

Use Of Pcr-Rflp In Halal Authentication Of Meat And Processed Products: Literature Review

by agritepa@unived.ac.id 1

Submission date: 27-Jun-2023 01:11AM (UTC-0400)

Submission ID: 1974292791

File name: 3228-Article_Text-14805-1-11-20230513.docx (714.95K)

Word count: 6570

Character count: 40709

PENGGUNAAN PCR-RFLP DALAM AUTENTIKASI HALAL DAGING DAN PRODUK OLAHANNYA: KAJIAN LITERATUR

PCR-RFLP IN HALAL AUTHENTICATION OF MEAT AND DERIVED PRODUCTS: LITERATURE REVIEW

Anna Abdilla, Nadiah Chalisya, Ni⁶ Arum Hidayati

Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Kamper, Babakan, Kec. Dramaga, Kat⁷ipaten Bogor, Jawa Barat 16680 email: annadilla9@gmail.com

ARTICLE HISTORY : Received [13 November 2022] Revised [01 January 2023] Accepted [09 May 2023]

ABSTRAK

Produk pangan yang kian kompleks, terutama pada produk daging dapat memicu terjadinya adulterasi dengan daging haram, baik sengaja maupun tidak sengaja. Daging haram (daging babi) yang ada dalam suatu pangan sifatnya adalah haram dikonsumsi oleh umat muslim. Selain itu, produk daging juga banyak beredar di pasaran dengan pelabelan yang kurang jelas. Sehingga, diperlukan suatu teknik yang dapat mendeteksi keberadaan daging haram tersebut dalam satu matriks pangan. Kajian literatur ini akan membahas terkait penggunaan instrumen *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) dalam autentikasi halal produk daging dari waktu ke waktu, sekaligus membahas kekurangan dan kelebihan teknik PCR-RFLP dalam autentikasi kehalalan produk. Banyak penelitian telah dilakukan untuk menguji efektivitas dari PCR-RFLP dalam membedakan spesies daging hewan dari satu jenis daging hingga beberapa jenis daging.

Kata Kunci : autentikasi halal; daging babi; PCR-RFLP

ABSTRACT

Innovation in food processing complexity, especially in meat products, often lead to food adulteration with haram material whether it is intentionally or not. Consuming foods that contained haram meat (pork) is forbidden for muslim. However, there are many meat products being sold with unclear labeling. Thus, we need a technique that can detect the presence of such haram meat in a food matrix. This literature review will discuss the use of the Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method in halal authentication of meat products from time to time, as well as discuss the advantages and disadvantages of the PCR-RFLP technique in authenticating halal products. Many studies have been conducted to test the effectiveness of PCR-RFLP in differentiating animal meat species from one type of meat to several types of meat.

Keywords : halal authentication; PCR-RFLP; pork

PENDAHULUAN

Saat ini dunia ilmu pengetahuan terus berkembang dan berinovasi, terutama pada bidang pangan. Semakin banyak produk baru yang dihasilkan dari tahun ke tahun. Pada umumnya, konsumen kurang memiliki pengetahuan dan pemahaman terkait dengan asal bahan yang digunakan dalam pangan yang dikonsumsi (Mursyidi 2013). Konsumen muslim terutama, memiliki kewajiban untuk mengonsumsi makanan yang halal dan menghindari konsumsi makanan yang haram, contohnya daging babi dan turunannya. Dimana, daging babi atau celeng rawan digunakan untuk mensubstitusi daging halal karena memiliki warna yang mirip (Swartidiana *et al.* 2022). Konsumen muslim tentu membutuhkan perlindungan terkait daging yang mungkin dilakukan adulterasi dengan daging yang haram. Adulterasi biasanya dilakukan karena harga daging babi atau celeng lebih murah dibandingkan daging lain khususnya daging sapi. Adulterasi sendiri merupakan tindakan ilegal yang dapat menimbulkan kerugian serta isu kesehatan, keagamaan dan ekonomi (Wang *et al.* 2010) (Guan *et al.* 2018a).

Pendeteksian adulterasi pangan pada produk daging membutuhkan metode yang *reliable* dan cepat untuk mendeteksi spesies hewan yang berada

dalam suatu matriks pangan. Pendeteksian adulterasi telah banyak dilakukan menggunakan metode analisis sensori, diferensiasi histologi, serta penentuan kadar glikogen. Namun masih terdapat keterbatasan seperti spesifisitas, kompleksitas, serta biaya yang cukup tinggi (Arslan *et al.* 2006). Pendeteksian juga telah dilakukan berdasarkan protein yang terdapat pada daging seperti menggunakan elektroforesis dan metode imunologi. Namun, metode tersebut memberikan hasil yang kurang baik untuk sampel yang mengalami pemanasan dikarenakan produk pangan olahan mengalami beragam perlakuan sehingga protein akan terdenaturasi ketika melewati suhu pemasakan (Erwanto *et al.* 2014; Hossain *et al.* 2016). Teknik DNA molekuler telah dikembangkan sejak lama untuk menanggulangi masalah yang terjadi pada metode analisis sebelumnya. DNA dinilai lebih stabil dibandingkan protein pada suhu pemasakan, serta dapat diekstrak dari berbagai jenis sampel yang berbeda (Erwanto *et al.* 2014; Liu *et al.* 2019). Pendeteksian DNA dilakukan berdasarkan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang dinilai sangat presisi. Penggunaan enzim endonuklease pada *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) diharapkan dapat membuat profil genetik dari setiap

daging menjadi unik berdasarkan pada ukuran dan banyaknya fragmen DNA yang diproduksi setelah dilakukan pemecahan oleh DNA mitokondria seperti enzim sitokrom b amplicon (Shahimi *et al.* 2018).

PCR-RFLP telah banyak dilaporkan digunakan dalam autentikasi halal pada berbagai produk, seperti daging, gelatin, darah, lemak hewan, produk olahan daging (bakso, surimi, daging burger) (Rahman *et al.* 2015; Sahilah *et al.* 2016; Sultana *et al.* 2018). Setiap metode dalam PCR-RFLP menggunakan gen mitokondria yang berbeda bergantung pada bahan yang akan dianalisis. Gen mitokondria yang telah digunakan antara lain sitokrom b, 16S rRNA, 12S rRNA, dan ND5 (Uddin *et al.* 2021). PCR-RFLP juga diketahui dapat mendeteksi spesies yang memiliki kekerabatan yang dekat (Ali *et al.* 2018; Shahimi *et al.* 2018). Kajian literatur ini bertujuan untuk menyajikan penggunaan PCR-RFLP dalam menganalisis dan mengautentikasi kehalalan dari daging dan pangan olahan berbahan daging.

METODE POLYMERASE CHAIN REACTION-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (PCR-RFLP)

Polymerase Chain Reaction (PCR) dikembangkan oleh Kary Mullis

pada tahun 1980 serta menerima hadiah Nobel pada tahun 1994 (Alberts *et al.* 1999). Teknik PCR merupakan teknik yang mengadopsi proses replikasi DNA dan berfungsi untuk mengamplifikasi wilayah target yang spesifik dari DNA. Dasar PCR terdiri dari 3 tahapan yakni denaturasi panas dari DNA target, penempelan primer, dan ekstensi oleh DNA polimerase (Lo 1998). Enzim DNA polimerase mensintesis sekuens DNA komplementernya. PCR dapat diaplikasikan pada bidang pangan seperti untuk mendeteksi gen yang menyandi verotoxin di strain *E.coli* yang diisolasi dari daging sapi giling, daging babi giling, dan penyaring susu (Read *et al.* 1992). Selain itu, PCR juga dapat digunakan untuk mendeteksi pemalsuan susu domba dengan susu kambing. Analisis PCR pada campuran susu domba/kambing mentah dan yang diberi perlakuan panas diketahui memungkinkan deteksi spesifik untuk mendeteksi susu kambing dengan ambang sensitivitas 0,1% (López-Calleja *et al.* 2005). Hasil penelitian Bahagiawati *et al.* (2015) juga menunjukkan bahwa teknik deteksi PCR dapat diaplikasikan untuk pemindaian produk hasil rekayasa genetik dan identifikasi spesifik jagung BT11 dan GA21. PCR juga diketahui dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies babi pada produk pangan asal hewan seperti bakso, kikil, kerupuk kulit,

nugget, dan sosis di pasar tradisional yang beredar di Provinsi Riau (Sari, 2017).

