

Sensitivitas *Real-Time Polymerase Chain Reaction* dengan Primer Tanabe dalam Mendeteksi Gelatin Babi pada *Confectionery*

[*Sensitivity of Real-Time Polymerase Chain Reaction with Primer Tanabe for Detecting Porcine Gelatin in Confectionery*]

Said Naufal Hibaturrahman¹⁾, Feri Kusnandar^{1,2,3)}, Nancy Dewi Yuliana^{1,2,3)*}, dan Heryani²⁾

¹⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia

²⁾ Lembaga Pengkajian Pangan Obat-obatan dan Kosmetik Majelis Ulama Indonesia, Global Halal Center, Bogor, Indonesia

³⁾ Pusat Kajian Sains Halal, IPB University, Bogor, Indonesia

Diterima 18 November 2022 / Disetujui 29 Mei 2023

ABSTRACT

Gelatin is commonly used as a gelling and thickening agent in confectionery products and is considered a critical material in terms of its halal status. Real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) is frequently employed as an analytical tool to detect traces of pork in food items. Although the real-time PCR method using the Tanabe primer and Internal Positive Control (IPC) has been validated effectively, its sensitivity or Limit of Detection (LOD) for confectionery products has yet to be determined. This study aims to determine the sensitivity of real-time PCR with Tanabe primers and IPC towards the confectionery products (gummy candy, marshmallow, and lozenges). Confirmation of this method on commercial marshmallow products known to contain porcine gelatin was also carried out. In this study, the LOD (% w/w) of porcine gelatin in bovine gelatin was initially determined. The findings revealed that the LOD (% w/w) was 0.01% with a cycle threshold (Ct) value of 39.20 ± 1.72 . The next step involved determining the LOD (% w/w) of porcine gelatin in various confectionery products such as lozenges, gummy candy, and marshmallows. The LOD (% w/w) for lozenges and gummy candy was found to be 0.1% with Ct values of 40.93 ± 0.15 and 38.72 ± 0.18 , respectively. Marshmallows exhibited an LOD of 0.01% with a Ct value of 41.14 ± 2.96 . Finally, this method was applied to commercial confectionery products containing porcine gelatin, and the real-time PCR effectively detected porcine gelatin with high sensitivity.

Keywords: confectionery, LOD, porcine gelatin, real-time PCR

ABSTRAK

Gelatin merupakan salah satu ingredien yang banyak digunakan sebagai bahan pembentuk gel dan pengental dalam produk *confectionery* dan sebagai bahan kritis dari segi kehalalannya. *Real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR)* banyak digunakan untuk mendeteksi residu babi di dalam produk. Sejauh ini, belum ada penelitian yang melaporkan sensitivitas atau limit deteksi (LOD) metode *real-time PCR* dengan primer Tanabe dan *Internal Positive Control (IPC)* dalam mendeteksi gelatin babi pada produk *confectionery*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan sensitivitas metode *real-time PCR* dengan primer Tanabe dan IPC terhadap produk *confectionery (gummy candy, marshmallow, dan lozenges)*. Konfirmasi metode tersebut terhadap produk *marshmallow* komersial yang diketahui mengandung gelatin babi juga dilakukan. Penelitian ini diawali dengan penentuan LOD (% b/b) gelatin babi di dalam gelatin sapi. Hasilnya menunjukkan bahwa nilai LOD pada sampel tersebut adalah 0,01% dengan nilai *cycle threshold (Ct)* $39,20 \pm 1,72$. Tahap kedua adalah menentukan LOD (% b/b) gelatin babi di dalam produk *confectionery* seperti lozenges, *gummy candy*, dan *marshmallow*. LOD (% b/b) gelatin babi pada lozenges dan *gummy candy* adalah 0,1% dengan nilai Ct masing-masing sebesar $40,93 \pm 0,15$ dan $38,72 \pm 0,18$, sedangkan LOD untuk sampel *marshmallow* adalah 0,01% dengan nilai Ct $41,14 \pm 2,96$. Tahap terakhir adalah mengaplikasikan metode tersebut terhadap produk *confectionery* komersial yang diketahui mengandung gelatin babi. Hasilnya menunjukkan bahwa semua sampel dapat terdeteksi dengan baik. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode *real-time PCR* dengan primer Tanabe dan IPC mampu mendeteksi gelatin babi pada produk *confectionery* dengan sensitivitas yang tinggi.

Kata kunci: gelatin babi, LOD, produk *confectionery*, *real-time PCR*

*Penulis Korespondensi: E-mail: nancy_dewi@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara dengan mayoritas penduduknya beragama Islam. Konsumsi produk pangan halal di Indonesia dapat mencapai 146,7 miliar USD (Global Islamic Economic Report, 2022). Oleh karena itu, penyediaan produk pangan halal sangat penting untuk melindungi masyarakat muslim di Indonesia. Berdasarkan Undang-undang Nomor 33 Tahun 2014 tentang Sistem Jaminan Halal, produk pangan yang beredar di Indonesia wajib disertifikasi halal sebagai jaminan status kehalalannya.

Salah satu ingredien yang banyak digunakan dan sangat menentukan dari status kehalalan produk pangan adalah gelatin. Gelatin merupakan produk turunan protein dari kolagen hewan melalui proses hidrolisis parsial (Hassan *et al.*, 2018). Indonesia masih harus memenuhi kebutuhan gelatin dari impor, baik untuk kebutuhan pangan maupun non-pangan. Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik (BPS) tahun 2020, jumlah impor gelatin mencapai 4658,966 ton. Gelatin dapat diproduksi dari tulang atau kulit, seperti dari sapi, ikan, kerbau atau babi. Grand View Research (2020) melaporkan bahwa kulit babi merupakan sumber gelatin yang mendominasi di pasar gelatin dunia yang menyumbang 28,9% pada tahun 2019.

