

Research Article

## Optimasi Kit Zeesan SARS-COV-2 Test Kit untuk Pengujian Deteksi DNA Porcine pada Produk Olahan Daging dan Produk Olahan Kompleks

*Optimization of Zeesan SARS-COV-2 Test Kit for Porcine DNA Detection Tests on Processed Meat Products and Complex Processed Product*

Tirta Setya Bhakti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan di Semarang, Jl Sukun Raya 41A Kota Semarang

\*email: [tirta\\_setya87@yahoo.com](mailto:tirta_setya87@yahoo.com)

**Kata Kunci:**

DNA Porcine  
Optimasi  
SARS-COV-2 Test Kit  
Zeesan

**Keywords:**

DNA Porcine  
Optimization  
SARS-COV-2 Test Kit  
Zeesan

**Submitted:** 28/04/2022

**Revised:** 30/05/2022

**Accepted:** 01/06/2022

**Abstrak.** Berbagai macam merek kit deteksi RNA covid 19 banyak digunakan oleh laboratorium pengujian covid 19. Salah satu kit tersebut adalah Zeesan SARS COV-2 Test Kit. Kit Zeesan tidak dapat digunakan untuk mendeteksi DNA porcine. Belum ada penelitian resmi penggunaan kit deteksi covid 19 yang dioptimasi untuk deteksi DNA porcine sehingga optimasi kit Zeesan SARS COV-2 Test Kit yang digunakan untuk mendeteksi DNA porcine adalah inovasi baru pada pengujian molekuler. Tujuan penelitian ini adalah mencari kombinasi yang tepat antara kit deteksi Zeesan SARS COV-2 Test Kit dengan *primer-probe porcine*. Kemudian mencari setting suhu yang sesuai untuk proses amplifikasi pengujian DNA porcine. Analisis menggunakan *real-time* PCR merek Liferiver dengan metode *hydrolysis probe*. Penelitian dilakukan dengan running 3 jenis sampel positif porcine dengan 3 konsentrasi berbeda. Sampel penelitian menggunakan sosis, ham, dan mie. Hasil penelitian menunjukkan kombinasi kit deteksi Zeesan SARS COV-2 Test Kit-*primer probe porcine* berhasil mendeteksi DNA porcine pada 3 sampel positif porcine konsentrasi 10 ng, dan 5 ng. Sedangkan pada konsentrasi 1 ng, hanya mampu dideteksi pada 2 sampel positif. Selain itu, penelitian ini menunjukkan waktu deteksi DNA porcine yang relatif lebih cepat dari beberapa penelitian sebelumnya.

**Abstract.** Various brands of covid 19 RNA detection kits are widely used by covid 19 testing laboratories. One of these kits is the Zeesan SARS COV-2 Test Kit. The Zeesan kit cannot be used to detect porcine DNA. There has been no official research on the use of optimized covid 19 detection kits for porcine DNA detection, thus the optimization of the Zeesan SARS COV-2 Test Kit used to detect porcine DNA is a new innovation in molecular testing. The purpose of this study was to find the right combination between the Zeesan SARS COV-2 Test Kit detection kit and the porcine primer-probe. Then look for the appropriate temperature setting for the amplification process for porcine DNA testing. Analysis using Liferiver brand real-time PCR with hydrolysis probe method. The study was conducted by running 3 types of positive porcine samples with

3 different concentrations. The research sample used sausage, ham, and noodles. The results showed that the combination detection kit of Zeesan SARS COV-2 Test Kit-primary probe porcine successfully detected porcine DNA in 3 positive samples of porcine with a concentration of 10 ng and 5 ng. Meanwhile, at a concentration of 1 ng, it could only be detected in 2 positive samples. In addition, this study showed a relatively faster detection time of porcine DNA than several previous studies.



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2021 by author.