Produk PCR yang dihasilkan dapat dianalisis lebih lanjut menggunakan beberapa metode seperti elektroforesis gel agarosa, restriksi produk PCR, kloning produk PCR, dan hibridisasi urutan oligonukleotida spesifik. Metode yang biasanya digunakan untuk memverifikasi identitas produk PCR, mendeteksi situs restriksi polimorfisme serta mendeteksi mutasi yang berkaitan dengan pembentukan atau penghancuran situs restriksi yaitu restriksi produk PCR (Lo 1998). Menurut Murray *et al.* (2020), pembedaan strain spesifik mikroorganisme dapat dilakukan menggunakan basis fragmen DNA yang dihasilkan ketika DNA genomik dipotong oleh enzim restriksi endonuklease yang spesifik. Sampel DNA dari *strain* berbeda yang dipotong oleh enzim restriksi tersebut dapat menghasilkan fragmen dengan panjang yang berbeda. Pola fragmen DNA ini atau yang disebut *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) bisa digunakan untuk menentukan kedekatan *strain* yang berbeda. Konsep mengenai RFLP ini sebelumnya telah dijelaskan oleh Botstein *et al.* (1980) dalam jurnalnya yang membahas mengenai konstruksi peta keterkaitan genetik pada

manusia menggunakan RFLP. Teknik PCR-RFLP menggunakan ampikon PCR yang kemudian diberikan perlakuan dengan enzim restriksi endonuklease tertentu yang memotong DNA pada situs restriksi unik (dikenal sebagai *recognition site*) untuk menghasilkan beberapa fragmen DNA dalam berbagai ukuran (Hashim dan Al-Shuhaib 2019). Selanjutnya, ampikon yang dicerna akan melalui tahapan gel elektroforesis dengan memuat ampikon tersebut ke dalam gel dan medan listrik yang diterapkan. Pita dengan ukuran berbeda akan bergerak pada jarak yang bervariasi melintasi gel (Panneerchelvam dan Norazmi 2003).

Tahap analisis yang dibutuhkan pada metode PCR-RFLP yakni analisis dengan PCR dan pemotongan DNA hasil PCR dengan enzim restriksi. Berdasarkan penelitian (Erwanto *et al.* 2012), pada pengujian kontaminasi babi dalam campuran daging dengan sapi, kambing dan ayam didapatkan hasil yang lebih baik dan jelas jika menggunakan pengujian dengan PCR- RFLP dibandingkan pengujian PCR dengan primer spesifik untuk babi. Hal tersebut menunjukkan bahwa PCR-RFLP mempunyai sensitivitas yang lebih baik. Selain itu, jumlah spesies yang dapat diidentifikasi dengan satu PCR (*single PCR*) terbatas 4-5 (Bottero dan Dalmaso 2011). Adapun PCR-RFLP mampu untuk

mendeteksi lebih banyak spesies hewan dan membedakan spesies hewan yang berkerabat dekat (Guan *et al.* 2018a). Menurut (Hashim dan Al-Shuhaib 2019), ukuran amplicon dalam PCR-RFLP tidak membatasi keberhasilan kinerja penggunaannya. Hal tersebut disebabkan PCR-RFLP tidak bergantung pada status fisik amplicon. Adapun hal yang perlu diperhatikan sebagai pembatas laju ialah ada atau tidak adanya urutan pengenalan (*recognition sequence*). Jika tidak, enzim restriksi endonuklease yang dimaksud tidak memperhatikan panjang amplicon yang sesuai. PCR-RFLP biasanya dilakukan pada gel agarosa horizontal. Meskipun demikian, diperlukan konsentrasi amplicon yang tinggi untuk melakukan PCR-RFLP yang sukses (Hoy 2003). Hal tersebut disebabkan kemampuan gel agarosa yang terbatas untuk memisahkan molekul dibandingkan dengan gel poliakrilamida yang sangat sensitif.

Kelebihan utama dari PCR-RFLP dibandingkan dengan teknik PCR lainnya adalah dapat menyederhanakan tahapan persiapan sampel hingga analisis serta memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi. Pengujian menggunakan PCR-RFLP termasuk teknologi yang sederhana dan cepat untuk mengidentifikasi beberapa spesies, tidak memerlukan biaya yang tinggi, dan

optimalisasi prosedurnya lebih sederhana dibandingkan dengan *multiplex* PCR, PCR *real-time*, dan teknologi lain yang digunakan untuk lebih banyak spesies hewan (Guan *et al.* 2018a). *Multiplex* PCR menggunakan beberapa set primer spesifik dalam pengujiannya (Law *et al.* 2015). Kelebihan penggunaan *multiplex* PCR lainnya yaitu lebih hemat waktu, namun menurut Xu dan Shang (2016) metode ini lebih beresiko terjadinya penghambatan diri diantara set primer yang berbeda, efisiensi amplifikasi yang rendah, serta tidak ada efisiensi yang identik pada template yang berbeda. *Real-Time* PCR (qPCR) merupakan suatu teknik yang menerapkan proses otomatis, tidak membutuhkan proses lanjutan pasca PCR seperti gel elektroforesis serta dapat dipantau peningkatan jumlah salinan amplicon secara *real time* tiap siklusnya (Salihah *et al.* 2016). Menurut Shrestha *et al.* (2010), qPCR ini bisa dilakukan saat konsentrasi target sangat rendah. Adapun kekurangan dari qPCR ialah perlunya data sekuens sebelumnya dari gen target spesifik yang diminati yang mengakibatkan metode ini hanya bisa digunakan untuk gen target yang telah diketahui (Smith dan Osborn, 2009).

Berkaitan dengan maraknya proses adulterasi pada daging, beberapa peneliti turut menerapkan metode PCR-

RFLP untuk identifikasi spesies daging dengan menggunakan gen target yang berbeda seperti gen mitokondria 12S rRNA dan gen COI mitokondria (Girish *et al.* 2005; Haider *et al.* 2012). Selain itu, PCR-RFLP juga banyak diaplikasikan untuk mengidentifikasi spesies individu dalam campuran daging dengan memisahkan ukuran produk PCR yang berbeda serta mendeteksi kontaminasi babi pada produk bakso (Erwanto *et al.* 2014; Guan *et al.* 2018a). PCR-RFLP dinilai lebih mudah digunakan dan mempunyai spesifisitas yang tinggi, namun metode ini tidak memiliki kemampuan untuk mendeteksi mutasi yang tidak diketahui pada lokus teramplifikasi (Hashim dan Al-Shuhaib 2019). Selain itu, pada penelitian Guan *et al.* (2018) menyatakan bahwa PCR-RFLP pada kondisi tertentu perlu dikombinasikan dengan teknik deteksi spesies yang lain untuk mempertajam hasil analisisnya. Autentikasi kehalalan produk membutuhkan metode yang efisien supaya dalam satu kali analisis didapatkan banyak spesies yang terdeteksi secara jelas dan PCR-RFLP dapat melakukan hal tersebut. Teknik PCR lain juga dapat digunakan dalam autentikasi kehalalan produk, namun teknik PCR lain memiliki keterbatasan dalam mendeteksi banyaknya jenis spesies individu dalam satu kali analisis,

dimana pada analisis autentikasi halal, kemungkinan di dalam produk akan terdapat berbagai macam spesies hewan.