Gelatin banyak digunakan dalam produk *confectionery* karena memiliki kemampuan membentuk gel dan mengentalkan yang baik (Sultana *et al.*, 2018). Produk *confectionery* yang diimpor ke Indonesia dapat mencapai 5884,51 ton pada tahun 2020 (BPS, 2020). Produk ini memiliki peluang yang tinggi untuk menggunakan gelatin babi karena harganya yang relatif murah dan ketersediannya yang melimpah dibandingkan dengan gelatin dari sumber lainnya (Sultana *et al.*, 2018). Gelatin babi dapat diproduksi dalam waktu yang lebih singkat (30 hari) dibandingkan gelatin sapi (60-80 hari). Gelatin babi juga memiliki kualitas gelatin yang baik, dan biaya produksi yang relatif rendah (Sultana *et al.*, 2018; Kamandi *et al.*, 2022). Mengingat kemungkinan adanya penggunaan gelatin babi, baik sengaja digunakan maupun akibat tercampur oleh sumber gelatin lainnya, maka autentikasi dan konfirmasi terhadap gelatin maupun produk *confectionery* penting dilakukan untuk mengidentifikasi ada tidaknya cemaran gelatin babi.

Berbagai macam metode telah dilakukan dalam menentukan sensitivitas berupa *Limit of Detection* (LOD) yang berdasarkan berat gelatin babi (% b/b) di dalam sampel. LOD adalah konsentrasi terkecil yang dapat terdeteksi di dalam sampel. Metode spektrometri massa telah digunakan dalam membedakan gelatin babi dengan gelatin sapi yang memiliki nilai LOD kisaran 1-0,1% b/b, tergantung pada jenis metode yang digunakan (Guo *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Stahl-Zeng *et al.*, 2019). Metode SDS-PAGE

diketahui memiliki nilai LOD sebesar 5% b/b dalam mendeteksi gelatin babi di dalam gelatin sapi (Azira *et al.*, 2014). *Rapid test* berupa *Lateral Flow Device* (LFD) dapat mendeteksi gelatin babi di dalam *gummy candy* dengan nilai LOD sebesar 2,5% b/b (Masiri *et al.*, 2016). Suatu sensor berupa *Surface Plasmon Resonance* (SPR) juga dapat mendeteksi cemaran gelatin babi di dalam gelatin jeli dengan nilai LOD sebesar 0,66% b/b (Wardani *et al.*, 2019).

Metode analisis yang telah dijelaskan merupakan metode yang berdasarkan pada biomarker berupa protein. Pada saat gelatin dilibatkan dalam proses pengolahan seperti pemanasan, maka protein biomarker dapat mengalami denaturasi sehingga menurunkan sensitivitas metode (Nikzad *et al.* 2017; Omar *et al.*, 2018; Kamandi *et al.*, 2022). Berbeda dengan DNA yang diketahui memiliki sifat yang relatif stabil terhadap pemanasan, sehingga masih dapat bertahan (Nikzad *et al.*, 2017; Omar *et al.*, 2018; Kamandi *et al.*, 2022). Hal ini diperkuat oleh penelitian dari Karni *et al.* (2013) yang menunjukkan bahwa DNA dapat terdegradasi sempurna apabila melewati suhu 190°C. Oleh karena itu, metode yang berdasarkan DNA seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat digunakan sebagai metode deteksi gelatin babi di dalam produk olahan yang melibatkan pemanasan (Kamandi *et al.*, 2022).

PCR adalah teknik analisis dengan amplifikasi DNA secara *in vitro* yang terdiri dari tahap yang bersiklus dan terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda pada setiap siklusnya (Yustinadewi *et al.*, 2018). Salah satu jenis PCR yang sudah digunakan dalam konfirmasi gelatin adalah *real-time* PCR. Gelatin babi dapat terdeteksi di dalam campuran gelatin sapi dan gelatin babi dengan nilai LOD kisaran 5-0,01% b/b pada metode *real time* PCR (Demirhan *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2020; Yayla dan Doğan, 2021). Selain itu, gelatin babi yang ditambahkan ke dalam bubuk kaldu ramen memiliki nilai LOD kisaran 1-0,05% b/b bergantung pada jenis primer yang digunakan (Kang *et al.*, 2018). Gelatin babi yang ditambahkan ke dalam *marshmallow* dan *gum drop* yang telah menjadi bubuk dapat terdeteksi dengan nilai LOD sebesar 1% b/b (Demirhan *et al.*, 2012).

