

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUNG.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	5
C. Keaslian Penelitian.....	6
D. Urgensi Penelitian.....	7
E. Tujuan Penelitian.....	11
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	12
A. Kerangka Teori.....	12
1. Halal dan Kehalalan Makanan.....	12
2. Autentikasi Kehalalan Produk.....	15
3. Polymerase Chain Reaction.....	21
4. <i>Real time</i> Polymerase Chain Reaction.....	23
5. TaqMan Probe.....	28
6. PCR <i>Multiplex</i>	34
7. DNA Mitokondria.....	36
8. Perancangan <i>Primers</i>	38
9. Validasi <i>Real Time</i> PCR.....	41
B. Landasan Teori.....	43
C. Peta Jalan Penelitian.....	47
D. Hipotesis.....	48
BAB III METODE PENELITIAN.....	49
A. Jenis dan Rancangan Penelitian.....	49
1. Jenis Penelitian.....	49
2. Variabel Penelitian.....	49
B. Bahan Penelitian.....	49
1. Sampel.....	49
2. Pereaksi.....	50
3. Alat.....	50
C. Jalannya Penelitian.....	50
1. Perancangan <i>Primers</i>	50
2. Isolasi DNA.....	51
3. Analisis <i>Real time</i> PCR.....	51
4. Optimasi Suhu Penempelan <i>Primers</i>	53
5. Pengujian Spesifitas <i>Primers</i>	53
6. Analisis Campuran Daging Babi dan Sapi dalam Bakso Sapi dengan Metode <i>Real Time</i> PCR.....	54
D. Analisis Data.....	55



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	58
A. Analisis DNA Babi dengan Real-time PCR dengan <i>primers</i> spesifik spesies.....	58
1. Rancangan <i>primers</i>	58
2. Isolasi DNA dalam Daging dan dalam Bakso Babi.....	61
3. Analisis Real-Time PCR.....	63
a. Optimasi Suhu Penempelan <i>Primers</i>	63
b. Pengujian Spesifitas <i>Primers</i>	66
c. Penentuan Batas Deteksi dan Efisiensi.....	68
d. Uji Keterulangan.....	74
e. Identifikasi DNA Babi pada Sampel Bakso Sapi Pasaran..	77
B. Analisa DNA Babi menggunakan <i>Primers</i> dan Probe TaqMan.....	84
1. Desain dan Uji Homologi <i>Forward primers</i> , <i>Reserve primers</i> , dan Probe TaqMan.....	84
2. Analisis Probe TaqMan Real-Time PCR.....	88
a. Optimasi Suhu Penempelan <i>Primers</i>	88
b. Pengujian Spesifitas Probe TaqMan.....	91
c. Penentuan Batas Deteksi dan Efisiensi.....	94
d. Uji keterulangan.....	97
e. Identifikasi DNA Babi dan Sapi pada Sampel Bakso Sapi Pasaran dengan real-time PCR probe TaqMan.....	99
C. Analisis DNA Babi dan Sapi secara simultan dengan <i>multiplex Real time-PCR</i>.....	103
1. <i>Primers</i> pada pengujian <i>multiplex Real time-PCR</i>	104
2. Analisis <i>multiplex Real time-PCR</i>	104
a. Optimasi Suhu Penempelan <i>Primers</i>	104
b. Uji Spesifitas <i>Primers</i>	106
c. Identifikasi DNA Babi pada Bakso Referensi Campuran Babi:Sapi Secara Simultan.....	111
d. Penentuan Batas Deteksi dan Efisiensi.....	112
BAB V PEMBAHASAN UMUM.....	115
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	125
A. Kesimpulan.....	125
B. Saran.....	126
DAFTAR PUSTAKA.....	127
LAMPIRAN.....	137