Dalam autentikasi halal menggunakan teknik PCR-RFLP, terdapat salah satu teknik yang sering digunakan yaitu teknik *multiplex* PCR. Teknik *multiplex* merupakan salah satu teknik analisis untuk mengidentifikasi dua atau lebih spesies hewan. Prinsip dari teknik *multiplex* PCR-RFLP pada dasarnya sama dengan teknik PCR konvensional, hanya saja digunakan lebih dari satu pasang primer dalam reaksi yang dijalankan dan digunakan teknik PCR-RFLP dalam menjalankan analisisnya. Primer yang digunakan akan secara spesifik bergabung dengan template DNA yang sesuai dan lebih dari satu fragmen, kemudian akan diamplifikasi dalam satu reaksi yang sama secara simultan. Sehingga, dalam satu waktu dapat dianalisis dua atau lebih DNA yang terdapat pada sampel dengan lebih cepat, *reliable*, lebih sensitif, akurat, dan spesifik.

PENGGUNAAN PCR-RFLP DALAM AUTENTIKASI HALAL PRODUK DAGING

1. Autentikasi Halal Bakso Daging Sapi

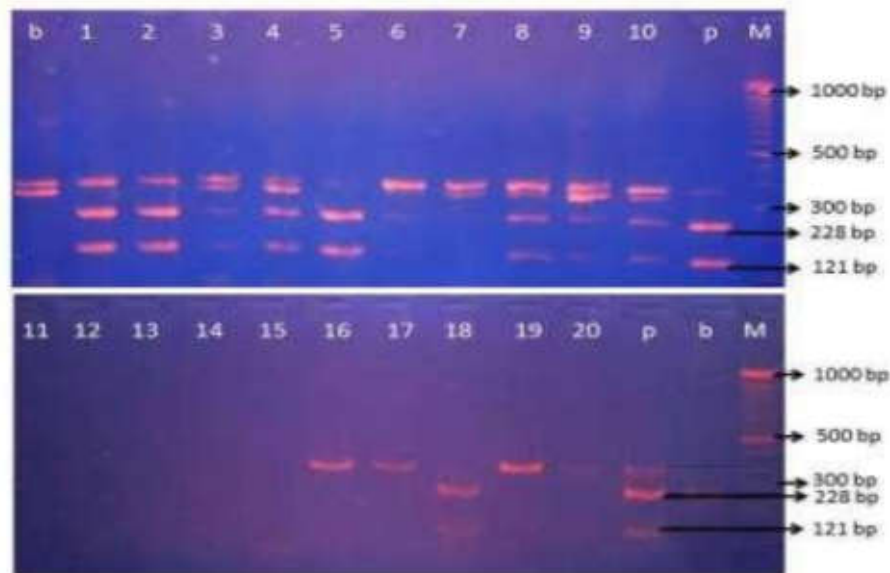
Analisis autentikasi halal pangan olahan dengan metode PCR-RFLP terbukti mampu menunjukkan adanya kontaminasi dari DNA spesifik spesies.

Pada penelitian terdahulu telah digunakan sekuens DNA mitokondria berupa 12S rRNA (Fajardo *et al.* 2006) dan 16S rDNA (Rastogi *et al.* 2007). Penggunaan DNA mitokondria memiliki kelebihan yaitu mudah diekstrak dari bermacam bagian tubuh maupun produk olahan, sekaligus berperan sebagai gen ciri khas dari suatu spesies. Berdasarkan penelitian Erwanto *et al.* (2011) menyatakan bahwa enzim *BseDI* memiliki sensitivitas terhadap keberadaan DNA mitokondria sitoktom b dari spesies babi hingga 0,1% dalam sampel sosis saat pengujian skala laboratorium. Selanjutnya, hasil penelitian Erwanto *et al.* (2012) yang menggunakan enzim restriksi DNA *BseDI* dalam analisis PCR-RFLP pada produk bakso menunjukkan bahwa enzim tersebut dapat digunakan dalam analisis keberadaan DNA spesies spesifik babi pada bakso daging.

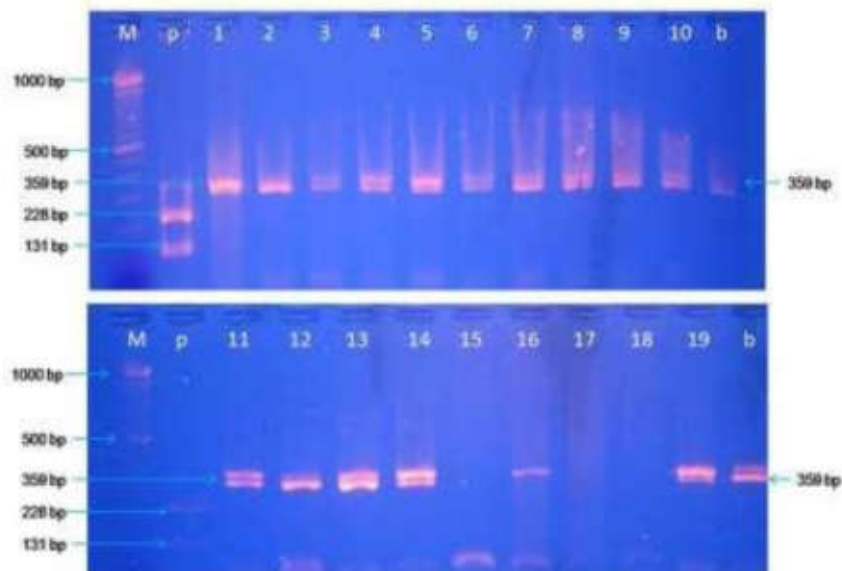
Berdasarkan pernyataan di atas, maka PCR-RFLP dengan *BseDI* dapat diterapkan pada analisis autentikasi kehalalan bakso daging sapi di Indonesia. Penelitian Erwanto *et al.* (2014) mengambil sampel bakso dari rumah produksi yang berbeda di wilayah

Yogyakarta dan Surabaya. DNA dari sampel bakso diekstrak kemudian diamplifikasi PCR menggunakan primer universal 359 bp dan diperoleh panjang amplicon \pm 360 bp. Selanjutnya dilakukan RFLP menggunakan enzim restriksi endonuklease *BseDI* pada 55°C selama 3 jam.

Hasil PCR-RFLP sampel bakso dapat dilihat setelah elektroforesis pada gel agarose 2%. Berdasarkan penelitian (Erwanto *et al.* 2011) enzim *BseDI* akan merestriksi DNA babi menjadi fragmen 228 dan 131 bp. Pada sampel bakso sapi yang tercemar DNA babi akan terbentuk tiga pita yaitu 359 bp yang mewakili DNA sapi yang tidak terfragmentasi oleh enzim *BseDI* serta pita 228 bp dan 131 bp yang mewakili fragmen DNA daging babi. Pada Gambar 1 ditunjukkan bahwa 9 dari 20 sampel bakso dari Yogyakarta positif mengandung DNA babi (lajur 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, dan 18). Temuan ini tidak diduga karena hanya satu produsen yang mengaku menggunakan daging babi. Disisi lain pada Gambar 2, tidak ditemukan adanya kontaminasi DNA babi dari sampel bakso di wilayah Surabaya. Hal ini terlihat dari hasil elektroforesis semua sampel bakso hanya terbentuk pita 359 bp.



Gambar 1 Hasil elektroforesis DNA sitokrom b setelah PCR-RFLP. M : marker DNA ladder 100 bp, Lajur 1-20 : Fragmen DNA dari 20 sampel bakso di wilayah Yogyakarta, p : DNA fragmen dari sitokrom b spesies babi, b : DNA fragmen dari sitokrom b spesies sapi.



