



Uji Deteksi Adulterasi Daging Babi (*Sus scrofa domestica*) pada Bakso Metode Loop-Mediated Isothermal Amplification

Rahma Micho Widyanto^{1*}, Cleonara Yanuar Dini², Irma Sarita Rahmawati¹, Sekar Ramadhanti Putri¹, Amelia Nurdini Rozana¹, Sakinah Hilya Abida³, Yunimar⁴

^{1*} Jurusan Gizi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

² Program Studi S1 Gizi, Jurusan Pendidikan Kesejahteraan Keluarga, Fakultas Teknik, Universitas Negeri Surabaya

³ Program Studi Bioteknologi, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya

⁴ Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika

* Alamat korespondensi: micho@ub.ac.id

Diterima: November 2020

Direview: Juni 2021

Dimuat: Juli 2021

Abstrak

Adulterasi daging dalam suatu produk masih menjadi permasalahan serius. Untuk itu diperlukan suatu metode uji berbasis DNA yang cepat, spesifik, dan sederhana. Pada penelitian ini, diaplikasikan teknik uji cepat dengan metode LAMP (loop-mediated isothermal amplification) untuk identifikasi keberadaan DNA babi pada bakso. Enam primer digunakan untuk identifikasi DNA mitokondrial cytochrome oxidase subunit II. Sampel disiapkan berupa bakso campuran daging sapi yang mengandung daging babi dengan konsentrasi 50; 5; 0,5; 0,05%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi optimal untuk primer adalah 4 pmol inner primers, 2 pmol loop primers, dan 1 pmol outer primers. Hasil reaksi LAMP menunjukkan kemampuan deteksi campuran daging babi pada bakso yang ditunjukkan dengan perubahan warna pada sampel bakso hingga konsentrasi terendah 0,05%. Teknik LAMP menyediakan uji yang lebih cepat dengan hasil akhir visualisasi warna yang dapat dilihat dengan mata telanjang tanpa bantuan alat lain sehingga potensial untuk dikembangkan sebagai kit deteksi cepat untuk identifikasi produk olahan makanan halal.

Kata kunci: adulterasi, loop-mediated isothermal amplification, babi, DNA mitokondrial, halal

Abstract

Meat adulteration in a product is still a serious problem. Therefore, a DNA-based test method that is fast, specific, and simple is needed. In this study, a rapid test technique using the loop-mediated isothermal amplification method was applied to identify the presence of pork DNA in meatballs. Six primers were used for identifying mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit II. Samples were prepared in the form of mixed beef meatballs containing pork with a concentration of 50, 5, 0.5,

0.05%. The results showed that the optimal primer concentration was 4 pmol inner primers, 2 pmol loop primers, and 1 pmol outer primers. LAMP reaction showed the ability to detect the pork contained in the meatball samples as indicated by the color change in the samples up to the lowest concentration (0.05%). The LAMP technique provides a faster test with a final result of color visualization that can be seen using naked eyes without needing other tools, so it has the potential to be developed as a rapid detection kit for identifying halal processed products.

Keywords: adulteration, halal, loop-mediated isothermal amplification, mitochondrial DNA, pork

PENDAHULUAN

Daging serta produk olahan daging merupakan sumber utama protein untuk memenuhi kebutuhan sehari-hari. Produk olahan berbahan dasar daging yang berada di pasaran saat ini sangat beragam, seperti bakso, sosis, nugget, daging cincang, dan sebagainya. Meskipun regulasi di Indonesia (dan juga beberapa negara lain, seperti Malaysia dan Kanada) sudah cukup jelas terkait dengan keharusan mencantumkan komposisi produk untuk mendapatkan label halal, namun adulterasi komposisi dalam suatu produk masih menjadi permasalahan serius. Adulterasi produk pangan adalah tindakan yang menurunkan kualitas makanan yang dijual baik dengan pencampuran atau substitusi bahan lain yang lebih murah untuk menurunkan biaya produksi atau meningkatkan harga jual suatu produk makanan [1]. Beberapa penelitian menemukan adanya adulterasi komponen pada produk olahan daging [2,3] bahkan terdeteksi daging haram pada produk olahan daging [4].

Regulasi di Indonesia terkait dengan produk halal telah tercantum dalam Undang-Undang No. 33 Tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal, yang salah satu isinya adalah keharusan untuk mencantumkan label halal pada produk dan tata cara memperoleh sertifikasi halal. Meskipun demikian, tidak menutup kemungkinan terjadi adulterasi komposisi produk. Pada penelitian di Turki, ditemukan sampel bakso yang berlabel

100% daging sapi terdeteksi mengandung daging ayam [2]. Di Afrika Selatan, sebanyak 68% sampel dari produk olahan mengandung daging dari spesies yang tidak dicantumkan dalam label produk tersebut [3]. Bahkan pada penelitian lain di Iran dari sampel produk olahan daging yang diteliti, terdapat 8,82% (sosis) dan 7,27% (*hamburger*) terdeteksi mengandung bahan haram yaitu daging babi [4].