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Tiga tahapan utama dalam polymerase chain reaction yang meliputi denaturasi (atas), <i>annealing</i> (penempelan <i>primers</i>) dan sintesis (amplifikasi). Gambar diambil dari Sudjadi dan Rohman (2017) dengan izin penerbit.....	23
Gambar 2	Kurva amplifikasi yang menggambarkan peristiwa yang terjadi dalam <i>real time</i> -PCR (BioRad, 2006)	25
Gambar 3	Mekanisme <i>SYBR Green</i> yang intensitas fluoresensinya meningkat ketika berinterkalasi dengan DNA hasil amplifikasi (BioRad, 2006)	27
Gambar 4	<i>Probe TaqMan</i> RT PCR.....	29
Gambar 5	Peta Jalan Penelitian.....	47
Gambar 6	Amplifikasi kurva menggunakan <i>primers cyt b Sus scrofa</i> pada berbagai suhu <i>annealing</i> 47.1°C (A); 46.6°C (B); 51.1°C (C); 48.0°C (D); 49.4°C (E) and NTC (no template control)	64
Gambar 7	Amplifikasi kurva menggunakan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> pada berbagai suhu <i>annealing</i> 54,6°C (A); 53,3°C (B); 51.6°C (C); 50,2°C (D); 49.3°C (E), and 48,8°C (F).....	65
Gambar 8	Amplifikasi kurva menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> pada berbagai suhu <i>annealing</i> 49,2°C (A); 49,9°C (B); 50,9°C (C); 52,1°C (D); 53,1°C (E); 53,6 °C (F).....	65
Gambar 9	Hasil spesifisitas <i>primers cyt b Sus scrofa</i> untuk DNA babi (A), dan DNA ayam, kambing, sapi, NTC (B, C, D, E)	66
Gambar 10	Hasil spesifisitas <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> untuk DNA babi (A), dan DNA ayam, kambing, sapi, NTC (B, C, D, E)	67
Gambar 11	Hasil spesifisitas <i>primers D-Loop Bos taurus</i> untuk DNA sapi (A), dan DNA ayam, kambing, babi, NTC (B, C, D, E)	68
Gambar 12	Kurva amplifikasi DNA bakso babi 100% yang diencerkan dengan konsentrasi 0,1 pg (F), 1 pg (E), 10 pg (D), 100 pg (C), 1000 pg (B) dan 10000 pg (A).....	69
Gambar 13	Kurva standar <i>primers</i> pada isolat DNA bakso sapi-babi dengan berbagai konsentrasi menggunakan <i>primers cyt b Sus scrofa</i> yang menyatakan hubungan antara log berbagai konsentrasi (sumbu-x) dengan nilai quantification cycle (Cq) di sumbu -y.....	70
Gambar 14	Kurva amplifikasi DNA bakso babi 100% yang diencerkan dengan konsentrasi 0-100%.....	70
Gambar 15	Kurva amplifikasi DNA bakso sapi 100% yang diencerkan dengan konsentrasi 0,1 pg (E), 1 pg (D), 10 pg (C), 100 pg (B) dan 1000 pg (A)	71
Gambar 16	Kurva amplifikasi DNA bakso sapi 100% yang diencerkan dengan konsentrasi 0-100%.....	72
Gambar 17	Kurva standar <i>primers</i> pada isolat DNA bakso sapi-babi dengan berbagai konsentrasi menggunakan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> yang menyatakan hubungan antara log berbagai konsentrasi (sumbu-x) dengan nilai quantification cycle (Cq) di sumbu -y.....	72
Gambar 18	Kurva amplifikasi DNA bakso sapi 100% yang diencerkan dengan konsentrasi 0,1 pg (E), 1 pg (D), 10 pg (C), 100 pg (B) dan 1000 pg (A) menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i>	73
Gambar 19	Kurva amplifikasi DNA bakso sapi 100% yang diencerkan dengan konsentrasi 0-100% menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i>	73