## 1. PENDAHULUAN

Pandemi covid 19 membuat beberapa instansi berpartisipasi melakukan pengujian covid 19. Salah satunya laboratorium pengujian di Badan POM. Sebelumnya, pada bidang molekuler Badan POM berperan mengawasi kehalalan produk obat, suplemen kesehatan, kosmetik dan makanan. Hal ini sesuai dengan visi Badan POM dalam mewujudkan obat, dan makanan yang aman, bermutu, berdaya saing untuk mewujudkan Indonesia maju yang berdaulat, mandiri, dan berkepribadian berlandaskan gotong royong. Pengujian untuk mengawasi kehalalan produk ini menggunakan metode analisa yang sudah terverifikasi.

Pengawasan kehalalan barang beredar (*post market*) dilakukan sesuai perencanaan sampling, baik jenis komoditas ataupun kuantitas barang. Pengawasan berbasis resiko juga dilakukan untuk mengantisipasi jika terjadi kasus. Penggunaan reagen, alat, dan metode juga dipersiapkan dengan baik untuk menunjang proses pengujian.

Berbagai metode dapat dilakukan untuk menguji adanya kontaminasi kandungan babi pada produk, antara lain dengan identifikasi protein dengan teknik elektroforesis (Kim dan Shelef, 1986; Skarpeidet al., 1998), *liquid chromatography* (Ashoor *et al.*, 1998) dan *immunoassays* (Jones and Paterson, 1985; Hsieh *et al.*,

1998). Namun, metode ini memiliki kelemahan, karena protein akan kehilangan aktivitas biologinya setelah hewan mati, ditambah sifat protein yang labil dalam kondisi panas. Metode pendeteksi komponen babi dan turunannya berbasis DNA menggunakan RT-PCR, memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dibandingkan dengan metode lainnya (Handoyo, *et al.*, 2018). Pengujian kehalalan produk oleh Badan POM menggunakan metode PCR. Berbagai metode PCR digunakan sesuai dengan jenis sampel. Beberapa kelebihan dari metode tersebut antara lain sudah terverifikasi, dan menggunakan reagen, sampel dengan volume yang relatif kecil. Adapun kekurangan metode tersebut, yaitu menggunakan komposisi reagen yang relatif banyak sehingga berpengaruh terhadap biaya pengujian. Kemudian waktu pengujian sedikit lebih lama.

Ada beberapa protokol amplifikasi deteksi *porcine* (babi), antara lain dengan program seperti: pre denaturasi suhu 95°C selama 5 menit; denaturasi suhu 95°C selama 30 detik; *annealing* suhu 60°C selama 45 detik; ekstensi suhu 72°C selama 1 menit sebanyak 35 siklus menggunakan thermocycler Biorad (Sari, 2017). Ada juga protokol amplifikasi dengan program *holding* 95°C selama 2 menit pre denaturasi suhu 95°C selama 10 menit; denaturasi suhu 95°C selama 15 detik; *annealing* suhu 60°C

selama 60 detik sebanyak 40 siklus (Widayat, 2019).

Belum ada penelitian resmi tentang optimasi kit deteksi covid 19 yang dimanfaatkan untuk mendeteksi DNA porcine. Banyak laboratorium yang menggunakan kit deteksi covid 19 merk Zeesan SARS COV-2. Kit ini berpotensi digunakan untuk mendeteksi DNA target porcine. Tujuan penelitian adalah menemukan komposisi yang tepat antara kit mastermix Zeesan SARS COV-2 Test Kit dan primer-probe porcine, dan mencari siklus suhu PCR yang sesuai untuk pengujian DNA porcine. Optimasi kit deteksi covid 19 untuk mendeteksi DNA porcine merupakan inovasi baru dalam pengujian molekuler.

## 2. METODE

### 2.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif yang membandingkan nilai CT sampel dengan nilai CT kontrol positif *porcine* yang teramplifikasi. Sampel menggunakan 3 jenis sampel positif *porcine*; sosis, ham, dan mie. Kontrol positif memakai daging *porcine* yang sudah diekstraksi. Sampel negatif menggunakan sampel yang mengandung DNA ayam. Reagen deteksi yang digunakan pada penelitian ini adalah kit *master-mix* Zeesan® SARS COV-2 Test Kit. *Primer-probe porcine* dari Applied Biosystem®. Kit ekstraksi sampel menggunakan Qiagen® DNeasy Mericon Food Kit.