Beberapa metode analisis berbasis DNA telah dikembangkan untuk mendeteksi keberadaan materi lain pada campuran bahan makanan. Diantara metode tersebut adalah *polymerase chain reaction* (PCR) [5], *PCR-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) [6], *SYBR green real-time PCR* [7], dan *TaqMan probe real-time PCR* [8]. Jenis analisis di atas telah banyak digunakan untuk metode deteksi produk olahan daging. Namun demikian, pengoperasian metode tersebut sangat tergantung pada peralatan di laboratorium.

LAMP merupakan pengembangan dari metode amplifikasi DNA yang lebih sederhana dan spesifik [9]. Metode ini menggunakan enzim DNA polimerase *Bacillus thermophilus* (Bst) dengan empat sampai dengan enam buah primer yang menempel pada daerah tertentu pada sekuens target, sehingga menghasilkan produk dengan spesifisitas yang sangat tinggi [10].

DNA mitokondrial (mtDNA) luas digunakan untuk identifikasi spesies

karena relatif tidak mengalami kerusakan saat pemrosesan dan DNA dapat diekstraksi langsung pada sampel daging olahan [11]. Salah satu gen pada mtDNA yang luas digunakan dalam identifikasi spesies adalah *cytochrome oxidase subunits II* (COII) [12-14].

Prosedur LAMP dapat direaksikan menggunakan temperatur tunggal dan konstan pada kondisi isothermal (63-65°C). Metode LAMP juga dapat melakukan amplifikasi sampel DNA dengan jumlah sedikit hingga banyak dengan waktu kurang dari satu jam. Selain DNA, sampel yang menjadi target juga bisa untuk RNA dengan menggunakan reaksi RT-LAMP. Hasil amplifikasi LAMP dapat divisualisasikan dengan menambahkan pewarna (*dye*) yang akan memberikan perubahan warna untuk identifikasi. Karakter perubahan warna pada teknik LAMP ini yang menjadikan metode ini dapat digunakan sebagai alat deteksi “*on-the-spot*” [10].

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode deteksi cepat berbasis DNA menggunakan teknik LAMP dengan target gen COII pada mtDNA untuk membedakan antara spesies babi dengan sapi. Reaksi LAMP juga akan diujikan ke sampel daging olahan berupa bakso yang mengandung kedua jenis daging tersebut. Hasil akhir reaksi LAMP akan divisualisasikan dengan adanya pendaran warna dari pewarna yang akan berpendar jika disinari ultraviolet, sehingga memudahkan proses identifikasi hasil. Hasil penelitian ini diharapkan dapat diaplikasikan untuk proses identifikasi produk olahan cemaran daging babi untuk mengetahui tingkat kehalalan suatu produk.

METODE PENELITIAN

Preparasi Sampel

Sampel berupa daging babi (*Sus scrofa domestica*) dan sapi (*Bos taurus*)

diperoleh dari Swalayan Lai Lai, Malang. Guna meniru adulterasi makanan, dipilih jenis makanan bakso dengan rasio perbandingan daging babi:daging sapi 50:50; 5:95; 0,5:99,5; 0,05:99,95 yang merupakan modifikasi dari formula bakso sapi pada penelitian sebelumnya [15]. Adonan bakso kemudian dimasukkan ke dalam *chiller* selama 5 menit selanjutnya direbus pada air mendidih hingga matang selama 5 menit. Sampel bakso disimpan pada suhu -20°C dan siap untuk dilakukan uji selanjutnya.

Isolasi DNA Sampel

Sebanyak 25 mg sampel diisolasi menggunakan kit isolasi DNA EzWay (Komabiotech). Proses isolasi dengan menambahkan RNase A sebanyak 40 mg/ml (Thermofisher). Hasil isolasi DNA kemudian disimpan pada -20°C sebelum dilakukan pengukuran konsentrasi.

Pengukuran Konsentrasi DNA

Pengukuran konsentrasi DNA menggunakan mesin Nanodrop Infinite® M Nano (Tecan). Sebanyak 1 µL sampel diambil dan diletakkan pada *drop plate*. Rasio panjang gelombang adalah 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi DNA diperoleh dalam ng/µl dan tingkat kemurnian DNA dengan perbandingan rasio A280 dan A260.

Disain Primer LAMP

Disain primer LAMP menggunakan 6 buah primer [Macrogen] berdasarkan DNA mitokondrial COII (*Cytochrome Oxidase Subunit II*) [13] (Tabel 1).

Reaksi LAMP

Reaction mixture LAMP merupakan modifikasi dari metode Ran *et al.* (2016), terdiri dari 1x *Isothermal Amplification Buffer* [New England Biolabs], 6 mM MgSO₄ [New England Biolabs], 1,6 mM dNTP [GenScript], dan 0,6 M betain [16]. Untuk primer

dilakukan optimasi pada beberapa rentang konsentrasi.

