 26.29 | 0,218285 |
| | Penguji 2 | 7 | 100 | 26,17 \pm 0,09 | 26.00 – 26.29 | |

Keterangan = 1) Rataan Ct \pm SD = Nilai rata-rata Ct (*cycle threshold value*) ketujuh sampel dan nilai standar deviasinya.
 2) Min-Max Ct = Nilai minimum dan maksimum Ct (*cycle threshold value*)
 3) Nilai p = tidak berbeda nyata jika $p > 0,05$

Hasil uji t terhadap nilai Ct pada hasil pengujian 1 dan pengujian 2 dengan primer 3D diperoleh nilai p sebesar 0,085566 sedangkan primer UTR sebesar 0,218285. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata dalam mendeteksi DNA PMK pada dua pengujian dengan menggunakan metode *real-time* PCR ($p > 0,05$). Nilai Ct pada penelitian ini masih berada pada batas kriteria yang dipersyaratkan oleh kit komersial yang digunakan (Ct < 45). Kurva amplifikasi ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Intra Reproducibility

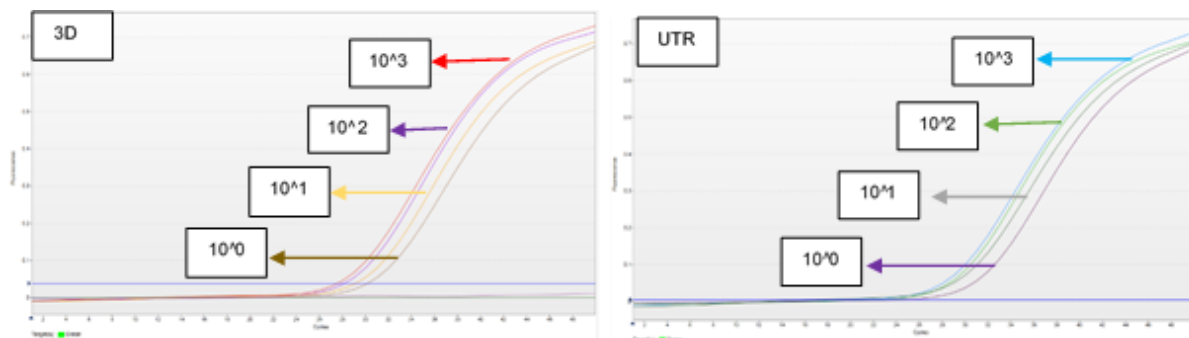
Limit of Detection (LOD)

Uji LOD dilakukan dengan menggunakan RNA sintetik sebesar 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 ; 10^0 , dan 10^{-1} pada masing-masing primer. Hasil uji yang diperoleh dijabarkan pada Tabel 7 dan Gambar 4.

Tabel 7. Hasil *limit of detection* (LOD) uji PMK menggunakan *real time* PCR

| Jenis Primer | Jumlah RNA Sintetik (Copy DNA) | Hasil PCR (Rata-Rata Duplo) |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 3D | 10^3 | Positif (27.57) |
| | 10^2 | Positif (28.16) |
| | 10^1 | Positif (29.13) |
| | 10^0 | Positif (30.17) |
| | 10^{-1} | Negatif (No Ct) |
| | NFW | Negatif (No Ct) |
| UTR | 10^3 | Positif (29.14) |
| | 10^2 | Positif (30.56) |
| | 10^1 | Positif (31.21) |
| | 10^0 | Positif (33.54) |
| | 10^{-1} | Negatif (No Ct) |
| | NFW | Negatif (No Ct) |

Berdasarkan data pada Tabel 8, diperoleh nilai batas deteksi PCR untuk kesensitifan primer spesifik PMK sebesar 10^0 dengan nilai Ct primer 3D 30,17 dan primer UTR 33,54. Hasil yang baik ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kemurnian DNA hasil ekstraksi, ketepatan kondisi reaksi PCR, serta ketepatan pemilihan primer juga berpengaruh untuk mendapatkan *limit of detection* dengan konsentrasi yang rendah. Primer merupakan bagian penting dalam reaksi amplifikasi DNA karena merupakan penggerak utama pada sintesis DNA. Ketepatan kondisi pada reaksi PCR merupakan faktor utama dalam menentukan keberhasilan suatu reaksi PCR. Ketepatan kondisi reaksi ditentukan oleh ketepatan campuran reaksi dan ketepatan kondisi suhu pada masing-masing siklus (Lelana *et al.* 2003).