### 2.2. Prosedur Penelitian

#### *Preparasi Sampel*

Sampel ditimbang 1 gr, kemudian di tambahkan 10 mL *Food Lysis Buffer* dan 25 µl proteinase K, divortex 1 menit. Kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 45 menit, sambil dihomogenkan menggunakan

*shaker* dengan kecepatan 25 rpm. Kemudian suhu sampel diturunkan dengan cara didiamkan selama 2 menit. Lalu vortex 30 detik dan dimasukkan ke dalam *ice block* selama 10 menit,

Vortex kembali 10 detik. Sampel disentrifugasi kecepatan 2500xg selama 5 menit. Sampel kemudian akan terbentuk 2 fase, Pipet 800 µl *chloroform* ke dalam tube 2 ml yang baru, dengan hati-hati, pindahkan 800 µl lapisan bening tanpa menyentuh presipitasi yang terjadi didasar tube. Masukkan ke dalam tube yang berisi 800 µl *chloroform* dan di vortex 15 detik lalu sentrifuge kecepatan 14000xg selama 20 menit. Ambil 500 µl lapisan bening kemudian dimasukkan ke tube 2 ml yang baru. Tambahkan buffer PB 600 µl, vortex 15 detik dan *spindown* 3 detik. Sebanyak 650 µl cairan tersebut dipipet ke dalam spin column. Lalu sentrifugasi 14000xg selama 30 detik. Ulangi kembali sampai cairan sampel habis. Sebanyak 500 µl buffer AW2 ditambahkan ke dalam *spin column* sebanyak 2 kali. Selanjutnya diletakkan pada *collection tube*, lalu disentrifugasi kecepatan 14000xg untuk mengeringkan membran. Selanjutnya *collection tube* dibuang dan spin column ditempatkan pada tube 1,5/ 2 ml yang baru. Tambahkan 60 ul buffer EB, diamkan 5 menit untuk menarik DNA hasil ekstraksi.

#### *Preparasi Seri Kadar Konsentrasi Sampel Hasil Ekstraksi*

Hasil ekstraksi sampel dibuat menjadi 3 seri konsentrasi 10 ng, 5 ng, dan 1 ng. Kontrol positif menggunakan konsentrasi, 10 ng. Sampel negatif menggunakan DNA ayam. Pengukuran konsentrasi menggunakan alat Implen N50, lalu diencerkan. Penelitian ini juga menggunakan kontrol *mastermix*, dan kontrol negatif dari NFW.

### Analisis Data

Analisis menggunakan *thermocycler* merk Liferiver®, metode *hydrolysis probe*. Pengukuran kemurnian dan konsentrasi sampel menggunakan nanophotometer NP50 (IMPLEN), setting metode; Nucleid acid, type dsDNA, mode nano volume, volume sampel 2 $\mu$ L, *nucleid acid factor* 50.00, *background correction* 320 nm, air *bubble recognition off*, manual *dilution factor* 1.000. Analisis data dilakukan dengan melihat hasil kurva amplifikasi, dan sampel yang naik memotong garis *threshold*.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Data Komposisi Kit Deteksi

Data komposisi optimasi kit deteksi Zeesan SARS COV2 Test Kit dengan primer-probe porcine disajikan secara rinci pada Tabel 1 berikut.