Campuran diinkubasi di *mini dry bath* (Agdia) pada 95°C selama 5 menit untuk denaturasi. Setelah itu ditambahkan 8 unit Bst 2.0 DNA Polymerase (New England Biolabs) dan diinkubasi pada 65°C selama 60 menit. Reaksi diakhiri dengan tahapan inaktivasi pada suhu 80°C selama 2 menit. Visualisasi dilakukan dengan penambahan 1 uL *Diamond™ Nucleic Acid Dye* (Promega). Jika reaksi positif ditunjukkan dengan

adanya pendaran warna oranye di bawah sinar ultraviolet.

HASIL PENELITIAN

Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Hasil isolasi DNA dilarutkan dalam 100 uL *Elution buffer* dan disimpan pada -20°C. Hasil pengukuran konsentrasi DNA menunjukkan nilai rentang konsentrasi dari 3,74-30,85 ng/μL. Tingkat kemurnian DNA ditunjukkan dengan nilai rasio A_{260}/A_{280} pada rentang 1,51-1,88 (Tabel 2).

Tabel 1. Sekuens Primer

Primer	Sekuen
FIP	5'-AGGGATGGGACGGCTCATGACAATCGAGTTGTTCTACCA-3'
BIP	5'-ACAGATGCTATCCCAGGACGATCTGAGCACTGTCCGTA-3'
F3	5'-AGACTATGAAGACCTCACCTT-3'
B3	5'-AGTGCTGACTAGCTTCTCA-3'
LF	5'-GCAGTACGTCTTCAGAGGATAC-3'
LB	5'-CTCTAATATCCACACGACCTGG-3'

Tabel 2. Hasil Konsentrasi dan Rasio DNA

Sampel	Konsentrasi (ng/μL)	Rasio A_{280}/A_{260}
B	19,96	1,88
S	30,85	1,86
1	7,43	1,51
2	1,46	1,52
3	4,83	1,67
4	3,74	1,51

Keterangan:

B: DNA babi

S: DNA sapi

1: Bakso sapi dengan campuran 50% daging babi

2: Bakso sapi dengan campuran 5% daging babi

3: Bakso sapi dengan campuran 0, 5% daging babi

4: Bakso sapi dengan campuran 0,05% daging babi

Tabel 3. Optimasi Primer pada Reaksi LAMP

LAMP	Hasil		
	K (-)	S	B
LAMP 1	+	+	+
LAMP 2	+	+	+
LAMP 3	-	-	+

Keterangan:

LAMP 1: 1,4 mmol (FIP dan BIP); 1,6 mmol (LF dan LB); 0,2 mmol (F3 dan B3)

LAMP 2: 40 pmol (FIP dan BIP); 20 pmol (LF dan LB); 10 pmol (F3 dan B3)

LAMP 3: 4 pmol (FIP dan BIP); 2 pmol (LF dan LB); 1 pmol (F3 dan B3)

K (-): kontrol negatif, tanpa *template*

S: *template* DNA sapi

B: *template* DNA babi

Tabel 4. Hasil Uji Reaksi LAMP terhadap Sampel Bakso

Sampel	Reaksi (Berpendar)
C	-
1	+
2	+
3	+
4	+

Keterangan:

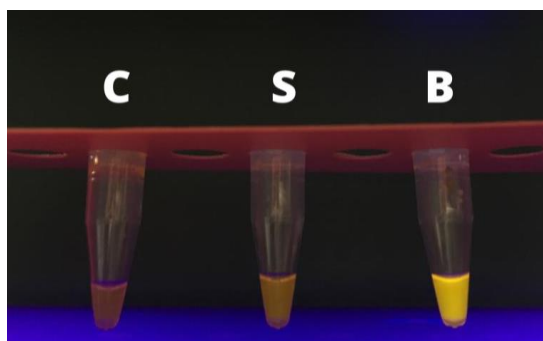
C: Kontrol tanpa *template* DNA

1: Bakso sapi dengan campuran 50% daging babi

2: Bakso sapi dengan campuran 5% daging babi

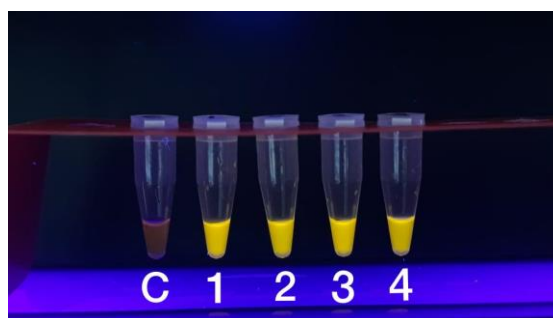
3: Bakso sapi dengan campuran 0,5% daging babi

4: Bakso sapi dengan campuran 0,05% daging babi



Gambar 1. Hasil Optimasi Reaksi LAMP

Keterangan Gambar: C: Kontrol tanpa *template* DNA, S: DNA Sapi, B: DNA Babi



Gambar 2. Hasil Reaksi LAMP dengan Sampel Bakso

Keterangan Gambar: C: Kontrol tanpa *template* DNA, 1: Bakso sapi dengan campuran 50% daging babi, 2: Bakso sapi dengan campuran 5% daging babi, 3: Bakso sapi dengan campuran 0,5% daging babi, 4: Bakso sapi dengan campuran 0,05% daging babi

Optimasi Primer pada Reaksi LAMP

Hasil beberapa rentang konsentrasi primer pada campuran reaksi LAMP bisa dilihat pada Tabel 3. Kondisi optimal primer didapat pada konsentrasi 4 pmol *inner primers* (FIP dan BIP), 2

pmol *loop primers* (LF and LB), 1 pmol *outer primers* (F3 dan B3) (Gambar 1).