Standar acuan metode *real-time* PCR adalah SNI ISO 20224-3:2021 yang menggunakan target gen beta aktin (gen ACTB) pada *Sus scrofa* untuk produk daging dan olahannya. Heryani (2020) memvalidasi metode *real-time* PCR untuk autentikasi DNA babi dengan menggunakan primer dari Tanabe yang menargetkan gen *cytochrome-b* dan *exogenous Internal Positive Control* (IPC) dengan parameter *robustness*, spesifisitas, LOD DNA babi, efisiensi amplifikasi, dan linieritas. Nilai-nilai yang diperoleh menunjukkan bahwa metode tersebut baik untuk digunakan sebagai metode deteksi DNA. Namun, sensitivitas dan LOD metode tersebut dalam mende-

teksi gelatin babi (% b/b) pada produk *confectionery* belum ditentukan.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan sensitivitas *real-time* PCR dengan primer Tanabe dan IPC berupa nilai LOD gelatin babi (% b/b) terhadap beberapa produk *confectionery* yaitu *gummy candy*, *marshmallow*, dan lozenges. Konfirmasi metode tersebut terhadap produk *marshmallow* komersial yang diketahui mengandung gelatin babi juga dilakukan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kit ekstraksi DNA Kogene Powerprep Gelatin No. E0102 (Kogene, Korea Selatan), primer *forward* 5'-CTTGCAAATCCTAACA GGCCTG-3' (Thermo Fisher Scientific, Amerika), primer *reverse* 5'-CGTTTGCATGTAGATAGC GAATAAC-3' (Thermo Fisher Scientific, Amerika), TaqMan MGB Probe 5'-(FAM)-ACAGCT TTCTCATCAGTTAC-(NFQ)(MGB)-3' (Thermo Fisher Scientific, Amerika), TaqMan™ *Exogenous Internal Positive Control Reagents* (Thermo Fisher Scientific, Amerika), Taqpath™ *ProAmp™ Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Amerika), etanol 75% pro analisis (Smart-lab, Indonesia), etanol 96% pro analisis (Smart-lab, Indonesia), *nuclease-free water* (Thermo Fisher Scientific, Amerika), gelatin babi komersial (Green Lakes, Inggris), gelatin sapi komersial (GLT, Australia), sukrosa (Gulaku, Indonesia), sirup fruktosa (Rosebrand, Indonesia), perisa stroberi (Toffleco, Indonesia), perisa *mint*s (Toffleco, Indonesia), maizena (Egafood, Indonesia), sirup plus simpleks, metil paraben (Akema, Italia), dan gliserin (Echogreen Oleochemicals, Singapura).

Rancangan penelitian

Penelitian diawali dengan menentukan nilai LOD (% b/b) terhadap gelatin babi di dalam campuran gelatin sapi dan gelatin babi. Komposisi gelatin babi yang digunakan di dalam campuran gelatin sapi dan gelatin babi adalah 0,0025; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,5; 1; dan 5% b/b. Pada tahap kedua dilakukan penentuan nilai LOD (% b/b) terhadap produk *confectionery* yang terdiri dari *gummy candy*, *marshmallow*, dan lozenges. konsentrasi gelatin babi yang digunakan pada *gummy candy* adalah 0,0025; 0,01; 0,1; dan 0,5%, sedangkan *marshmallow* adalah 0,0025; 0,01; dan 0,1%, serta lozenges adalah 0,01; 0,1; dan 0,5%. Tahap terakhir adalah menguji sensitivitas metode terhadap dua produk *marshmallow* komersial yang diketahui mengandung gelatin babi pada label produk. Sampel dari semua tahap dilakukan ekstraksi secara simplo, lalu dilakukan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dengan mikrovolume spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific,

Amerika) secara duplo. Setelah itu dilakukan analisis dengan *real-time* PCR (Kogene, Korea Selatan) dengan pengulangan duplo untuk menentukan LOD (% b/b).

Pembuatan *marshmallow*

Pembuatan *marshmallow* berdasarkan Arizona *et al* (2021). Pada tahap pertama dilakukan pembuatan larutan gelatin dan larutan gula. Gelatin (7,21 g) dan air aquades (24,26 mL) dipanaskan hingga suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$ selama 10-15 menit. Pada saat bersamaan, dilakukan juga pemanasan sukrosa (24,26 g) dan sirup fruktosa (24,26 mL) hingga suhu $\pm 110^{\circ}\text{C}$ selama 10-15 menit. Kedua larutan tersebut kemudian dicampurkan dan diaduk dengan *mixer* selama 5-10 menit hingga campuran merata dan mengembang. Campuran kemudian dituangkan ke wadah yang telah diberi tepung maizena dan didiamkan selama ± 12 jam.

Pembuatan *gummy candy*

Pembuatan *gummy candy* dilakukan berdasarkan Graboski *et al.* (2018). Bubuk gelatin (5 g) dicampurkan ke dalam aquades (20 mL), lalu didiamkan selama 10 menit. Sampel kemudian dipanaskan pada suhu 70°C selama 10-20 menit hingga larut dan tidak terdapat gumpalan. Selanjutnya, sukrosa (24,995 g) dan stroberi *essens* (0,005 g) ditambahkan pada larutan tersebut, dan diaduk dengan *stirrer* hingga larut. Campuran lalu dituangkan pada cetakan jeli dan dikeringkan pada suhu ruang ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) selama 12 jam.

Pembuatan lozenges

Pembuatan lozenges berdasarkan pada Aryani *et al.* (2015). Gelatin (6 g) dan aquades (10 mL) dicampurkan dan didiamkan selama 10 menit. Campuran tersebut lalu dipanaskan pada suhu 70°C selama 10-15 menit hingga larut dan tidak ada gumpalan. Sampel kemudian dilakukan penambahan gliserin (1,5 g) sambil terus dilakukan pengadukan. Campuran tersebut lalu dipanaskan selama 5 menit dan ditambahkan sirup simpleks (26,5 mL) sambil diaduk. Selanjutnya, stroberi *essens* (0,11 g) ditambahkan, lalu dipanaskan kembali selama 5 menit. Campuran kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit dan ditambahkan metil paraben (0,04 g) serta *mint essens* (0,22 mL). Campuran diaduk kembali dan dituangkan pada cetakan jeli dan didiamkan selama ± 12 jam.