**Tabel 1.** Daftar Komposisi Mastermix

No.	Bahan	Merk	Vol
1	RT PCR-Mix	Zeesan	9 $\mu$ l
2	Enzym	Zeesan	2 $\mu$ l

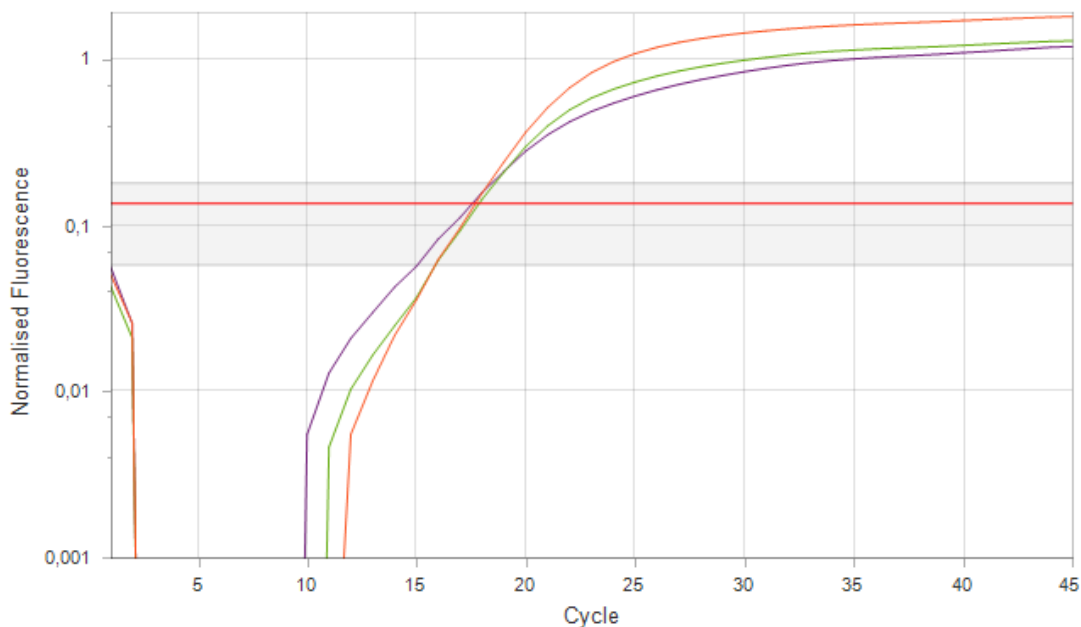
3	Primer-F 7,5 $\mu$ M	AB	2 $\mu$ l
4	Primer-R 7,5 $\mu$ M	AB	2 $\mu$ l
5	Probe 5 $\mu$ M	AB	2 $\mu$ l
6	Sampel		8 $\mu$ l

### 3.2. Konfigurasi Suhu Siklus PCR pada *Thermocycler Liferiver*

Konfigurasi amplifikasi pada mesin *thermocycler* yang sesuai untuk *running* hasil optimasi tersebut adalah: Hold 50°C selama 2 menit. *Hold* aktivasi enzim *Taq polymerase* 95°C selama 7 menit. Dilanjutkan dengan 45 siklus pada kondisi denaturasi 95°C selama 15 detik. Penempelan primer 60°C selama 1 menit. *Reporter dye* gen target *porcine* menggunakan FAM.

### 3.3. Hasil Amplifikasi Kontrol Positif

Hasil amplifikasi DNA *porcine* pada sampel kontrol positif disajikan secara rinci dalam bentuk kurva pada Gambar 1 berikut.



**Gambar 1.** Kurva hasil amplifikasi kontrol positif konsentrasi 10 ng (3x ulangan)

Analisa hasil amplifikasi kontrol positif berupa CT dan efisiensi PCR dapat dilihat dari hasil analisis mesin *thermocycler* seperti pada Tabel 2.