Uji Reaksi LAMP pada Sampel Bakso

Hasil reaksi LAMP pada sampel bakso sapi dengan campuran daging babi

dapat dilihat pada Tabel 4. Bakso yang mengandung daging babi dengan rentang konsentrasi 50; 5; 0,5; 0,05%, semuanya menunjukkan hasil positif dengan adanya pendaran warna oranye di bawah sinar ultraviolet (Gambar 2).

PEMBAHASAN

Konsentrasi dan Kemurnian DNA

DNA yang menjadi target pada penelitian ini adalah bersumber pada mtDNA. mtDNA menjadi pilihan untuk identifikasi selain DNA nuklear karena merupakan jenis DNA dengan jumlah salinan yang banyak dan relatif toleran terhadap stres lingkungan seperti panas, garam, dan tekanan [17]. Selain itu juga terkait dengan laju evolusi yang mempertahankan sifat pembeda antarspesies satu dengan yang lain [18]. Hasil konsentrasi pada penelitian ini menunjukkan pada rentang 3,74-30,85 ng/ μ L cukup untuk digunakan sebagai sampel amplifikasi dengan metode LAMP [12].

Tingkat kemurnian DNA diukur menggunakan spektrofotometer nanodrop pada panjang gelombang 260 dan 280 yang akan menghasilkan nilai rasio (A_{260}/A_{280}). Tingkat kemurnian pada penelitian ini menunjukkan hasil rasio A_{260}/A_{280} pada rentang 1,5-1,8 yang berarti cukup bersih dari kontaminasi protein dan sangat bersih dari kontaminasi RNA [19].

Konsentrasi asam nukleat ditentukan dengan mengukur absorbansi sinar ultraviolet. Prinsip tersebut menggunakan *Beer-Lambert Law* dimana jumlah cahaya yang diserap pada 260 nm sebanding dengan konsentrasi asam nukleat dalam larutan. Rasio A_{260}/A_{280} umumnya digunakan untuk menentukan kontaminasi protein dari sampel asam nukleat. Protein aromatik memiliki absorbansi UV yang kuat pada 280 nm. Untuk RNA dan DNA murni, rasio A_{260}/A_{280} masing-masing harus berada di sekitar 2,1 dan 1,8 [19].

Rasio yang lebih rendah menunjukkan sampel terkontaminasi protein. Rasio kemurnian A_{260}/A_{280} yang tinggi tidak selalu memberikan efek yang signifikan. Namun, rasio yang sangat tinggi dapat menunjukkan blanko berkualitas buruk sehingga menghilangkan terlalu banyak sinyal di dekat panjang gelombang 280 nm.

Optimasi Reaksi LAMP

Konsentrasi primer yang digunakan dalam pereaksian LAMP dapat memengaruhi hasil amplifikasi yang terjadi. Hasil penelitian sebelumnya, efek peningkatan konsentrasi *outer* primer F3 dan B3 yang digunakan pada variasi konsentrasi 0,5 μ L, 1,0 μ L, dan 2,0 μ L menunjukkan grafik peningkatan amplifikasi tertinggi, disusul dengan konsentrasi 1,0 μ L, dan konsentrasi 0,5 μ L yang menunjukkan konsentrasi terendah [20]. Namun demikian, semakin tinggi tingkat amplifikasi dan amplikon yang dihasilkan dapat berpotensi menyebabkan kontaminasi silang di mana amplikon yang berupa untai oligonukleotida dapat mengontaminasi silang ke luar *tube* bersamaan dengan dimasukkannya pewarna setelah pereaksian amplifikasi LAMP, yang akan berujung pada kemungkinan terjadinya *false positive*.

Penelitian ini menggunakan 3 rentang konsentrasi primer mulai dari 1,6 mmol-1 pmol. Hasil menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi primer yang digunakan maka akan semakin lemah pendaran yang dihasilkan dari interkalasi pewarna dengan DNA hasil amplifikasi, namun mampu menekan peluang terjadinya *false positive*.

Reaksi LAMP menghasilkan endapan magnesium pirofosfat saat DNA diamplifikasi yang dapat dilihat dengan mata. Namun, apabila konsentrasi DNA terlalu rendah, endapan tersebut sulit untuk diamati [21-23]. Beberapa pewarna telah diteliti sebelumnya untuk

memudahkan deteksi DNA termasuk SYBR Green [9], *hydroxynaphthol blue* [24], dan pewarna sintetik lainnya [25], tetapi pewarna memiliki potensi untuk menghambat reaksi LAMP.