Gambar 2 Hasil elektroforesis DNA sitokrom b setelah PCR-RFLP. M : marker DNA ladder 100 bp, Lajur 1-20 : Fragmen DNA dari 19 sampel bakso di wilayah Surabaya, p : DNA fragmen dari sitokrom b spesies babi, b : DNA fragmen dari sitokrom b spesies sapi.

Berdasarkan studi tersebut dapat dikatakan bahwa DNA mitokondria dapat digunakan sebagai dasar analisis adulterasi pangan olahan berbasis daging dengan metode PCR-RFLP. Terbukti dengan setelah dilakukan proses perebusan sampel bakso, DNA yang diekstrak tidak terfragmentasi menjadi bagian yang kecil atau <200 bp. Meskipun begitu masih ditemui adanya *smearing* DNA yang diekstrak dari sampel bakso pada hasil elektroforesis. Hal ini dapat disebabkan oleh proses produksi bakso yang mengalami pemanasan dan perlakuan fisik seperti penghalusan daging. Ditambah lagi adanya bahan penunjang seperti tepung dan bumbu sebagai campuran bakso. Proporsi daging yang digunakan tiap rumah produksi yang berbeda-beda juga dapat berdampak pada DNA yang diisolasi dari sampel. Maka purifikasi DNA ekstrak perlu dilakukan agar menghasilkan pita yang jelas pada gel elektroforesis (Fibriana *et al.* 2012).

2. Perbandingan Daging Babi dan Celeng (*Sus Scrofa*) Berdasarkan Ekstrak DNA Mitokondria

Identifikasi adanya adulterasi daging babi dengan daging celeng dapat dilakukan dengan DNA mitokondria sitokrom b yang diekstrak dari sampel daging. Analisis perbandingan dari DNA babi dan celeng yang merupakan spesies

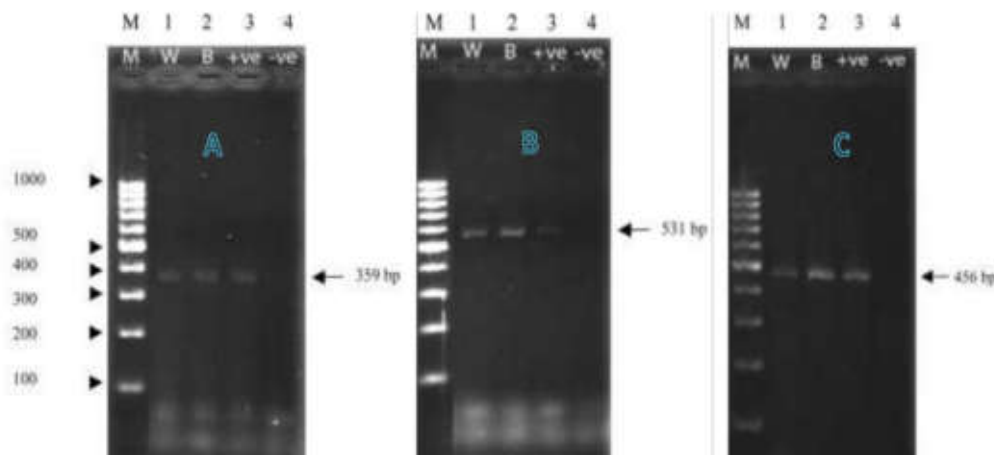
dengan kekerabatan yang dekat dilakukan oleh oleh Mutalib *et al.* (2012) dengan metode PCR-RFLP. Primer yang digunakan yaitu sitokrom b spesies spesifik untuk babi yang telah digunakan dalam autentikasi halal dari penelitian Lenstra *et al.* (2001) dan Montiel-Sosa *et al.* (2000). Sebagai pembanding digunakan juga primer spesifik spesies vertebrata mt-12S rRNA untuk macan tutul dari penelitian Pandey *et al.* (2007). Enzim restriksi yang digunakan yaitu *AluI*, *HindIII* dan *BsaI*. Sampel berupa daging babi beku dan daging celeng beku tanpa melalui proses pengolahan sebelumnya.

Hasil PCR DNA babi dan celeng pada gel elektroforeisis 1% dengan primer yang berbeda menghasilkan amplicon dengan panjang yang berbeda. Pada Gambar 3 terlihat hasil amplifikasi dengan primer sitokrom b : CYT b1 dan CYT b2 (Lenstra *et al.* 2001) menghasilkan amplicon 359 bp. PCR dengan primer sitokrom b : Pork F dan Pork R (Montiel- Sosa *et al.* 2000) menghasilkan amplicon 531 bp. PCR dengan primer 12S rRNA : 12SL dan 12 SH (Pandey *et al.* 2007) menghasilkan amplicon 456 bp.

PCR-RFLP DNA babi hasil PCR primer sitokrom b (Lenstra *et al.* 2001) dengan enzim *AluI* membentuk fragmen

244 bp dan 115 bp, sedangkan dengan enzim *Bsa*II membentuk fragmen 228 bp dan 131 bp. PCR-RFLP DNA babi hasil PCR primer Sitokrom b (Montiel- Sosa *et al.* 2000) dengan enzim *Alu*I menjadi fragmen 415 bp serta dengan enzim *Bsa*II menjadi fragmen 470 bp. PCR-RFLP DNA babi hasil PCR primer 12S rRNA (Pandey *et al.* 2007) dapat direstriksi enzim *Alu*I menjadi fragmen 322 bp dan dengan enzim *Bsa*II merestriksi menjadi fragmen 410 bp. Hasil PCR-RFLP yang menghasilkan fragmen dengan ukuran molekul kecil tidak dapat terbaca pada gel elektroforesis, maka diperlukan

Capillary Electrophoresis (CE) pada penelitian selanjutnya untuk memperoleh resolusi fragmen yang lebih baik. Enzim *Hind*III tidak mampu merestriksi semua DNA amplicon babi maupun celeng. Selain itu semua DNA amplicon celeng tidak dapat direstriksi oleh semua enzim. Hal ini disebabkan DNA celeng memiliki ikatan antar fragmen sitokrom b lebih kuat dibandingkan babi. Serta menunjukkan bahwa tingkat mutasi DNA celeng dan babi berbeda sehingga dapat didiferensiasi.



Gambar 3 Hasil PCR DNA sitokrom b babi dan celeng. A : amplifikasi dengan primer sitokrom b (Lenstra *et al.* 2001), B: amplifikasi dengan primer sitokrom b (Montiel-Sosa *et al.* 2000), C : amplifikasi dengan primer 12S rRNA (Pandey *et al.* 2007), M : marker DNA ladder 100 bp, Lajur 1 : DNA sitokrom b celeng, Lajur 2 : DNA sitokrom b babi, Lajur 3-4 : kontrol positif dan kontrol negatif.

Penelitian Mutalib *et al.* (2012) tidak secara langsung berkaitan dengan autentikasi halal pangan. Akan tetapi berdasarkan penelitian tersebut dapat diketahui enzim restriksi endonuklease yang tepat yang dapat digunakan pada metode PCR-RFLP untuk mengetahui adanya kontaminasi DNA babi. Enzim *AluI* dan *BsaI* menghasilkan fragmen yang berbeda dan khas pada DNA babi. Penelitian tersebut juga membuktikan bahwa PCR-RFLP dapat membedakan DNA dari spesies dengan kekerabatan yang dekat.