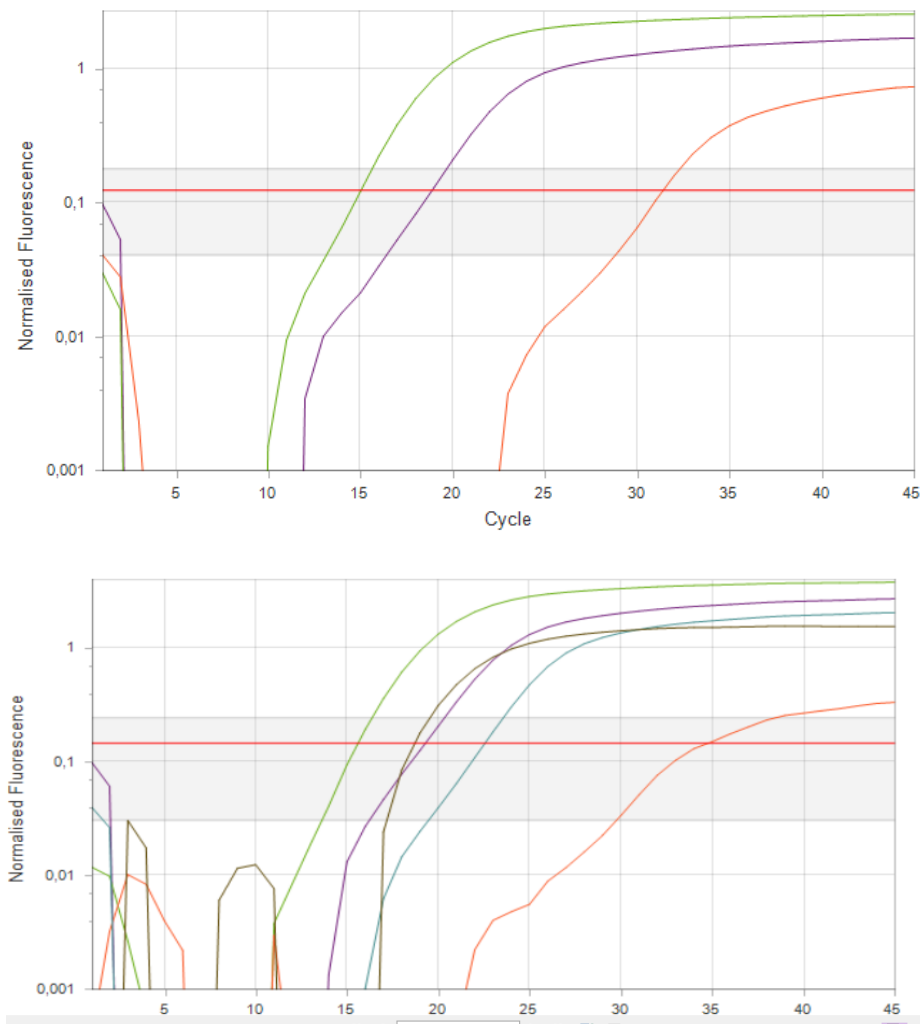
**Tabel 2.** Analisa qPCR kontrol positif

No.	Nama	CT	efisiensi (R <sup>2</sup> )
1	K1(ulangan 1)	17, 52	0,99851
2	K1(ulangan 2)	17, 85	0,99958

3	K1(ulangan 3)	17, 65	0,99966
---	---------------	--------	---------

**3.4. Hasil Amplifikasi Sampel Positif**

Hasil amplifikasi sampel positif *porcine* pada konsentrasi 10 ng, 5 ng, dan 1 ng disajikan secara rinci dalam bentuk kurva pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Kurva hasil amplifikasi sampel positif sosis, ham, dan mie konsentrasi 10 ng, 5 ng, dan 1 ng

Analisa hasil amplifikasi sampel positif konsentrasi 10 ng berupa CT dan efisiensi PCR dapat dilihat dari hasil analisis mesin thermocycler seperti pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Analisa qPCR sampel positif

No.	Nama	CT	efisiensi (R <sup>2</sup> )
1	Sosis (ungu)	18, 85	0,99989
2	Ham (hijau)	15, 02	0,99975
3	Mie (merah)	31, 35	0,99942

Analisa hasil amplifikasi sampel positif konsentrasi 5 ng dan 1 ng berupa CT dan efisiensi PCR dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Analisa qPCR sampel positif