Penelitian ini menggunakan pewarna yang ditambahkan setelah reaksi LAMP berakhir. Pewarna yang digunakan adalah *Diamond™ Nucleic Acid Dye* yang merupakan pewarna *fluorescent* sensitif yang mengikat untai ganda polinukleotida dan dapat digunakan untuk mewarnai dan memvisualisasikan asam nukleat dalam gel. Pewarna ini kompatibel dengan denaturasi dan gel agarosa serta poliakrilamida. Pewarna jenis ini terbukti memiliki sensitivitas yang serupa dengan SYBR Green dengan batas deteksi 0,5 ng saat mendeteksi DNA dalam gel agarosa [26]. Pewarna ini dapat menembus membran sel, menyebabkan interaksi dengan DNA *genomic*.

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa *Diamond™ Nucleic Acid Dye* lebih tidak mutagenik dan genotoksik dibandingkan dengan pewarna asam nukleat yang biasa digunakan yaitu etidium bromida (EtBr). Adapun perbedaan lain antara *Diamond™ Nucleic Acid Dye* dengan jenis pewarna lainnya adalah mekanisme pengikatan pada untai ganda DNA. *Diamond™ Nucleic Acid Dye* mengikat secara eksternal untai ganda DNA pada bagian *grooves* sehingga disebut sebagai *external binder*, sehingga dengan mekanisme tersebut *Diamond™ Nucleic Acid Dye* dapat lebih spesifik hanya mengikat untai ganda dan tidak mengikat untai tunggal yang mana tidak memiliki struktur *grooves* karena tidak terpilih dalam bentuk *double helix*. Pewarna lain memiliki mekanisme pengikatan interkalasi pada basa nitrogen sehingga disebut sebagai pewarna interkalator [26]. Saat ini, belum banyak penelitian yang mengevaluasi penggunaan *Diamond™*

Nucleic Acid Dye baik dalam aplikasi LAMP maupun qPCR.

Salah satu komponen dalam reaksi LAMP ada betain. Penelitian ini menggunakan konsentrasi betain sebesar 0,6 M. Betain merupakan larutan kimia yang kemungkinan mampu meningkatkan spesifisitas dan efisiensi hasil PCR [27,28]. Mekanisme kerja betain pada reaksi LAMP tidak sepenuhnya dapat dimengerti. Terdapat dua kemungkinan mekanisme kerja betain yaitu betain membuat *template* DNA dapat diakses oleh DNA polimerase dan betain mampu mendestabilisasi sekuens DNA yang banyak mengandung sekuens GC [29].

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi betain memengaruhi peningkatan hasil LAMP pada konsentrasi optimal di 0,8 M [29]. Namun pada studi lainnya menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan atau tanpa penambahan 0,8 M betain [30]. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tidak terdapat efek yang menguntungkan dengan penggunaan betain pada amplifikasi LAMP [31]. Hal ini kemungkinan dikarenakan target sekuens DNA spesifik yang akan diamplifikasi tidak termasuk daerah sekuens DNA yang banyak terdapat sekuens GC, sehingga betain tidak dibutuhkan untuk mengamplifikasi target sekuens DNA yang tidak banyak mengandung GC. Betain diasumsikan mampu berperan pada amplifikasi DNA yang banyak mengandung sekuens GC dan mencegah pembentukan struktur sekunder di daerah yang banyak mengandung GC karena reduksi dari susunan basa [30].

Reaksi LAMP yang dikembangkan oleh Notomi *et al.* (2000) dilakukan menggunakan enzim Bst DNA polimerase dengan aktivitas perpindahan untai untuk amplifikasi secara isothermal. Hingga saat ini, sudah banyak dikembangkan berbagai enzim

polimerase dengan aktivitas perpindahan untai dan turunannya dengan sifat yang berbeda dan digunakan secara luas untuk amplifikasi isothermal yang lebih efisien [32].

Penelitian ini menggunakan enzim Bst DNA polimerase yang diisolasi dari bakteri *Bacillus stearothermophilus*. Enzim Bst dapat mempertahankan aktivitas enzimatisnya pada rentang suhu 63-66°C [33,34].

LAMP sebagai salah satu teknik analisis berbasis DNA, memiliki kekurangan maupun kelebihan. Salah satu masalah yang sering muncul adalah seluruh *tube* yang diujikan termasuk kontrol negatif memiliki hasil yang positif (*false positive*). Kontaminasi silang menjadi salah satu faktor yang dapat menyebabkan hasil *false positive* pada LAMP. Beberapa studi menyatakan bahwa salah satu penyebab yang memungkinkan terjadinya kontaminasi silang pada hasil visualisasi LAMP dengan pewarna adalah metode membuka *tube* setelah reaksi LAMP berlangsung [10,35-37]. Metode membuka *tube* umumnya dilakukan untuk menambahkan pewarna, dalam hal ini jenis pewarna yang umumnya dimasukkan setelah reaksi berlangsung seperti pewarna SYBR *green* [36].