3. Identifikasi Adulterasi Produk Sosis Kalkun

PCR-RFLP terbukti mampu mengidentifikasi keberadaan DNA spesies adulteran dan merupakan metode yang tepat untuk autentikasi halal pangan. Hal ini dikarenakan keberadaan DNA tetap terjaga meskipun telah melalui perlakuan pengolahan. Akan tetapi PCR-RFLP saja tidak mampu mengidentifikasi DNA asing yang tidak *compatible* dengan enzim restriksi sehingga tidak akan terbentuk fragmen-fragmen DNA. Terlebih lagi apabila hanya digunakan satu endonuklease seperti pada penelitian Erwanto *et al.* (2014) sehingga perlu mengacu pada penelitian pendahulu yang memastikan sensitivitas *BseDI* terhadap keberadaan

DNA mitokondria sitokrom b spesies babi. PCR-RFLP yang dikombinasi dengan primer spesifik spesies dinilai tepat untuk analisis autentikasi produk olahan komersial karena kemungkinan kontaminasi lebih dari satu DNA spesies (Gargouri *et al.* 2021). Semakin banyak primer spesifik spesies yang digunakan, akan lebih akurat hasil PCR yang diperoleh. Ditambah lagi dengan penggunaan lebih dari satu jenis endonuklease, identifikasi spesies akan lebih spesifik berdasarkan fragmen yang dihasilkan setelah RFLP.

PCR-RFLP dengan primer spesifik spesies dapat juga digunakan untuk mengetahui DNA spesies dalam produk olahan. Aplikasi PCR-RFLP dalam autentikasi kehalalan di bidang farmasi yaitu mengidentifikasi spesies hewan yang digunakan sebagai bahan kapsul gelatin. Pada penelitian tentang aplikasi *multiplex* PCR-RFLP untuk analisis keberadaan DNA sapi, babi dan ikan pada kapsul gelatin produk farmasi di wilayah Asia diperoleh hasil 27 produk prositif gelatin sapi dan 3 produk prositif gelatin babi meskipun terdapat sertifikat halal pada kemasan (Sultana *et al.* 2018). Sensitivitas hasil PCR-RFLP pada penelitian tersebut dikonfirmasi ulang dengan *cloning* dan *sequencing* pada sampel positif DNA babi dan diperoleh hasil kemiripan *sequence* 99-

100% dengan DNA *Sus scrofa*. Hal tersebut membuktikan bahwa PCR-RFLP dengan primer spesifik spesies dapat membedakan DNA spesies dengan spesifik tanpa adanya *cross-contamination*.

Berdasarkan hasil penelitian di atas, maka aplikasi PCR-RFLP dengan primer spesifik spesies dapat digunakan juga untuk analisis kehalalan pangan. Penggunaan primer spesifik spesies hewan yang lazim dikonsumsi dan spesies hewan yang umumnya dilarang dalam satu proses PCR dapat menghasilkan amplicon dengan panjang bp yang berbeda. Pada tahap ini, PCR telah mampu membedakan DNA pada tingkat spesies (Soares *et al.* 2013). Selanjutnya RFLP dengan endonuklease yang tepat dapat memverifikasi hasil PCR dengan memotong amplicon menjadi beberapa fragmen. Sensitivitas *multiplex* PCR tergolong tinggi karena dapat mendeteksi hingga minimal 30 pg DNA sampel. Hal ini menguntungkan dalam analisis DNA hasil ekstraksi pangan olahan, mengingat adanya kemungkinan DNA rusak selama proses pengolahan (Prusakova *et al.* 2018).

Penelitian oleh Gargouri *et al.* (2021) tentang pengembangan PCR-RFLP yang dikombinasi dengan primer spesifik spesies ayam, kucing dan anjing yang selanjutnya akan digunakan dalam

triplex PCR. Primer spesifik spesies yang berasal dari DNA mitokondria D-loop ayam (442 bp) serta sitokrom b kucing (674 bp) dan anjing (808 bp). Validasi dilakukan dengan mencampur daging yang memiliki informasi DNA ayam, kucing dan anjing kemudian dilakukan *triplex* PCR. Hasil elektroforesis menunjukkan *band* yang terpisah pada 442 bp mewakili DNA ayam, 672 bp mewakili DNA kucing dan 808 bp mewakili DNA anjing. Validasi primer yang dilakukan perlu dilakukan untuk menghindari adanya *cross-contamination*. Risiko ini muncul akibat primer yang digunakan lebih dari satu dan kemungkinan adanya pasangan basa yang tidak cocok sehingga muncul hasil PCR *false negative* atau *false positive* (Hossain *et al.* 2016).

Selanjutnya RFLP dilakukan dengan enzim *BsmAI*, *TaaI* dan *SspI* yang sebelumnya diuji secara *in-silico* dan *in-vivo* pada 10 DNA spesies yang beragam. DNA dari anjing, kucing ayam, kambing, *dromedary* (unta punuk satu), tikus, babi, kelinci, keledai dan kalkun diamplifikasi dengan primer universal 358 bp dan dihasilkan 359 bp amplicon untuk masing-masing spesies. Dari ketiga enzim, paling tidak terdapat satu enzim restriksi yang dapat memfragmentasi DNA amplicon kecuali DNA amplicon ayam. Hal ini

menunjukkan bahwa fragmen hasil PCR-RFLP khas dimiliki oleh suatu spesies yang spesifik.

DNA diekstrak dari berbagai sosis kalkun kemudian dilakukan *triplex* PCR. Enzim restriksi endonuklease yang digunakan adalah *TaaI* sebagai satu-satunya enzim dalam penelitian yang mampu merestriksi DNA kalkun. Hasil elektroforesis menunjukkan *band* terbentuk pada 158 dan 201 bp yang membuktikan terdapat kandungan DNA kalkun dalam sampel. Akan tetapi, terdapat juga *band* 442 bp yang menunjukkan adanya DNA ayam. Produk sosis kalkun tersebut berarti telah dicampur dengan daging ayam namun informasi tersebut tidak dicantumkan pada kemasan. Sehingga dapat dikategorikan sebagai kasus *food adulteration* meskipun campuran yang digunakan adalah daging hewan konsumsi. Secara keseluruhan penelitian tersebut telah mengembangkan metode yang cepat dan sensitif untuk identifikasi lebih dari satu spesies sekaligus dalam satu kali analisis PCR-RFLP.

4. Metode *Heptaplex* PCR-RFLP untuk Autentikasi Produk Sosis Asap dan Daging Burger Olahan

Penelitian yang diinisiasi oleh (Gargouri *et al.* 2021) telah membuktikan *triplex* PCR-RFLP dapat menjadi metode alternatif analisis adulterasi

pangan. (Uddin *et al.* 2021) melakukan penelitian pengembangan metode untuk aplikasi *heptaplex* PCR-RFLP pada analisis daging konsumsi dari berbagai spesies. Autentikasi memanfaatkan DNA mitokondria seperti sitokrom b, 12S rRNA 16S rRNA dan yang terkini dengan ND5 (Hossain *et al.* 2016). Pada penelitian (Uddin *et al.* 2021) digunakan gen sitokrom b dan ND5 untuk desain primer spesifik spesies. Primer spesifik spesies ayam dari sitokrom b (161 bp) sedangkan sapi, kerbau, bebek, kambing, babi dan domba dari ND5 (106 bp, 138 bp, 203 bp, 236 bp, 73 bp dan 263 bp).

