

Studi Potensi Primer Gen 12S rRNA untuk Pengembangan Halal Kit Menggunakan Metode Real-Time PCR = Study of 12S rRNA Gene Primer Potential for Halal Kit Development Using Real-Time PCR Method

Tiara Jasmine, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920528277&lokasi=lokal>

Abstrak

Kasus kontaminasi daging haram seperti babi hutan (*Sus scrofa*) dan babi domestik (*Sus scrofa domesticus*) dalam makanan yang beredar di Indonesia menyebabkan perlu dilakukannya verifikasi halal. Pengaplikasian real-time PCR telah mempermudah proses verifikasi halal untuk mendeteksi kandungan DNA babi sebab metode tersebut memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi. Studi analisis sekuensing gen 12S rRNA terdahulu menunjukkan bahwa gen 12S rRNA dapat membedakan spesies hewan yang berkerabat dekat sehingga gen tersebut memiliki potensi sebagai gen target dalam studi deteksi halal. Namun, adanya kekurangan pada desain primer pada studi deteksi halal sebelumnya mendorong perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut terkait potensi primer gen 12S rRNA sebagai dasar pengembangan halal kit. International Organization of Standardization (ISO) telah menetapkan metode standar untuk deteksi babi, yaitu ISO/TS 20224-3:2020(E) menggunakan primer Porcine-97 bp sebagai primer standar yang spesifik terhadap gen ACTB pada *Sus scrofa*. Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer spesifik terhadap gen 12S rRNA *Sus scrofa*, menganalisis sensitivitas dan spesifisitas primer rancangan dalam mendeteksi gDNA babi, serta mengevaluasi potensi primer rancangan untuk dijadikan sebagai primer alternatif dalam deteksi halal. Penelitian ini dilakukan dengan merancang primer menggunakan gen 12S rRNA sebagai gen target. Primer 12S rRNA (SS12S-120bp) divalidasi dengan menganalisis spesifisitas secara *in silico* dan menguji sensitivitas primer menggunakan metode real-time PCR. Analisis perbandingan kualitatif antara primer 12S rRNA dengan primer ACTB ISO juga telah dilakukan. Uji sensitivitas dan linieritas dilakukan dengan melakukan dilusi bertingkat terhadap gDNA babi pada konsentrasi 10.000, 1000, 100, 10, 5, dan 1 pg/uL sebanyak 2 replikat. Hasil validasi spesifisitas *in silico* menunjukkan bahwa primer 12S rRNA (forward: 5'-GGT CCT GGC CTT TCT ATT AAT TCT TAA-3'; reverse: 5'-CCG TTA TAG GTG TGC TTG ATA CC-3'; dan probe: 5'-[FAM]-CCC GGT GAG AAT GCC CTC CAG ATC-[BHQ1]-3') bersifat spesies spesifik terhadap gen 12S rRNA *Sus scrofa*. Analisis qPCR menunjukkan bahwa primer 12S rRNA dapat mendeteksi gDNA babi hingga konsentrasi paling rendah, yaitu 1 pg/uL dengan suhu 56 derajat celsius sebagai suhu optimal annealing primer. Nilai efisiensi dan nilai linieritas yang diperoleh adalah 85% dan 0,995. Berdasarkan analisis perbandingan yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa primer 12S rRNA bersifat lebih sensitif dan spesies spesifik dalam mendeteksi gDNA babi dibandingkan dengan primer ACTB ISO.

.....Cases of haram meat contamination such as wild boar (*Sus scrofa*) and domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) in foods circulating in Indonesia cause the need for halal verification. The application of real-time PCR has facilitated halal verification process to detect the content of pig DNA down to the smallest concentration. The 12S rRNA gene has previously been used in several species identification studies and is known to have potential as a target gene in halal detection studies. However, some deficiencies in the primer design from the previous research prompted the need for further research regarding the potential of the 12S

rRNA gene primers as the basis for halal kit development. ISO/TS 20224-3:2020(E) has established primer Porcine-97 bp as the standard primer used to detect the ACTB gene in *Sus scrofa*. This study aims to design a specific primer for the 12S rRNA *Sus scrofa* gene, analyze the sensitivity and specificity of the designed primer in detecting pig gDNA, and evaluate the potential of the designed primer to serve as an alternative primer for halal detection. This research was done by designing primers using *Sus scrofa* 12S rRNA gene as the target gene. Designed 12S rRNA primers (SS12S-120bp) was validated by analyzing in silico specificity and primer sensitivity test using real-time PCR method. Qualitative comparisons between 12S rRNA and ACTB ISO primers was also analyzed. Sensitivity test was carried out by conducting serial dilution of porcine gDNA at 10,000, 1000, 100, 10, 5, and 1 pg/uL in duplicates. In silico specificity results showed that the designed 12S rRNA primer (forward: 5'-GGT CCT GGC CTT TCT ATT AAT TCT TAA-3'; reverse: 5'-CCG TTA TAG GTG TGC TTG ATA CC-3'; and probe: 5'-[FAM]-CCC GGT GAG AAT GCC CTC CAG ATC- [BHQ1]-3') was species specific to 12S rRNA *Sus scrofa* gene. qPCR analysis showed that 12S rRNA primer could detect pig gDNA down to the lowest concentration of 1 pg/uL at 56 degree celcius as its optimum annealing temperature. The efficiency and linearity value obtained was 85% and 0,995. Based on the conducted qualitative comparison analysis, it can be concluded that primer 12S rRNA is more sensitive and species specific in detecting pig gDNA compared to ACTB ISO primer.