Ekstraksi DNA

Metode ekstraksi DNA dilakukan dengan Powerprep gelatin *extraction* kit cat. No. E0102 (Kogene, Korea Selatan). Sebanyak 400 mg gelatin atau 200 mg produk olahan ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung 2 mL lalu ditambahkan premiklis untuk sampel gelatin yang terdiri dari 3,2 μL

dithiothreitol, 16 μL RNase, 16 μL proteinase, dan 320 μL *buffer* lisis. Pada sampel produk *confectionery*, volume premiks yang digunakan adalah sebanyak dua kali lipat dari sampel gelatin. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 90 menit dengan *thermoshaker* (Ditabis, Jerman). Selanjutnya, 320 μL *buffer* pengikat ditambahkan pada campuran, diinkubasi kembali pada 65°C selama 10 menit, lalu ditambahkan 320 μL etanol 96% pro analisis dan divorteks. Sebanyak 600 μL dari larutan sampel tersebut dipindahkan ke tabung DNA *binding-column*. Sampel kemudian disentrifugasi selama 3 menit pada 12000 rpm. Filtrat yang ada di tabung tersebut dibuang, lalu ditambahkan 500 μL *buffer* pencuci tanpa mengenai dinding. Sentrifugasi kemudian dilanjutkan selama 2 menit pada 12000 rpm. Filtrat pada tabung dibuang kembali, dan ditambahkan 500 μL etanol 75%, kemudian disentrifugasi kembali selama 2 menit (12000 rpm). Filtrat yang ada di tabung dibuang dan disentrifugasi kembali selama 4 menit pada 12000 rpm. Isi tabung kemudian ditransfer ke tabung 1,5 mL dan ditambahkan 100 μL *buffer* elusi, dan disentrifugasi selama 4 menit pada 8000 rpm. Sampel tersebut dilakukan pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dengan mikrovolum spektrofotometer dengan melihat perbandingan nilai *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (OD 260/280). Jika nilai OD 260/280 berada di antara 1,8-2,0 maka sampel tersebut memiliki kemurnian tinggi dan tidak ada indikasi kontaminasi. Nilai di bawah 1,8 mengindikasikan kontaminasi protein, sedangkan nilai di atas 2,0 mengindikasikan kontaminasi RNA (Yayla dan Doğan, 2021; Salamah *et al.*, 2021). Sampel DNA tersebut disimpan pada *freezer* bersuhu -20°C hingga waktu analisis.

Amplifikasi *real-time* PCR

Amplifikasi *real-time* PCR berdasarkan pada Heryani (2020). Tahap pertama adalah melakukan pembuatan larutan reaksi campuran untuk satu sampel yang terdiri dari 1 μL primer *forward* (7,5 μM), 1 μL primer *reverse* (7,5 μM), 1 μL probe (5 μM), 12,5

μL taqpath (2X), 2,5 μL IPC *mix* (10x), dan 0,5 μL IPC DNA (50x). Sebanyak 18,5 μL campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung PCR. Sebanyak 6,5 μL sampel DNA dimasukkan ke dalam tabung PCR tersebut sehingga diperoleh total volume 25 μL . Selanjutnya, tabung PCR berisi larutan sampel campuran dimasukkan ke dalam *real-time* PCR. Kondisi reaksi pada *real-time* PCR adalah sebagai berikut: tahap inisiasi dilakukan selama 2 menit pada suhu 50°C dan 10 menit pada suhu 95°C, lalu dilanjutkan dengan 44 siklus pada suhu 95°C selama 15 detik dan suhu 60°C selama 1 menit. Pada penelitian ini, DNA dari daging babi digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan *nuclease-free water* digunakan sebagai kontrol negatif.

Hasil *real-time* PCR dinyatakan dalam nilai *cycle threshold* (Ct), yaitu nilai yang menunjukkan jumlah siklus yang dibutuhkan hingga sinyal fluoresens melewati ambang yang menandakan terdeteksinya DNA target. Nilai Ct pada semua sampel dalam penelitian ini dinyatakan dalam rata-rata \pm standar deviasi. Konsentrasi terkecil yang terdeteksi pada semua pengulangan duplo dinyatakan sebagai LOD (% b/b). Pada penelitian ini didapatkan konsentrasi terkecil/LOD gelatin babi di dalam campuran gelatin babi dan gelatin sapi sebesar 0,01% b/b, sedangkan pada produk *confectionery* didapatkan pada kisaran 0,1-0,01% b/b.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai LOD gelatin babi (% b/b) di dalam gelatin sapi

Hasil penentuan nilai LOD gelatin babi di dalam gelatin sapi dapat dilihat pada Tabel 1. Beberapa sampel (0,0025; 0,01; 0,025; 1; dan 5% b/b) memiliki nilai OD 260/280 di atas 2,0 yang menandakan adanya kontaminasi protein pada sampel-sampel tersebut. Sampel 0,05; 0,1; dan 0,5% b/b memiliki nilai kemurnian tanpa kontaminasi protein karena berada di kisaran 1,8-2,0.