Amplifikasi DNA dengan PCR umumnya dilakukan dengan primer 359 bp, hal ini dikarenakan amplifikasi yang terlalu panjang tidak dianjurkan untuk menganalisis produk olahan. Amplikon yang terlalu panjang akan menjadikan target kurang jelas, terlebih untuk produk pangan olahan yang telah mengalami beragam perlakuan menyebabkan DNA target rawan rusak (Rashid *et al.* 2015). Berdasarkan fenomena ini maka dikembangkan PCR-RFLP dengan target DNA pendek berkisar 73-263 bp dari Sitokrom b dan ND5 hewan konsumsi yang lazim dikonsumsi seperti sapi, kerbau, kambing, domba, ayam, bebek dan babi. Desain primer tersebut dipilih untuk

heptaplex PCR agar diperoleh metode autentikasi yang lebih cepat dan spesifik terhadap tujuh spesies sekaligus dalam satu kali analisis menggunakan PCR. Metode ini juga dinilai dapat menganalisis adanya kontaminasi daging hewan lain dengan kekerabatan yang dekat seperti sapi dengan kerbau dan kambing dengan domba. Terlebih hasil PCR-RFLP yang khas pada tiap spesies dapat menjadi pembeda pada hewan dengan kekerabatan yang dekat.

Hasil yang diperoleh dari uji verifikasi *heptaplex* PCR yang dilakukan pada DNA 7 spesies target dan 25 spesies non-target yaitu terbentuk ampikon hanya pada DNA spesies target sehingga terbukti tidak terjadi tumpang tindih antar spesies. Selanjutnya, uji *Limit of Detection* (LoD) dan uji validasi pangan olahan dilakukan dengan sampel berupa sosis asap daging ayam, sapi dan babi. Ketiga sampel tersebut dicampur dengan daging daging kerbau, kambing, domba dan bebek sebagai adulteran. Hasil pengujian menunjukkan persentase adulteran hingga 0.5% (w/w) masih dapat terdeteksi pada gel elektroforesis dengan terbentuknya *band* spesifik spesies dari 73-263 bp mewakili DNA dari 7 spesies target.

PCR-RFLP menggunakan tiga enzim restriksi endonuklease yang spesifik untuk spesies tertentu. Enzim

FatI merestriksi DNA babi 73 bp menjadi 52 dan 21 bp, DNA sapi 106 bp menjadi 87 dan 19 bp serta DNA domba 263 bp menjadi 153 dan 110 bp. Enzim *Bfal* merestriksi DNA ayam 161 bp menjadi 93 dan 68 bp, DNA bebek 203 bp menjadi 141 dan 62 bp serta DNA kambing 236 bp menjadi 130 dan 106 bp. Enzim *HPY188I* mampu memfragmentasi DNA kerbau 138 bp menjadi 70 dan 68 bp. Hasil restriksi DNA kerbau hanya terpaut 2 bp sehingga *band* yang dihasilkan pada *automated electrophoresis* tidak terlalu terpisah namun membentuk satu *band* tebal. Hal ini dikarenakan batas resolusi metode *automated electrophoresis* adalah ≤ 5 bp.

Autentikasi pada produk sosis asap dan daging burger komersial berbahan sapi, ayam dan babi dengan *heptaplex* PCR-RFLP merupakan metode yang tepat mengingat kedua produk olahan tersebut mudah dijumpai di pasaran. *Heptaplex* PCR-RFLP dapat digunakan untuk tujuan autentikasi baik dengan alasan ekonomi, hukum, maupun kehalalan. Hasil yang diperoleh dari pengujian 19 sampel produk olahan daging sapi terdapat 54% kasus kesalahan pelabelan dengan rincian 16 sampel mengandung DNA kerbau dan 2 sampel mengandung DNA ayam. Dari 10 sampel daging burger sapi hanya 9 sampel mengandung DNA sapi.

Kemudian terdapat tujuh sampel mengandung DNA kerbau dan satu sampel mengandung DNA ayam. Pada produk sosis asap sapi seluruh sampel mengandung DNA sapi dan kerbau. Kemudian 2 dari 9 sampel mengandung DNA ayam. Pada produk olahan ayam dan babi tidak ditemukan adanya DNA hewan lain.

5. Multiplex PCR-RFLP untuk Identifikasi Berbagai Daging Hewan Konsumsi

Metode PCR-RFLP tidak asing lagi diaplikasikan untuk identifikasi pangan, akan tetapi pada metode ini masih terbatas pada 4-5 spesies saja yang dapat diujikan untuk satu kali PCR (Bottero dan Dalmaso 2011). Berdasarkan kelemahan tersebut maka terdapat inovasi yang mengombinasikan PCR-RFLP dengan primer spesifik spesies untuk dapat menguji lebih banyak spesies sekaligus mengidentifikasi antar spesies dengan kekerabatan yang dekat dalam satu kali analisis. Penelitian oleh (Uddin *et al.* 2021) telah berhasil mengembangkan *heptaplex* PCR-RFLP untuk analisis adulterasi produk olahan daging sosis asap dan daging burger komersial di Malaysia. Metode tersebut mampu mengidentifikasi 7 spesies berbeda sekaligus.

Penelitian (Guan *et al.* 2018a) mengembangkan primer universal yang dapat mengidentifikasi adanya adulterasi dari kombinasi berbagai macam spesies seperti domba, sapi, yak, rusa, dan unta. Desain primer universal dibuat dari DNA mitokondria dari yak, rusa, kambing, domba, babi, unta, lembu dan kerbau yang diperoleh dari NCBI database dan dicocokkan dengan sekuens ClustalW. *Insertion-deletion* dilakukan pada ampikon sehingga diperoleh fragmen dengan panjang berbeda untuk masing-masing spesies yaitu kambing (*Capra aegagrus hircus*) 760 bp, domba (*Ovis aries*) 737 bp, rusa (*Cervus axis*) 537 bp, kerbau (*Bovinae*) 486 bp, lembu (*Bos primigenius*) 481 bp, yak (*Bos mutus grunniens*) 464 bp, babi (*Sus scrofa*) 429 bp dan unta (*Pilus cameli*) 359 bp. PCR dilakukan pada 2% gel agarose, DNA target diencerkan untuk menguji LoD primer. Hasilnya, LoD DNA babi minimal 0,001 ng, sementara untuk spesies kambing, domba, rusa, kerbau, lembu, yak dan unta minimal 0,01-005 ng. Primer tersebut digunakan untuk PCR DNA spesies kuda (*Equus caballus*), keledai (*Equus asinus*), kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), ayam (*Gallus gallus*), bebek (*Anas platyrhynchos*), tikus (*Rattus norvegicus*), anjing (*Canis lupus familiaris*), katak (*Rana catesbiana*), and ikan mas (*Carassius*

auratus). Hasil yang diperoleh yaitu tidak terbentuk amplikon pada DNA spesies non-target maka dapat dikatakan tidak ada *cross-contamination*.

PCR-RFLP dilakukan dengan enzim restriksi endonuklease *SspI* yang mampu mengubah DNA spesies target menjadi beberapa fragmen. Penelitian oleh (Gargouri *et al.*2021) membuktikan bahwa PCR-RFLP dengan enzim *SspI* mampu membentuk fragmen dari DNA spesies *dromedary*, kelinci, anjing, kucing, keledai, tikus dan babi. Hasil PCR-RFLP DNA kambing menjadi 291 bp, 192 bp, 160 bp dan 118 bp; DNA domba menjadi 213 bp dan 75 bp; DNA rusa menjadi 391 bp dan 146 bp; DNA lembu menjadi 303 bp dan 178 bp; DNA yak 214 bp, 178 bp dan 73 bp; serta DNA babi menjadi 300 bp dan 129 bp. Enzim restriksi endonukelase *SspI* tidak dapat merestriksi DNA kerbau dan unta maka DNA kerbau tetap 486 bp dan DNA unta 359 bp.