Gambar 20	Kurva standar <i>primers</i> pada isolat DNA bakso sapi-babi dengan berbagai konsentrasi menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> yang menyatakan hubungan antara log berbagai konsentrasi (sumbu-x) dengan nilai quantification cycle (Cq) di sumbu -y.....	74
Gambar 21	Kurva amplifikasi (A) dan logaritma amplifikasi (B) dari DNA bakso babi 100% dengan replikasi 6x menggunakan <i>primers cyt b Sus scrofa</i>	75
Gambar 22	Kurva amplifikasi dari DNA bakso babi 100% dengan replikasi 6x menggunakan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i>	76
Gambar 23	Kurva amplifikasi dari DNA bakso sapi 100% dengan replikasi 6x menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i>	77
Gambar 24	Kurva amplifikasi DNA bakso pasaran babi (A) dan bakso sapi (B, C, D) dan NTC (E).....	79
Gambar 25	Kurva amplifikasi DNA bakso pasaran babi (A) dan bakso sapi (B, C, D, E, F) dan NTC (G).....	79
Gambar 26	Kurva amplifikasi DNA bakso pasaran babi (C) dan bakso sapi (A, B).....	80
Gambar 27	Amplifikasi kurva menggunakan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> pada berbagai suhu <i>annealing</i> 54,6 °C(A), 53,3°C (B), 51,6°C (C), 50,2°C (D), 49,3°C (E), 48,8 °C(F).....	89
Gambar 28	Kurva <i>melting</i> menggunakan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> pada berbagai suhu <i>annealing</i> , paling tinggi pada suhu 53,3°C.....	89
Gambar 29	Amplifikasi kurva menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> pada berbagai suhu <i>annealing</i> 49,2°C (A); 49,9°C (B); 50,9°C (C); 52,1°C (D); 53,1°C (E); 53,6 °C (F).....	90
Gambar 30	Kurva <i>melting</i> menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> pada berbagai suhu <i>annealing</i> , paling tinggi pada suhu 53,1°C.....	90
Gambar 31	Hasil spesifisitas <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> untuk DNA babi (A), DNA celeng (B) dan DNA ayam, tikus, sapi, NTC (C, D, E, F).....	91
Gambar 32	Hasil spesifisitas <i>primers D-Loop Bos taurus</i> untuk DNA sapi (A), DNA ayam, tikus, babi, celeng NTC (B, C, D, E, F).....	93
Gambar 33	Kurva amplifikasi DNA bakso babi 100% menggunakan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> yang diencerkan dengan konsentrasi 1000 pg (A), 200 pg (B), 100 pg (C), 10 pg (D), 5 pg (E), 1 pg (F), 0,5 pg (G) and NTC atau no template control.....	94
Gambar 34	Kurva standar hasil amplifikasi DNA bakso babi 100% menggunakan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> yang diencerkan dengan konsentrasi 1000 pg, 200 pg, 100 pg, 10 pg, 5 pg, 1 pg, dan 0,5 pg. menggunakan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i>	95
Gambar 35	Kurva amplifikasi DNA bakso sapi 100% menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> yang diencerkan dengan konsentrasi 1000 pg (A), 100 pg (B), 10 pg (C), 5 pg (D), 1 pg (E), 0,5 pg (F), 0,1 pg (G), dan no template control NTC (H).....	96
Gambar 36	Kurva amplifikasi DNA bakso sapi 100% menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> mulai 100% (A), 95% (B), 90% (C), 80% (D) dan 50% (E) serta no template control NTC.....	97
Gambar 37	Kurva standar hasil amplifikasi DNA bakso sapi menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> mulai 100% (A), 95% (B), 90% (C), 80% (D) dan 50% (E).....	97
Gambar 38	Kurva amplifikasi DNA bakso babi 100% menggunakan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> dengan replikasi 6x dengan probe TaqMan.....	98