Tabel 1. Hasil uji penentuan nilai LOD gelatin babi (% b/b) di dalam campuran gelatin sapi dan gelatin babi
 Table 1. LOD value of porcine gelatin (% w/w) in bovine gelatin and porcine gelatin mixture

Konsentrasi Gelatin Babi (% b/b) Porcine Gelatin Concentration (% w/w)	Ct	Konsentrasi DNA (ng/ μL) (DNA Concentration (ng/ μL))	Kemurnian DNA (OD 260/280) (DNA Purity (OD 260/280))	IPC
0.0025	ND	6.10 \pm 2.23	2.23 \pm 0.21	+
0.01	39.20 \pm 1.72	6.45 \pm 0.07	2.32 \pm 0.17	+
0.025	38.51 \pm 2.07	4.65 \pm 0.07	2.82 \pm 0.00	+
0.05	37.75 \pm 0.43	2.95 \pm 0.21	1.87 \pm 0.08	+
0.1	36.47 \pm 0.35	4.55 \pm 0.35	1.80 \pm 0.04	+
0.5	35.62 \pm 0.01	2.25 \pm 0.21	1.97 \pm 0.17	+
1	33.95 \pm 0.10	3.55 \pm 0.07	2.26 \pm 0.26	+
5	31.57 \pm 0.12	4.6 \pm 0.14	2.12 \pm 0.05	+
Kontrol positif (<i>Positive control</i>)	16.21 \pm 0.24	10	1.8	+
Kontrol negatif (<i>Negative control</i>)	ND	-	-	+

Keterangan: ND = Not Detected
 Note: ND = Not Detected

Walaupun terdapat sampel yang terindikasi mengalami kontaminasi, kurva amplifikasi pada *real-time* PCR dapat diamati sehingga dapat dikonfirmasi bahwa ekstraksi DNA berjalan dengan lancar. IPC pada tiap sampel terdeteksi yang menandakan tidak ada inhibitor yang mengganggu proses amplifikasi *real-time* PCR. Konsentrasi DNA yang diperoleh memiliki nilai yang bervariasi, namun dapat terdeteksi kurva amplifikasinya. Berdasarkan Tabel 1, pada saat konsentrasi 0,0025% b/b, gelatin babi di dalam campuran gelatin sapi dan gelatin babi tidak terdeteksi oleh metode *real-time* PCR, sedangkan konsentrasi gelatin babi 5-0,01% b/b dapat terdeteksi. Konsentrasi terkecil yang dapat terdeteksi adalah 0,01% b/b dengan nilai Ct sebesar $39,20 \pm 1,72$. Nilai tersebut adalah nilai LOD (% b/b) gelatin babi di dalam gelatin sapi pada metode *real-time* PCR ini.

Beberapa peneliti melaporkan nilai LOD (% b/b) gelatin babi di dalam gelatin sapi yang menunjukkan bahwa primer atau metode *real-time* PCR yang berbeda dapat memberikan nilai LOD (%b/b) yang berbeda. Penelitian dari Nikzad *et al.* (2017) menggunakan metode *duplex* dan *simplex real-time* PCR dengan primer target gen *cytochrome-b* (149 dan 212 bp *amplicon*), yaitu metode *simplex* atau *duplex real-time* PCR dengan kedua primer tersebut dapat mendeteksi gelatin babi sebesar 0,1% b/b. Menurut Demirhan *et al.* (2012), *real-time* PCR dengan menggunakan komersial kit dapat mendeteksi gelatin babi di dalam campuran gelatin sapi dan gelatin babi sebesar 1% b/b. Penelitian dari Yayla dan Doğan (2021) menunjukkan bahwa *real-time* PCR menggunakan primer 95 bp *amplicon* dengan target gen MPRE42 memiliki nilai LOD (% b/b) gelatin babi sebesar 0,01% (metode Tube Gel), 0,1% (metode Biotecon), dan di atas 5% (metode R-Biopharm),

yang dipengaruhi oleh metode ekstraksi yang digunakan.

Penelitian ini menggunakan primer Tanabe yang menargetkan gen *cytochrome-b*. Brezna dan Píknova (2013) telah mengidentifikasi beberapa jenis primer dari berbagai macam penelitian melalui *review*. Berdasarkan *review* tersebut primer Tanabe memiliki sensitivitas yang paling tinggi yang dapat mendeteksi DNA babi pada konsentrasi 0,01-0,1 pg/ μ L. *Cytochrome-b* sebagai salah satu gen DNA dari mitokondria yang paling umum digunakan dalam analisis PCR. Gen tersebut sering digunakan dalam penelitian terkait filogenik dan memiliki variabilitas interspesies yang tinggi (Mohamad *et al.* 2013). Gen ini memiliki urutan nukleotida yang terkonservasi tinggi yang diketahui spesifik terhadap spesies (Posik *et al.* 2016). Dalam penelitian ini, metode *real-time* PCR memberikan nilai LOD (% b/b) yang lebih kecil dibandingkan dengan penelitian yang telah disebutkan di atas. Hal ini menandakan bahwa metode dalam penelitian ini memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode *real-time* PCR lain dalam mendeteksi gelatin babi di dalam campuran gelatin sapi dan gelatin babi.

Nilai LOD gelatin babi (% b/b) di dalam produk confectionery

Tabel 2 menunjukkan hasil uji nilai LOD (% b/b) gelatin babi di dalam *gummy candy*, *marshmallow*, dan lozenges dengan konsentrasi gelatin babi yang berbeda. Pada nilai kemurnian DNA terlihat bahwa sebagian besar sampel melebihi nilai 2 yang menandakan adanya kontaminasi protein. Selain itu, nilai konsentrasi DNA yang diperoleh bervariasi tiap konsentrasi dari tiap sampel.