Guan *et al.* (2018) menggunakan metode *multiplex* primer spesifik spesies untuk autentikasi daging rusa, yak, unta, sapi dan lembu komersial dari Cina Barat. Hasil analisis autentikasi dengan *multiplex* PCR-RFLP menunjukkan dari 15 sampel daging terdapat dua sampel yang berlabel daging rusa dan lembu yang terkontaminasi babi. Hasil gel elektroforesis daging rusa dan lembu

setelah PCR-RFLP menunjukkan pita pada 429 bp yang mewakili DNA babi. Adulterasi daging rusa dan lembu kemungkinan disebabkan oleh faktor ekonomi karena kedua daging tersebut kurang populer dibandingkan daging sapi dan babi di kalangan masyarakat.

Penelitian pengembangan metode yang dilakukan (Guan *et al.* 2018a) tidak secara langsung berfokus pada autentikasi pangan halal. Akan tetapi berdasarkan temuan adulterasi daging babi pada daging spesies lain menunjukkan metode ini dapat digunakan untuk identifikasi keberadaan DNA hewan haram yaitu babi. Selain itu dalam studi tersebut dicantumkan nama ilmiah spesies babi (*pig*) yang digunakan yaitu *Sus scrofa* yang identik dengan celeng (*wild boar*). Kemungkinan spesies babi yang dimaksud adalah *Sus scrofa domesticus* atau babi domestik yang ditenakkan untuk diambil dagingnya.

Penelitian mengenai PCR-RFLP menunjukkan sensitivitas metode tersebut dalam autentikasi pangan tingkat DNA. Selanjutnya pengembangan menjadi *multiplex* PCR-RFLP dengan penggunaan primer spesifik spesies akan meningkatkan akurasi dan efisiensi analisis karena mampu menguji lebih dari satu DNA dalam satu kali uji. Metode ini termasuk sederhana, terjangkau dan cepat untuk analisis produk pangan olahan dan

mudah diimplementasikan pada skala laboratorium (Prusakova *et al.* 2018). Hal tersebut dibandingkan dengan metode terbaru lainnya yaitu *Next-Generation Sequencing* (NGS) yang juga menguji pada tingkat DNA. NGS memberikan hasil dengan akurasi dan sensitivitas tinggi dalam analisis spesies daging, hanya saja kendala dari metode ini adalah biaya operasional yang tinggi (Gargouri *et al.* 2021).

Implementasi yang lebih luas dari PCR-RFLP untuk autentikasi pangan *non-daging*. Penelitian Sultana *et al.* (2018) tentang autentikasi kapsul gelatin, menunjukkan metode tersebut dapat mengidentifikasi DNA yang diekstrak dari produk selain turunan daging. Analisis gelatin yang digunakan sebagai bahan pengental pada *soft candy* dapat menjadi peluang untuk mengonfirmasi akurasi PCR-RFLP dalam analisis kehalalan produk.

Kombinasi dengan *multiplex* PCR dapat mempercepat analisis, hanya saja perlu dilakukan validasi dengan spesies non-target untuk memastikan primer hanya spesifik untuk spesies tertentu. Semakin banyak spesies non-target yang digunakan akan meningkatkan nilai validasi, akan tetapi masih belum diketahui jumlah variasi minimal DNA spesies non-target yang diperlukan untuk memastikan validitas primer.

Berdasarkan hasil gel elektroforesis Gargouri *et al.* (2021) pada uji validitas primer spesies kucing dan anjing tidak terdapat perbedaan pita yang terbentuk dari DNA kucing dan anjing dari ras berbeda. Hal tersebut menunjukkan *multiplex* PCR masih sebatas mengidentifikasi pada tingkat spesies.

KESIMPULAN

Proses autentikasi halal produk pangan, terutama pada produk daging diperlukan untuk mendeteksi adanya adulterasi daging halal dengan daging haram. Hal ini berkenaan dengan kepentingan umat muslim untuk mengonsumsi produk yang halal. Terdapat banyak cara untuk mengautentikasi kehalalan dari produk pangan, salah satunya dengan menggunakan PCR-RFLP. PCR-RFLP memiliki mekanisme pendeteksian spesies daging dengan memberikan perlakuan penambahan enzim restriksi endonuklease spesifik pada amplicon PCR yang dapat memotong DNA pada *recognition site* untuk menghasilkan beberapa fragmen DNA yang kemudian dapat ditandai sebagai penciri dari spesies tertentu. Teknik PCR-RFLP telah dikembangkan hingga *heptaplex* yang dapat mendeteksi hingga tujuh spesies daging hewan yang berbeda. Teknik ini tentu masih memerlukan pengembangan

lebih lanjut sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi perbedaan pada produk pangan yang kian kompleks.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1999. *Fundamentos da Biologia Celular: Uma Introdução à Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul.
- Ali ME, Ahmad MNU, Hossain MM, Sultana S. 2018. Multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay discriminates of rabbit, rat and squirrel meat in frankfurter products. *Food Control*. 84:148–158. doi:10.1016/J.FOODCONT.2017.07.030.
- Arslan A, Ilhak OI, Calicioglu M. 2006. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Science*. 72(2):326–330. doi:10.1016/j.meatsci.2005.08.001
- Bahagiawati, Reflinur, Santoso TJ. 2015. Teknik PCR Kualitatif untuk Deteksi Produk Rekayasa Genetika Jagung Event BT11 dan GA21. *J AgroBiogen*. 11(2):65–72. doi:10.21082/jbio.v11n2.2015.p65-72.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32(3):314.
- Bottero MT, Dalmaso A. 2011. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*. 190(1):34–38. doi:10.1016/J.TVJL.2010.09.024.
- Erwanto Y, Abidin MZ, Muslim EYP, Sugiyono S, Rohman A. 2014. Identification of Pork Contamination in Meatballs of Indonesia Local Market Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Analysis. *Asian- Australasian Journal of Animal Sciences*. 27(10):1487. doi:10.5713/AJAS.2014.14014.
- Erwanto Y, Abidin MZ, Rohman A, Sismindari. 2011. PCR-RFLP Using BseDI Enzyme for Pork Authentication in Sausage and Nugget Products. *Media Peternakan*. 34(1):14–14. doi:10.5398/MEDPET.2011.34.1.14.
- Erwanto Y, Abidin MZ, Sismindari, Rohman A. 2012. Pig species identification in meatballs using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for Halal authentication. *International Food Research Journal*. 19(3):901–906.
- Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Hernández PE, García T, Martín R. 2006. PCR-RFLP Authentication of Meats from Red Deer (*Cervus*

- elaphus), Fallow Deer (*Dama dama*), Roe Deer (*Capreolus capreolus*), Cattle (*Bos taurus*), Sheep (*Ovis aries*), and Goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(4):1144–1150.doi:10.1021/JF051766R.
- Gargouri H, Moalla N, Kacem HH. 2021. PCR-RFLP and species-specific PCR efficiency for the identification of adulteries in meat and meat products. *European Food Research and Technology* 2021 247:9. 247(9):2183–2192.doi:10.1007/S00217-021-03778-Y.
- Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Shivakumar BM, Anand M, Patel M, Sharma B. 2005. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*70(1):107–112.doi:10.1016/J.MEATSCI.2004.12.004.
- Guan F, Jin YT, Zhao J, Xu AC, Luo YY. 2018a. A PCR Method That Can Be Further Developed into PCR-RFLP Assay for Eight Animal Species Identification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2018:1–6.doi:10.1155/2018/5890140.
- Haider N, Nabulsi I, Al-Safadi B. 2012. Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene. *Meat Science*. 90(2):490–93.doi:10.1016/J.MEATSCI.2011.09.013.
- Hashim HO, Al-Shuhaib MBS. 2019. Exploring the Potential and Limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP Detection: A Review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 6(4):137–144.doi:10.29252/JABR.06.04.02.
- Hossain MAM, Ali ME, Abd Hamid SB, Asing, Mustafa S, Mohd Desa MN, Zaidul ISM. 2016. Double Gene Targeting Multiplex Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay Discriminates Beef, Buffalo, and Pork Substitution in Frankfurter Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64(32):6343–6354. doi:10.1021/ACSJAFC.6B02224/SUPPL_FILE/JF6B02224_SI_006.PDF.
- Hoy MajoricA. 2003. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*. Second. Academic Press.
- Law JWF, Mutalib NSA, Chan KG, Lee LH. 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*. 5(770):1–19. doi:10.3389/fmicb.2014.00770.
- Lenstra JA, Buntjer JB, Janssen FW. 2001. On the origin of meat - DNA techniques for species identification in meat products. *Veterinary Sciences Tomorrow*.(2):1–15.
- Liu W, Tao J, Xue M, Ji J, Zhang Y, Zhang L, Sun W. 2019. A multiplex PCR method mediated by universal primers for the identification of eight meat