Gambar 39	Kurva amplifikasi DNA bakso sapi 100% menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> dengan replikasi 6x dengan probe TaqMan.....	99
Gambar 40	Kurva amplifikasi dari DNA bakso babi komersial (A) dan sampel bakso sapi B, C, D, E , dan no template control NTC.....	100
Gambar 41	Kurva amplifikasi dari DNA bakso sapi komersial A, B, C, D, E, serta NTC dan DNA daging babi.....	101
Gambar 42	Amplifikasi hasil optimasi suhu penempelan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> pada campuran DNA babi dan sapi menggunakan <i>multiplex real time PCR</i>	105
Gambar 43	Kurva <i>melting</i> hasil optimasi suhu penempelan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> pada campuran DNA babi dan sapi menggunakan <i>multiplex real time PCR</i>	105
Gambar 44	Amplifikasi hasil optimasi suhu penempelan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> pada campuran DNA sapi dan babi menggunakan <i>multiplex real time PCR</i>	106
Gambar 45	Kurva <i>melting</i> hasil optimasi suhu penempelan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> pada campuran DNA sapi dan babi menggunakan <i>multiplex real time PCR</i>	106
Gambar 46	Amplifikasi hasil spesifikasi <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> pada campuran DNA babi dan sapi menggunakan <i>multiplex real time PCR</i>	107
Gambar 47	Kurva <i>melting</i> hasil spesifikasi <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> pada campuran DNA babi dan sapi menggunakan <i>multiplex real time PCR</i>	108
Gambar 48	Amplifikasi hasil spesifikasi <i>primers D-Loop Bos taurus</i> pada campuran DNA sapi dan babi menggunakan <i>multiplex real time PCR</i>	109
Gambar 49	Kurva <i>melting</i> hasil spesifikasi <i>primers D-Loop Bos taurus</i> pada campuran DNA sapi dan babi menggunakan <i>multiplex real time PCR</i>	109
Gambar 50	Amplifikasi hasil spesifikasi <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> dan <i>Bos taurus</i> secara simultan pada campuran DNA babi dan sapi menggunakan <i>multiplex real time PCR</i>	110
Gambar 51	Kurva <i>melting</i> hasil spesifikasi <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> dan <i>Bos taurus</i> secara simultan pada campuran DNA babi dan sapi menggunakan <i>multiplex real time PCR</i>	110
Gambar 52	Kurva hasil amplifikasi DNA bakso referensi campuran babi dan sapi dengan <i>multiplex RT-PCR</i> . Konsentrasi bakso referensi: bakso babi 0% (100% sapi), bakso campuran babi: sapi (0,1; 0,5; 1; 5; 10, 20 dan 50%) serta bakso babi 100%.....	112
Gambar 53	Kurva <i>melting</i> hasil amplifikasi DNA bakso referensi campuran babi dan sapi dengan <i>multiplex RT-PCR</i> . Konsentrasi bakso referensi : bakso babi 0% (100% sapi), bakso campuran babi:sapi (0,1; 0,5; 1; 5; 10, 20 dan 50%) serta bakso babi 100%.....	112
Gambar 54	Kurva hasil amplifikasi DNA bakso referensi campuran babi dan sapi dengan <i>multiplex RT-PCR</i> . Konsentrasi bakso referensi campuran babi dan sapi 0,1; 0,5; dan 1%.....	113
Gambar 55	Kurva <i>melting</i> hasil amplifikasi DNA bakso referensi campuran babi dan sapi dengan <i>multiplex RT-PCR</i> . Konsentrasi bakso referensi campuran babi dan sapi 0,1; 0,5; dan 1%.....	113
Gambar 56	Kurva baku hasil amplifikasi DNA bakso referensi campuran babi dan sapi dengan <i>multiplex RT-PCR</i> . Konsentrasi bakso referensi campuran babi dan sapi 0,1; 0,5; dan 1%.....	114