Tabel 2. Hasil uji penentuan nilai LOD gelatin babi (% b/b) di dalam produk *confectionery*
 Table 2. LOD value of porcine gelatin in confectionery products

Konsentrasi Gelatin Babi pada Produk Confectionery (% b/b) (Porcine Concentration in Confectionery Products (% w/w))	Ct	Konsentrasi DNA (ng/ μ L) (DNA Concentration (ng/ μ L))	Kemurnian DNA (OD 260/280) (DNA Purity (OD 260/280))	IPC
Gummy Candy				
0.0025	ND	2.45±0.07	2.08±0.09	+
0.01	ND	6.65±0.07	2.76±0.16	+
0.1	38.72±0.18	3.10±0.14	2.27±0.18	+
0.5	36.84±1.05	5.85±0.35	2.21±0.01	+
Marshmallow				
0.0025	ND	3.90±0.28	2.30±0.41	+
0.01	41.14±2.96	3.25±0.35	2.54±0.45	+
0.1	39.19±0.19	2.40±0.14	1.60±0.08	+
Lozenges				
0.01	ND	4.05±0.21	2.14±0.28	+
0.1	40.93±0.15	3.85±0.21	2.20±0.08	+
0.5	37.13±0.12	3.95±0.07	2.12±0.05	+
Kontrol positif (Positive control)	18.06±0.18	10	1.8	+
Kontrol negatif (Negative control)	ND	-	-	+

Keterangan: ND = Not Detected
 Note: ND = Not Detected

Walaupun konsentrasi bervariasi dan nilai kemurnian melebihi nilai 2, namun kurva amplifikasi dapat terlihat sehingga dapat disimpulkan bahwa proses amplifikasi maupun ekstraksi DNA berjalan lancar. Hal ini juga diperkuat dengan nilai IPC yang diperoleh semua sampel terdeteksi sehingga tidak ada inhibitor yang mengganggu proses amplifikasi. Pada produk *gummy candy* dan lozenges diketahui bahwa nilai Ct pada konsentrasi di bawah 0,1% b/b sudah tidak terdeteksi. LOD kedua produk adalah 0,1% dengan nilai Ct masing-masing $38,72 \pm 0,18$ dan $40,93 \pm 0,15$. Pada produk *marshmallow*, nilai LOD (% b/b) lebih rendah dibandingkan dengan produk lain, yaitu 0,01% b/b dengan nilai Ct $41,14 \pm 2,96$. Perbedaan nilai LOD (% b/b) ini dapat disebabkan oleh perbedaan waktu pada pemanasan. Lozenges dan *gummy candy* memiliki waktu pemanasan yang relatif sama yaitu sekitar 30 menit, sedangkan waktu pemanasan *marshmallow* lebih pendek yaitu sekitar 15 menit.

Pemanasan dapat menyebabkan DNA mengalami fragmentasi yang dapat memengaruhi hasil analisis *real-time* PCR (Mano *et al.*, 2017). Bitskinashvili *et al.* (2019) menyatakan bahwa salah satu faktor kritis yang mempengaruhi analisis *real-time* PCR dalam identifikasi ingredien pangan adalah waktu kontak pemanasan. Pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa DNA mengalami degradasi pada saat sampel dipanaskan pada suhu 121°C , yang intensitasnya tergantung pada waktu pemanasan. Hal ini mengindikasikan semakin lama durasi pemanasan, maka sensitivitas/LOD metode *real-time* PCR semakin menurun.

Penelitian kuantitatif yang berkaitan dengan penentuan LOD gelatin babi di dalam produk *confectionery* masih terbatas. Selain itu, LOD gelatin babi di dalam produk *confectionery* pada metode *real-time* PCR dengan primer Tanabe dan IPC masih belum diketahui. Berdasarkan penelitian dari Demirhan (2012), *marshmallow* dan *gum drop* yang ditambahkan gelatin babi dapat terdeteksi dengan *real-time* PCR yang menggunakan kit komersial sebesar 1% (b/b). Penelitian lain yang menggunakan LFD dapat mendeteksi gelatin babi di dalam *gummy candy* dengan nilai LOD sebesar 2,5% b/b (Masiri *et al.*, 2016). Pada penelitian ini LOD (% b/b) pada produk *confectionery* adalah 0,1-0,01% b/b yang menunjukkan metode ini memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan kit komersial *real-time* PCR dan *rapid test*.

Sensitivitas yang tinggi pada metode *real-time* PCR dalam penelitian ini dapat digunakan dalam mendeteksi indikasi pelabelan palsu pada produk *confectionery*. Pelabelan palsu pada produk pangan menjadi isu yang umum terjadi di seluruh dunia (Supiah, 2018). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa terdapat produk *confectionery* komersial dengan indikasi pelabelan palsu yang terdeteksi substansi babi dengan analisis *real-time* PCR (Sultana *et al.*, 2020; Sultana *et al.*, 2018; Demirhan *et al.*, 2012). Metode pada penelitian ini juga dapat digunakan dalam mendeteksi kontaminasi silang pada produk *confectionery*. Kontaminasi silang dapat terjadi pada peralatan produksi yang digunakan maupun pada jalur produksi. Adanya substansi babi di bawah 0,1% pada produk dapat dipertimbangkan sebagai kontaminasi silang pada jalur produksi dari pada adulterasi. Konsentrasi rendah tersebut tidak menguntungkan secara finansial bagi industri (Al-Kahtani *et al.*, 2017). Oleh karena itu, metode *real-time* PCR pada penelitian ini dapat dijadikan metode alternatif untuk mendeteksi pelabelan palsu dan kontaminasi silang pada produk *confectionery* bagi laboratorium halal.