Prosedur membuka *tube* dapat meningkatkan risiko kontaminasi silang karena banyaknya jumlah amplifikasi pada hasil LAMP. Mekanisme kontaminasi dapat terjadi melalui ampikon kecil atau potongan DNA/RNA yang menyebar melalui aerosol di lingkungan laboratorium mampu memengaruhi hasil pada LAMP [36,37]. Oleh karena risiko tersebut, mulai banyak dikembangkan metode lain tanpa membuka *tube* seperti metode yang menggunakan *agar capsule dye*, *wax dye capsule* dan *tin foil method* [35]. Akan tetapi, apabila tetap akan menggunakan metode membuka *tube*, maka untuk mengurangi risiko kontaminasi

disarankan untuk membuka dan menutup *tube* di tempat atau ruangan yang berbeda dari ruangan reagen, mengganti tip sesering mungkin, dan melakukan pencampuran LAMP *mixture* di dalam ruangan steril serta tertutup [10].

Uji Reaksi LAMP pada Sampel Bakso

Terdapat beberapa metode identifikasi produk daging, Namun metode berbasis DNA dinilai paling baik untuk mendeteksi adulterasi dari produk daging olahan [38]. Uji berbasis protein tidak mampu untuk membedakan produk makanan olahan dikarenakan proses denaturasi protein oleh panas, kandungan garam, dan tekanan selama pemasakan [39].

Penelitian ini menggunakan variasi campuran daging babi sebesar 50%, 5%, 0,5%, dan 0,05% ke dalam bakso sapi untuk mengetahui sensitivitas metode LAMP dalam mendeteksi campuran daging babi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode LAMP mampu mendeteksi adanya campuran babi hingga 0,05% pada sampel bakso sapi tanpa adanya penurunan kualitas sensitivitas pendaran dari sampel, sedangkan pada penelitian lain menunjukkan bahwa uji LAMP mampu mendeteksi hingga 0,01% adulterasi daging babi atau setara dengan 0,1 gram daging babi pada 1 kg daging [16].

Identifikasi spesies menjadikan DNA kromosomal atau mtDNA digunakan sebagai target. Meski demikian pada deteksi adulterasi produk daging olahan, mtDNA lebih banyak dipilih sebagai target dikarenakan sifatnya yang relatif lebih resisten terhadap kerusakan selama proses pengolahan produk makanan [11]. mtDNA mempunyai jumlah salinan yang banyak (~1.000 salinan per sel) sehingga meskipun sebagian besar salinan DNA terdenaturasi, masih terdapat salinan DNA yang tersisa untuk dijadikan target amplifikasi [17].

Meskipun pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa perlakuan pemanasan dapat menyebabkan DNA genom terdegradasi menjadi fragmen kecil [40], namun pada penelitian ini yang menggunakan sampel olahan berupa bakso didapatkan hasil positif pada uji LAMP. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan panas pada penelitian ini tidak memberikan pengaruh terhadap hasil amplifikasi. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa meskipun sampel telah mengalami pengolahan masih memiliki jumlah DNA yang mencukupi untuk dilakukan pengujian PCR [16,41]. Perlakuan fisik berupa perebusan dalam proses pembuatan bakso dilakukan dengan tujuan membandingkan sampel olahan dengan sampel daging segar. Sampel bakso dipilih untuk mewakili jenis makanan daging olahan yang umum di jajakan di Indonesia dan berpotensi untuk terjadinya adulterasi. Volume sampel bakso yang diambil sama dengan volume daging segar yang akan diisolasi DNANYA dan menunjukkan jumlah konsentrasi DNA yang cukup untuk dideteksi oleh reaksi LAMP.

Metode LAMP tergolong lebih cepat dalam segi waktu sehingga lebih efisien jika dibandingkan dengan PCR. Tahap amplifikasi DNA pada penelitian ini memerlukan waktu selama 60 menit, dengan hasil akhir visualisasi secara langsung. PCR membutuhkan waktu selama 4-5 jam mulai dari tahap amplifikasi hingga analisis hasil [42]. Oleh karena itu LAMP dapat berpotensi menjadi metode deteksi cepat adulterasi daging babi pada produk olahan.

SIMPULAN

Penelitian ini telah berhasil mendapatkan konsentrasi primer yang optimal untuk campuran reaksi LAMP dan terbukti mampu mendeteksi keberadaan DNA murni baik pada sampel daging babi segar maupun sampel

makanan olahan berupa bakso hingga pada konsentrasi campuran daging babi paling kecil. Dibandingkan PCR konvensional, teknik LAMP menyediakan uji yang lebih cepat dengan hasil akhir visualisasi warna yang bisa dilihat tanpa perlu bantuan alat lain, sehingga teknologi LAMP ini potensial untuk bisa dikembangkan sebagai kit deteksi cepat untuk identifikasi produk olahan makanan halal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Universitas Brawijaya untuk pembiayaan penelitian ini melalui skema Hibah Penelitian Pemula (HPP) Tahun Anggaran 2020 yang tertulis pada Kontrak Penelitian Nomor. 436.95/UN10.C10/PN/2020. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan untuk Laboratorium Entomologi dan Terpadu, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Batu Malang.