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Berbagai penelitian yang telah dilaporkan untuk analisis daging babi dengan berbagai teknik polymerase chain reaction dengan target gen DNA tertentu.....	8
Tabel 2	Berbagai metode analisis untuk derivat babi dan aplikasinya dalam produk makanan beserta prinsip yang mendasarinya.....	19
Tabel 3	Perbandingan antara q-PCR dengan PCR konvensional (Sudjadi dan Rohman, 2017).....	24
Tabel 4	Tingkatan konsentrasi/formulasi bakso dengan level daging babi dan daging sapi yang berbeda.....	54
Tabel 5	Kandidat <i>primers cyt b Sus scrofa</i> yang dirancang untuk identifikasi DNA daging babi.....	59
Tabel 6	Kandidat <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> yang dirancang untuk identifikasi DNA daging babi.....	59
Tabel 7	Kandidat <i>primers D-Loop Bos taurus</i> yang dirancang untuk identifikasi DNA daging sapi.....	60
Tabel 8	Hasil analisis kuantitatif DNA dalam isolat daging segar secara spektrofotometer UV.....	62
Tabel 9	Hasil analisis kuantitatif DNA dalam isolat bakso campuran daging babi dan daging sapi secara spektrofotometer UV.....	62
Tabel 10	Data hasil amplifikasi pengujian keterulangan dengan metode RT PCR.....	74
Tabel 11	Data hasil amplifikasi pengujian keterulangan dengan metode RT PCR.....	76
Tabel 12	Data hasil amplifikasi pengujian keterulangan dengan metode RT PCR.....	76
Tabel 13	Hasil analisis kuantitatif isolat DNA bakso sapi pasaran secara spektrofotometri UV.....	78
Tabel 14	Hasil Pengujian Terhadap <i>Primers D dan E</i>	81
Tabel 15	Kandidat <i>primers dan probe D-Loop</i> mitokondria babi (<i>Sus scrofa</i>).....	86
Tabel 16	Kandidat <i>primers dan probe D-Loop</i> mitokondria sapi (<i>Bos taurus</i>).....	86
Tabel 17	Data hasil amplifikasi pengujian keterulangan menggunakan <i>primers D-Loop Sus scrofa</i> pada DNA Bakso Babi 100% dengan metode RT PCR...	98
Tabel 18	Data hasil amplifikasi pengujian keterulangan menggunakan <i>primers D-Loop Bos taurus</i> pada DNA Bakso Sapi 100% dengan metode RT PCR...	99
Tabel 19	Ringkasan Hasil Pengujian <i>Primers B, C, D dan E</i>	102

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Kriteria <i>Primers</i> dan Probe.....	137
Lampiran 2	Hasil Blast <i>Primers</i> Babi dari daerah <i>cyt b</i> mitokondria.....	137
Lampiran 3	Hasil Blast <i>Primers</i> Babi dari daerah <i>D-Loop</i> mitokondria.....	138
Lampiran 4	Hasil Blast <i>Primers</i> Sapi dari <i>D-Loop</i> mitokondria.....	138
Lampiran 5	Protokol Suhu <i>Primers</i> Babi <i>cyt b</i> mitokondria.....	139
Lampiran 6	Protokol Suhu <i>Primers</i> Babi <i>D-Loop</i> mitokondria.....	140
Lampiran 7	Protokol Suhu <i>Primers</i> Sapi <i>D-Loop</i> mitokondria.....	141
Lampiran 8	Protokol Suhu <i>Primers</i> Probe TaqMan Babi.....	141
Lampiran 9	Protokol Suhu <i>Primers</i> Probe TaqMan Sapi.....	142
Lampiran 10	Protokol Suhu <i>Primers</i> Duplex.....	142
Lampiran 11	Peralatan.....	143
Lampiran 12	Daftar Publikasi Hasil Penelitian Disertasi.....	143
Lampiran 13	Ringkasan Disertasi.....	144
Lampiran 14	<i>Summary</i>	164
Lampiran 15	<i>Journal of advanced veterinary and animal research</i>	187
Lampiran 16	<i>Food Research</i> 4(5): 1563-1568, Oktober 2020.....	193

DAFTAR SINGKATAN

A	: adenine
ATP	: adenosine triphosphate
BHQ-1	: Black Hole Quencher-1
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
C	: cytosine
CV	: coefficient of variation
Cq	: Quantification Cycle
Ct	: Treshold Cycle
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
dNTP	: dexyribonucleotide triphosphates
E	: efisiensi
EDTA	: ethylen diamine tetraasetic acid
ELISA	: enzyme linked immunosorbent assay
EtBr	: ethidium bromide
FAM	: Fluorescein Amidite
FT-IR	: Fourier Transform-Infra Red
G	: guanine
mtDNA	: DNA mitochondrial
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RFLP	: restriction fragment length polymorphism
RFU	: relative fluoesence unit
RNA	: ribonucleic acid
T	: thymine
Taq polymerase	: thermus aquaticus polymerase
Tm	: melting temperature
UV-Vis	: ultraviolet-visible