- ingredients in food products. *European Food Research and Technology* 2019 245:11. 245(11):2385–2392.doi:10.1007/S00217-019-03350-9.
- Lo YMD. 1998. *Clinical Applications of PCR*. New Jersey : Humana Press Inc.
- López-Calleja I, González I, Fajardo V, Martín I, Hernández PE, García T, Martín R. 2005. Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. *J Dairy Sci*. 88:3115–3120. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72993-3.
- Montiel-Sosa JF, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Roncalés P, López-Pérez MJ, Pérez-Martos A. 2000. Direct and Highly Species-Specific Detection of Pork Meat and Fat in Meat Products by PCR Amplification of Mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(7):2829–2832.doi:10.1021/JF9907438.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2020. *Medical Microbiology Ninth Edition*.
- Mursyidi A. 2013. The Role of Chemical Analysis in the Halal Authentication of Food and Pharmaceutical Products. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*. 1(1):1–4.doi:10.14499/JFPS.
- Mutalib SA, Nazri WSW, Shahimi S, Yaakob N, Sani NA, Abdullah A, Salam Babji A, Ghani MA. 2012. Comparison between pork and wild boar meat (*Sus scrofa*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Sains Malaysiana*. 41(2):199–204.
- Pandey PK, Dhotre DP, Dharne MS, Khadse AN, Hiremath UI, Chaudhari RD, Patole MS, Shouche YS. 2007. Evaluation of mitochondrial 12S rRNA gene in the identification of *Panthera pardus fusca* (Meyer, 1794) from field-collected scat samples in the Western Ghats, Maharashtra, India. *Current Science*. 92(8):1129–1133.
- Panneerchelvam S, Norazmi MN. 2003. Forensic DNA Profiling and Database. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*. 10(2):20.
- Rahman MM, Ali ME, Hamid SBA, Bhassu S, Mustafa S, Al Amin M, Razzak MA. 2015. Lab-on-a-Chip PCR-RFLP Assay for the Detection of Canine DNA in Burger Formulations. *Food Analytical Methods* 2015 8:6. 8(6):1598–1606.doi:10.1007/S12161-015-0090-1.
- Rastogi G, Dharne MS, Walujkar S, Kumar A, Patole MS, Shouche YS. 2007. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science*. 76(4):666–674.doi:10.1016/J.MEATSCI.2007.02.006.
- Read SC, Clarke RC, Martin A, De Grandis SA, Hii J, McEwen S, Gyles CL. 1992. Polymerase chain reaction for detection of

- verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Mol Cell Probes*. 6(2):153–161. doi:10.1016/0890-8508(92)90060-B.
- Sahilah AM, Laila Liyana MN, Aravindran S, Aminah A, Mohd Khan A. 2016. Halal authentication in Malaysia context: potential adulteration of non- Halal ingredients in meatballs and surimi products. *International Food Research Journal*. 23(5):p1832-1838.
- Salihah NT, Hossain MM, Lubis H, Ahmed MU. 2016. Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. *J Food Sci Technol*. 53(5):2196–2209. doi:10.1007/s13197-016-2205-0.
- Sari F. 2017. Identifikasi spesies babi pada produk pangan asal hewan di pasar tradisional Provinsi Riau dengan metode polymerase chain reaction. *J Riau Biol*. 2(1):55–60.
- Shahimi S, Mutalib SA, Wan Nazri WS, Abdullah A, Sani NA. 2018. Comparison of DNA profiling between fishes and pork meat using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) analysis. *Sains Malaysiana*. 47(7):1535–1540. doi:10.17576/jsm-2018-4707-22.
- Shrestha HK, Hwu KK, Chang MC. 2010. Advances in detection of genetically engineered crops by multiplex polymerase chain reaction methods. *Trends Food Sci Technol*. 21:442–454. doi:10.1016/j.tifs.2010.06.004.
- Smith CJ, Osborn AM. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 67:6–20. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
- Sultana S, Hossain MAM, Naquiah NNA, Ali ME. 2018. Novel multiplex PCR-RFLP assay discriminates bovine, porcine and fish gelatin substitution in Asian pharmaceuticals capsule shells. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1500719>. 35(9):1662–1673. doi:10.1080/19440049.2018.1500719.
- Swartidiana FR, Yuliana ND, Ketut I, Adnyane M, Hermanianto J, Jaswir I. 2022. Differentiation of beef, buffalo, pork, and wild boar meats using colorimetric and digital image analysis coupled with multivariate data analysis. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 33(1):87–99. doi:10.6066/JTIP.2022.33.1.87
- Uddin SMK, Hossain MAM, Chowdhury ZZ, Johan MR. 2021. Detection and discrimination of seven highly consumed meat species simultaneously in food products using heptaplex PCR-RFLP assay. *Journal of Food Composition and Analysis*. 100:103938. doi:10.1016/J.JFCA.2021.103938.
- Wang Q, Zhang X, Zhang HY, Zhang J, Chen GQ, Zhao DH, Ma HP, Liao WJ. 2010. Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene. *Meat Science*. 85(2):265–269. doi:10.1016/J.MEATSCI.2010.01.010.

Xu W, Shang Y. 2016. The detection techniques of genetically modified organisms. Di dalam : Watson RR, Preedy VR, editor. *Genetically Modified Organisms*

in Food : Production, Safety, Regulation and Public Health.
USA : Academic Press.

Use Of Pcr-Rflp In Halal Authentication Of Meat And Processed Products: Literature Review

ORIGINALITY REPORT

9%

SIMILARITY INDEX

8%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.researchgate.net Internet Source	6%
2	text-id.123dok.com Internet Source	<1%
3	www.hindawi.com Internet Source	<1%
4	synapse.koreamed.org Internet Source	<1%
5	e-sciencecentral.org Internet Source	<1%
6	eprints.untirta.ac.id Internet Source	<1%
7	jurnal.unived.ac.id Internet Source	<1%
8	repository.ub.ac.id Internet Source	<1%
9	www.cursospos.com.br Internet Source	<1%

10	adoc.pub Internet Source	<1 %
11	bbrc.in Internet Source	<1 %
12	repository.usd.ac.id Internet Source	<1 %
13	Jay Mie Kua, Mohammad Malek Faizal Azizi, Mohd Afendy Abdul Talib, Han Yih Lau. "Adoption of analytical technologies for verification of authenticity of halal foods – a review", Food Additives & Contaminants: Part A, 2022 Publication	<1 %
14	issuu.com Internet Source	<1 %
15	vdocuments.site Internet Source	<1 %
16	J. Amaral, L. Meira, M.B.P.P. Oliveira, I. Mafra. "Advances in Authenticity Testing for Meat Speciation", Elsevier BV, 2016 Publication	<1 %
17	Muflihah, Ari Hardianto, Pintaka Kusumaningtyas, Sulistyو Prabowo, Yeni Wahyuni Hartati. "DNA-based detection of pork content in food", Heliyon, 2023 Publication	<1 %

Exclude quotes On

Exclude matches < 1 words

Exclude bibliography On