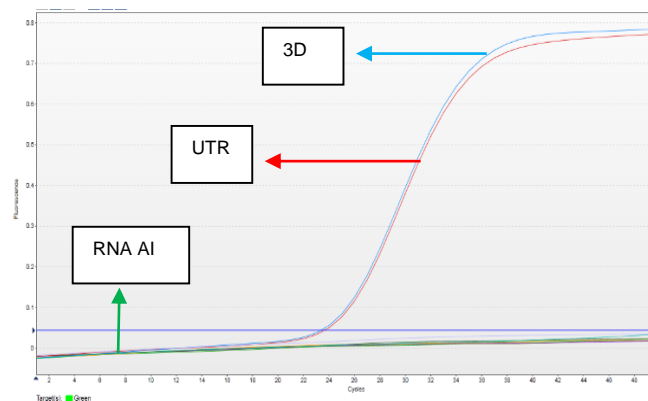
Gambar 4. Limit of Detection

Spesificity

Spesificity dilakukan dengan menggunakan sampel RNA Avian Influenza Serotype A terhadap primer 3D dan UTR. Uji dilakukan secara duplo. Hasil uji yang diperoleh dijabarkan pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil spesifisitas uji PMK menggunakan *real time* PCR

| Jenis Primer | Sampel (reaksi silang) | Hasil PCR (duplo) | |
|--------------|----------------------------|-------------------|-----------------|
| | | A (Ct) | B (Ct) |
| 3D | RNA Avian Influenza Type A | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) |
| UTR | RNA Avian Influenza Type A | Negatif (No Ct) | Negatif (No Ct) |



Gambar 5. Specificity

Hasil yang ditunjukkan pada Tabel 8 pada uji spesifisitas antar gen tidak menghasilkan adanya reaksi silang yang mungkin ada dalam sampel. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya nilai *cycle threshold* (Ct) yang dihasilkan pada *RNA Avian Influenza* (Gambar 5). Analisis spesifisitas dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan analit pada sampel yang dilakukan dengan membandingkan bahan pembanding yang diketahui secara pasti seperti standar dan sampel yang mengandung analit (sebagai respon positif) serta sampel yang tidak mengandung analit (sebagai respon negatif) untuk memastikan bahwa respon positif tidak diperoleh adanya bahan yang secara struktural mirip atau terkait erat dengan analit (USP, 2005). Hasil uji parameter spesifisitas memperoleh hasil spesifisitas 100%, karena sampel tidak menghasilkan nilai amplifikasi (parameter spesifisitas memenuhi syarat). Berdasarkan hasil pengujian, metode *real-time Polymerase Chain Reaction* (qPCR) mampu mengidentifikasi RNA PMK secara spesifik dengan keakuratannya yang tinggi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil validasi pengujian PMK dengan primer 3D dan primer UTR menggunakan *real time PCR* diperoleh hasil bahwa metode uji PMK menggunakan *real time PCR* dinyatakan *robust*. Presisi reproduibilitas dan intra reproduibilitas memenuhi syarat. *Limit of detection* pengujian ini terhadap primer 3D dan UTR adalah masing-masing sebesar 10^0 atau 10 copy RNA, selain itu tidak terjadi reaksi silang terhadap uji spesifisitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahuja S, Dong MW. 2005. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC edisi 1. United Kingdom: Elsevier Inc., p.191-217, 401-412.
- Kementan. 2022. Leaflet PMK. Terhubung bekala [www.pertanian.go.id]
- Kozat S, Yildirim S, Ozbek M. 2015. Foot and Mouth Disease. Researchgate. Terhubung berkala [https://www.researchgate.net/publication/349042373]
- 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.
- OIE. 2012. Foot and Mouth Disease Chapter 2.1.5. p.7-8
- United States Pharmacopeial Convention. 2014. The United States Pharmacopeia 37 -National Formulary 32 (USP37-NF32). 37th Edition. Rockville USA: United States Pharmacopeial Convention Inc.
- United States Pharmacopeia. 2005. The National Formulary: NF 26. Washington DC (USA): United States Pharmacopeial Convention.
- Yuwono M, Indrayanto G. 2005. Validation of Chromatographic Method of Analysis. Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Vol. 32, p. 243-259.
- Lelana NEOE, Sutarno, Etikawati E. 2003. Identifikasi Polimorfisme pada Fragmen ND-5 DNA Mitokondria Sapi Benggala dan Madura dengan Teknik PCR-RFLP. *Roy soc ch.* 4(1): 1-6.



Kementerian Pertanian Republik Indonesia
Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Produk Hewan
Jalan Pemuda No.29 A Bogor 16161
Telp: (0251)8353712, 8377111, Faksimili : (0251)8353712
Website : bpmsph.ditjenpkh.pertanian.go.id / bpmsph.org
E-Mail : bpmsph@pertanian.go.id / bpmsph@yahoo.com

PERTANIAN

ISBN 977-250-204-601-5



9 772502 046015