DAFTAR RUJUKAN

1. Teen Teh AH, Dykes GA. Meet Species Identification. Dalam: Dikeman M, Devine C, editor. Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition). Massachusetts: Academic Press; 2014. Halaman 265-269.
2. Ulca P, Balta H, Çağın I, Senyuva HZ. Meat Species Identification and Halal Authentication Using PCR Analysis of Raw and Cooked Traditional Turkish Foods. Meat Sci. 2013; 94 (3): 280–4.
3. Cawthorn DM, Steinman HA, Hoffman LC. A High Incidence of Species Substitution and Mislabelling Detected in Meat Products Sold in South Africa. Food Control. 2013; 32 (2): 440–9.

4. Doosti A, Ghasemi Dehkordi P, Rahimi E. Molecular Assay to Fraud Identification of Meat Products. *J Food Sci Technol*. 2014; 51 (1): 148–52.
5. Ni'mah A, Kartikasari Y, Pratama AD, Kartikasari LR, Hertanto BS, Cahyadi M. Detection of Pork Contamination in Fresh and Cooked Beef Using Genetic Marker Mitochondrial-DNA Cytochrome B by Duplex-PCR. *Journal of Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 2016; 41 (1): 7-12.
6. Ali ME, Hashim U, Mustafa S, Che Man YB, Yusop MHM, Kashif M, et al. Nanobiosensor for Detection and Quantification of DNA Sequences in Degraded Mixed Meats. *J Nanomater*. 2011; 2011 (32): 1–11.
7. Farrokhi R, Jafari Joozani R. Identification of Pork Genome in Commercial Meat Extracts for Halal Authentication by SYBR green I Real-Time PCR. *Int J Food Sci Technol*. 2011; 46 (5): 951–5.
8. Ali ME, Hashim U, Mustafa S, Che Man YB, Dhahi TS, Kashif M, et al. Analysis of Pork Adulteration in Commercial Meatballs Targeting Porcine-Specific Mitochondrial Cytochrome b Gene by Taqman Probe Real-time Polymerase Chain Reaction. *Meat Sci*. 2012; 91 (4): 454–9.
9. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Principle, Features, and Future Prospects. *J Microbiol*. 2015; 53 (1): 1-5.
10. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products. *Nat Protoc*. 2008; 3 (5): 877–82.
11. Madesis P, Ganopoulos I, Sakaridis I, Argiriou A, Tsaftaris A. Advances of DNA-based Methods for Tracing the Botanical Origin of Food Products. *Food Research International*. 2014; 60: 16.3-72.
12. Dawnay N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR, Thorpe RS. Validation of the Barcoding Gene COI for Use in Forensic Genetic Species Identification. *Forensic Sci Int*. 2007; 173 (1): 1–6.
13. Kesmen Z, Yetiman AE, Şahin F, Yetim H. Detection of Chicken and Turkey Meat in Meat Mixtures by Using Real-Time PCR Assays. *J Food Sci*. 2012; 77 (2): C167-C173.
14. Cho AR, Dong HJ, Cho S. Meat Species Identification Using Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Targeting Species-Specific Mitochondrial DNA. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 2014; 34 (6): 799–807.
15. Firahmi F, Dharmawati S, Aldrin M. Sifat Fisik dan Organoleptik Bakso yang Dibuat dari Daging Sapi dengan Lama Pelayuan Berbeda. *J Al Ulum Sains dan Teknol*. 2015; 1 (1): 39-45.
16. Ran G, Ren L, Han X, Liu X, Li Z, Pang D, et al. Development of A Rapid Method for The Visible Detection of Pork DNA in Halal Products by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Food Anal Methods*. 2016; 9 (3): 565–70.
17. Koh B-R-D, Kim J-Y, Na H-M, Park S-D, Kim Y-H. Development of Species-Specific Multiplex PCR Assays of Mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA for the Identification of Animal Species. *Korean J Vet Serv*. 2011; 34 (4): 417–28.
18. Hidayat T. DNA Mitokondria (mtDNA) sebagai Salah Satu Pemeriksaan Alternatif untuk Identifikasi Bayi Pada Kasus Infantisida. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2017; 6 (1): 213-221.
19. Koetsier G, Cantor E. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid

- Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. Ipswich: New England BioLabs. Inc; 2019. Halaman 1-8.
20. Gadkar VJ, Goldfarb DM, Gantt S, Tilley PAG. Real-Time Detection and Monitoring of Loop-Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and Dequenching Fluorogenic Probes. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 1-10.
 21. Jenkins DM, Kubota R, Dong J, Li Y, Higashiguchi D. Handheld Device for Real-time, Quantitative, LAMP-based Detection of *Salmonella enterica* Using Assimilating Probes. *Biosens Bioelectron.* 2011; 30 (1): 255–60.
 22. Kubota R, Alvarez AM, Su WW, Jenkins DM. FRET-based Assimilating Probe for Sequence-Specific Real-Time Monitoring of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Biol Eng Trans.* 2011; 4 (2): 81–100.
 23. Thiessen LD, Keune JA, Neill TM, Turechek WW, Grove GG, Mahaffee WF. Development of A Grower-conducted Inoculum Detection Assay for Management of Grape Powdery Mildew. *Plant Pathol.* 2016; 65 (2): 238–49.
 24. Chahar M, Anvikar A, Valecha N. Development and Evaluation of a Novel HNB Based Isothermal Amplification Assay for Fast Detection of Pyrimethamine Resistance (S108N) in *Plasmodium falciparum*. *Int J Environ Res Public Health.* 2019; 16 (9): 1-13.
 25. Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glökler JF. Shining A Light on LAMP Assays- A Comparison of LAMP Visualization Methods Including The Novel Use of Berberine. *Biotechniques.* 2015; 58 (4): 189–94.
 26. Haines AM, Tobe SS, Kobus HJ, Linacre A. Properties of Nucleic Acid Staining Dyes Used in Gel Electrophoresis. *Electrophoresis.* 2015; 36 (6): 941–4.
 27. Jensen MA, Fukushima M, Davis RW. DMSO and Betaine Greatly Improve Amplification of GC-Rich Constructs in De Novo Synthesis. *PLoS One.* 2010; 5 (6): e11024.
 28. Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R, Ceccherini I. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, A Powerful Mixture for Amplification of GC-rich DNA sequences. *J Mol Diagnostics.* 2006; 8 (5): 544–50.
 29. Yeh HY, Shoemaker CA, Klesius PH. Evaluation of A Loop-mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of Channel Catfish *Ictalurus punctatus* Important Bacterial Pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *J Microbiol Methods.* 2005; 63 (1): 36–44.
 30. Zhou D, Guo J, Xu L, Gao S, Lin Q, Wu Q, et al. Establishment and Application of A Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) System for Detection of cry1Ac Transgenic Sugarcane. *Sci Rep.* 2014; 4 (1): 1-8.
 31. Chen R, Tong Q, Zhang Y, Lou D, Kong Q, Lv S, et al. Loop-mediated Isothermal Amplification: Rapid Detection of *Angiostrongylus cantonensis* Infection in *Pomacea canaliculata*. *Parasites and Vectors.* 2011; 4 (204): 1-7.
 32. Jevtuševskaja J, Krölov K, Tulp I, Langel Ü. The Effect of Main Urine Inhibitors on The Activity of Different DNA Polymerases in Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017; 17 (4): 403–10.
 33. Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, et al. Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP): A New Diagnostic Tool Lights The

- World of Diagnosis of Animal and Human Pathogens: A Review. *Pakistan J Biol Sci.* 2014; 17 (2): 151–66.
34. Woniakowski G, Kozdruń W, Samorek-Salamonowicz E. Loop-mediated Isothermal Amplification for The Detection of Goose Circovirus. *Virol J.* 2012; 9 (110): 2-11.
35. Karthik K, Rathore R, Thomas P, Arun TR, Viswas KN, Dhama K, et al. New Closed Tube Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Prevention of Product Cross-contamination. *MethodsX.* 2014; 1: 137–43.
36. Tao ZY, Zhou HY, Xia H, Xu S, Zhu HW, Culleton RL, et al. Adaptation of A Visualized Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique for Field Detection of Plasmodium Vivax Infection. *Parasites and Vectors.* 2011; 4 (115): 1-8.
37. Girish PS, Barbuddhe SB, Kumari A, Rawool DB, Karabasanavar NS, Muthukumar M, Vaithiyanathan S. Rapid detection of pork using alkaline lysis- Loop Mediated Isothermal Amplification (AL-LAMP) technique. *Food Control.* 2020; 110: 1-18.
38. Barakat H, El-Garhy HAS, Moustafa MMA. Detection of Pork Adulteration in Processed Meat by Species-specific PCR-QIAxcel Procedure Based on D-loop and cytb Genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98: 9805–16.
39. Dincer B, Spearow JL, Cassens RG, Greaser ML. The Effects of Curing and Cooking on The Detection of Species Origin of Meat Products by Competitive and Indirect ELISA Techniques. *Meat Sci.* 1987; 20: 253–65.
40. Arslan A, Ilhak OI, Calicioglu M. Effect of Method of Cooking on Identification of Heat Processed Beef Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. *Meat Sci.* 2006; 72 (2): 326–30.
41. Şakalar E, Abasiyanik MF, Bektik E, Tayyrov A. Effect of Heat Processing on DNA Quantification of Meat Species. *J Food Sci.* 2012; 77 (9): N40-44.
42. Noor SM. Teknik Molekuler Amplifikasi DNA untuk Deteksi Brucellosis pada Sapi. *Wartazoa.* 2018; 28 (2): 81-8.