Konfirmasi pada produk *marshmallow* komersial yang mengandung gelatin babi

Tabel 3 menunjukkan hasil uji coba metode *real-time* PCR terhadap produk *marshmallow* komersial yang telah diketahui mengandung gelatin babi pada label produk. Nilai konsentrasi DNA pada semua sampel bervariasi dengan kisaran 7-7,05 ng/ μL . Berdasarkan pembacaan dari mikrovolum spektrofotometer, kemurnian DNA pada sampel *marshmallow* 2 terindikasi adanya kontaminan berupa protein karena nilai kemurniannya melebihi 2. Walaupun nilai konsentrasi DNA bervariasi dan beberapa sampel terindikasi terkontaminasi, namun kurva *real-time* PCR dapat teramplifikasi dengan baik. Selain itu, nilai IPC semua sampel terdeteksi positif yang menandakan tidak ada kontaminan. Oleh karena itu, proses amplifikasi *real-time* PCR pada metode ini berjalan dengan baik dan lancar tanpa adanya gangguan kontaminasi. Berdasarkan hasil pembacaan *real-time* PCR, semua sampel dapat terdeteksi dengan kisaran nilai Ct $34,49 \pm 0,198$ hingga $35,64 \pm 0,02$. Metode *real-time* PCR dengan primer Tanabe dan IPC dapat mendeteksi gelatin babi pada produk *confectionery* komersial dengan tepat.

Tabel 3. Hasil uji *real-time* PCR terhadap produk *marshmallow* komersial yang mengandung gelatin babi
 Table 3. *Real-time* PCR analysis of commercial *marshmallow* products which are contained porcine gelatin

Produk (Product)	Konsentrasi DNA (ng/ μL) (DNA Concentration (ng/ μL))	Kemurnian (OD 260/280) (DNA Purity (OD 260/280))	Ct	IPC
<i>Marshmallow</i> 1	7.05 ± 5.16	1.73 ± 0.75	34.49 ± 1.98	+
<i>Marshmallow</i> 2	7.00 ± 2.26	2.05 ± 0.03	35.64 ± 0.02	+

KESIMPULAN

Metode *real-time* PCR dengan primer Tanabe dan IPC memiliki sensitivitas yang tinggi dalam mendeteksi gelatin babi di dalam produk *confectionery*. Nilai LOD gelatin babi di dalam campuran gelatin sapi dan gelatin babi pada metode penelitian ini adalah 0,01% b/b, sedangkan nilai LOD gelatin babi di dalam produk *confectionery* berada pada kisaran 0,1-0,01% b/b. Metode *real-time* PCR yang digunakan dapat mendeteksi gelatin babi di dalam produk *confectionery* komersial seperti *marshmallow*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Pengkajian Pangan, Obat-obatan dan Kosmetik Majelis Ulama Indonesia (LPPOM MUI) yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Kahtani HA, Ismail EA, Ahmed MA. 2017. Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and *real-time* PCR techniques. *Food Chem* 219: 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.108>
- Aryani D, Saifullah S, Bayu Murti Y. 2015. Pembuatan chewable lozenges ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia* L.) dengan variasi proporsi basis gliserin-gelatin. *Trad Med J* 20: 98-104.
- Arizona K, Laswati DT, Rukmi KSA. 2021. Studi pembuatan *marshmallow* dengan variasi konsentrasi gelatin dan sukrosa. *Agrotech* 3: 11-17. <https://doi.org/10.37631/agrotech.v3i2.279>
- Azira TN, Man YBC, Hafidz RNRM, Aina MA, Amin I. 2014. Use of principal component analysis for differentiation of gelatine sources based on polypeptide molecular weights. *Food Chem* 151: 286-292. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.066>
- Bitskinashvili K, Gabriadze I, Kutateladze T, Vishnepolsky B, Mikeladze D, Datukishvili N. 2019. Influence of heat processing on DNA degradation and PCR-based detection of wild-type and transgenic maize. *J Food Qual* 2019: 5657640. <https://doi.org/10.1155/2019/5657640>
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2020. Statistik Perdagangan Luar Negeri Impor 2020 Jilid I. Badan Pusat Statistik, Jakarta.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2021. Analisa biomarker molekuler – Deteksi bahan turunan hewan pada pangan dan bahan pakan menggunakan *real-time* PCR – Bagian 3: Metode deteksi DNA babi. Badan Standardisasi Nasional, Jakarta.
- Brezna B, Piknova L. 2013. *Real-time* PCR methods for identification of animal or plant species. Caister Academic Press, Burgos. 253-271. <https://doi.org/10.21775/9781910190159>
- Demirhan Y, Ulca P, Senyuva HZ. 2012. Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products—Halal/Kosher authentication. *Meat Sci* 90: 686-689. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.014>
- Global Islamic Economic Report. 2022. State of the global islamic economy report unlocking opportunity. New York: Dinarstandard. <https://www.dinarstandard.com/post/state-of-the-global-islamic-economy-report-2022> [20 April 2022].
- Guo S, Xu X, Zhou X, Huang Y. 2018. A rapid and simple UPLC-MS/MS method using collagen marker peptides for identification of porcine gelatin. *RSC Adv* 8: 3768-3773. <https://doi.org/10.1039/C7RA12539A>
- Graboski AM, Galvagni E, Manzoli A, Shimizu FM, Zakrzewski CA, Weschenfelder TA, Steffens J, Steffens C. 2018. Lab-made electronic-nose with polyaniline sensor array used in classification of different aromas in gummy candies. *Food Res Int* 113: 309-315. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.011>
- Grand View Research. 2020. Gelatin market size, share & trends analysis report by raw material (pig skin, bovine hide, cattle bones), by function (thickener, stabilizer, gelling agent), by application, by region, and segment forecasts, 2020-2027. California: Grand View Research. <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-gelatin-market> [20 April 2021].
- Hassan N, Ahmad T, Zain NM. 2018. Chemical and chemometric methods for halal authentication of gelatin: An overview. *J Food Sci* 83: 2903-2911. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14370>
- Heryani. 2020. Validasi metode analisis DNA babi pada produk pangan dengan primer terseleksi dan *exogenous internal positive control* pada *real-time* PCR [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Kamandi N, Dana MG, Ghavami M. 2022. Molecular identification of gelatin origin in pastilles and jelly products collected from tehran markets. *J Food Biosci Technol* 12: 11-18.
- Kang SSN, Lee HG, Kim H. 2018. Development and comparison of a porcine gelatin detection system targeting mitochondrial markers for Halal authentication. *LWT-Food Sci Technol* 97: 697-702. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.062>

- Karni M, Zidon D, Polak P, Zelevsky Z, Shefi O. 2013. Thermal degradation of DNA. *DNA Cell Biol* 32: 298-301. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2056>
- Mano J, Nishitsuji Y, Kikuchi Y, Fukudome S, Hayashida T, Kawakami H, Kurimoto Y, Noguchi A, Kondo K, Teshima R, Takabatake R, Kitta K. 2017. Quantification of DNA fragmentation in processed foods using *real-time* PCR. *Food Chem* 226: 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.064>
- Masiri J, Benoit L, Barrios-Lopez B, Thienes C, Meshgi M, Agapov A, Dobritsa A, Nadala C, Samadpour M. 2016. Development and validation of a rapid test system for detection of pork meat and collagen residues. *Meat Sci* 121: 397-402. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.07.006>
- Mohamad NA, Sheikha AFE, Mustafa S, Mokhtar NFK. 2013. Comparison of gene nature used in *real-time* PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Res Int* 50: 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.047>
- Nikzad J, Shahhosseini S, Tabar zad M, Nafissi-Varcheh N, Torshabi M. 2017. Simultaneous detection of bovine and porcine DNA in pharmaceutical gelatin capsules by duplex PCR assay for Halal authentication. *DARU J Pharm Sci* 25: 3. <https://doi.org/10.1186/s40199-017-0171-3>
- Omar S, Hasan M, Abu-Romman S, Ramadan H, Qatatsheh AA, Al-Dmoor H. 2018. Design and validation of short-amplicon length PCR assay for the detection of porcine gelatin in commercial candy and marshmallow products. *Curr Res Nutr Food Sci J* 6: 742-747. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.6.3.16>
- Posik DM, Bustamante AV, Lyall V, Peral GP, Padola NL, Giovambattista G. 2016. Species identification of a suspected bone found in blood sausage. *Forensic Sci Criminol* 1: 1-2. <https://doi.org/10.15761/FSC.1000103>
- Salamah N, Erwanto Y, Martono S, Rohman A. 2021. The employment of *real-time* polymerase chain reaction using species-specific primer targeting on D-loop mitochondria for identification of porcine gelatin in soft candy. *Indones J Chem* 21: 852-859. <https://doi.org/10.22146/ijc.60413>
- Stahl-Zeng J, Sage A, Taylor P, Netto JD, Zhang T. 2019. Advances in LC-MS/MS methods for allergen testing, meat speciation, and gelatin speciation. *J AOAC Int* 102: 1309-1315. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0059>
- Sultana S, Hossain MAM, Azlan A, Johan MR, Chowdhury ZZ, Ali ME. 2020. TaqMan probe based multiplex quantitative PCR assay for determination of bovine, porcine and fish DNA in gelatin admixture, food products and dietary supplements. *Food Chem* 325: 126756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126756>
- Sultana S, Hossain MAM, Zaidul ISM, Ali ME. 2018. Multiplex PCR to discriminate bovine, porcine, and fish DNA in gelatin and confectionery products. *LWT-Food Sci Technol* 92: 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.019>
- Supiah K. 2018. Preparation and processing of religious and cultural foods. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Cambridge. 310-321. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101892-7.00016-X>
- Wardani DP, Arifin M, Abraha K. 2019. The revised method of quantitative detection of animal-origin bovine and porcine gelatin difference using surface plasmon resonance-based biosensor. *Mater Sci Forum* 948: 146-152. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.948.146>
- Yang CT, Ghosh D, Beaudry F. 2018. Detection of gelatin adulteration using bioinformatics, proteomics and high-resolution mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 35: 599-608. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1416680>
- Yayla MEA, Doğan CE. 2021. Development of a new and sensitive method for the detection of pork adulteration in gelatin and other highly processed food products. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 38: 881-891. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1902574>
- Yustinadewi PD, Yustiantara PS, Narayani I. 2018. Teknik perancangan primer untuk sekuen gen MDR-1 varian 1199 pada sampel *buffy coat* pasien anak dengan LLA. *Metamorfosa: J Biol Sci* 5: 105-111. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16>