No.	Nama	CT	efisiensi (R <sup>2</sup> )
1	Sosis 5ng (ungu)	19, 23	0,99962
2	Ham 5ng (hijau)	15, 51	0,99830
3	Mie5ng (oranye)	34, 71	0,99942
4	Sosis 1ng (biru)	22, 48	0,99983
5	Ham1g(cokelat)	-	-
6	Sampel negatif 5 ng(biru muda)	-	-
7	Sampel negatif 5 ng(ungu muda)	-	-
8	Kontrol MM (cokelat)	-	-
9	Kontrol MM (cokelat muda)	-	-
10	Kontrol NFW (ungu)	-	-
11	Kontrol NFW (merah muda)	-	-

### 3.5. Pembahasan

Nilai CT hasil amplifikasi dari 3 kontrol positif konsentrasi 10 ng adalah 17,52; 17,85; dan 17,65. Sedangkan CT dari sampel positif sosis, ham, dan mie konsentrasi 10 ng adalah 18,85; 15,02; dan 31,35. CT dari sampel positif konsentrasi 5

ng adalah 19,23; 15,51; dan 34,71. Sampel positif konsentrasi 1 ng muncul pada CT 22,48 dan 18,63. Pada konsentrasi ini, sampel positif mie 1 ng tidak terdeteksi gen target *porcine*. Adanya *inhibitor* pada sampel positif mie berpengaruh terhadap konsentrasi dan kemurnian DNA. Hal ini juga terlihat dari munculnya CT pada sampel mie konsentrasi 10 ng, dan 5 ng yang muncul di atas 30, yaitu 31, 35 dan 34, 71. Nilai CT <29 menunjukkan kadar asam nukleat dalam jumlah banyak, sedangkan CT >30 menunjukkan kadar asam nukleat dalam jumlah sedang (Tom, et all 2020). Pemilihan metode ekstraksi dan jenis kit ekstraksi yang tepat dapat menghasilkan konsentrasi dan kemurnian DNA yang lebih baik. Selain itu, pengenceran sampel juga bisa dilakukan untuk menghilangkan *inhibitor* pada sampel. Contoh produk DNA yang mengandung DNA rendah antara lain mie, gelatin, dan *marshmallow*. Pemanfaatan kit deteksi covid 19 merek zeesan ini terbukti efektif mampu melakukan amplifikasi DNA porcine. Waktu pengujian juga relatif lebih cepat dari beberapa penelitian sebelumnya karena holding time aktivasi enzim yang relatif lebih singkat.

Terdapat 2 parameter verifikasi metode deteksi DNA secara kualitatif, yaitu koefisien regresi (R<sup>2</sup>) dan efisiensi PCR, dan *Limit of Detection* (LOD) (P30MN, Badan POM 2018). Tiap jenis sampel dihitung efisiensi PCR sesuai Tabel 5 dan 6. Rumus efisiensi dapat dihitung dengan:

$$Efficiency : (10^{(-\frac{1}{slope})} - 1) \times 100$$

**Tabel 5. Analisa efisiensi PCR**

Nama	Log Dilution factor
Sosis 0,5 (20ng ke 10ng)	-0,301029996
Sosis 0,25 (20ng ke 5ng)	-0,602059991
Sosis 0,05 (20ng ke 1ng)	-1,301029996
Ham 0,5 (20ng ke 10ng)	-0,301029996
Ham 0,25 (20ng ke 5ng)	-0,602059991
Ham 0,05 (20ng ke 1ng)	-1,301029996
Mie 0,5 (20ng ke 10ng)	-0,301029996
Mie 0,25 (20ng ke 5ng)	-0,602059991

**Tabel 6. Analisa efisiensi PCR**

Nama	Measured CT	PCR efficiency
Sosis (20ng ke 10ng)	18,85	
Sosis (20ng ke 5ng)	19,23	
Sosis (20ng ke 1ng)	22,48	83,018
Ham (20ng ke 10ng)	15,02	
Ham (20ng ke 5ng)	15,51	
Ham (20ng ke 1ng)	18,63	86,012
Mie (20ng ke 10ng)	31,35	
Mie ( 20ng ke 5ng)	34,71	22,91

Kriteria keberterimaan efisiensi PCR untuk produk olahan adalah 75-110 % (JRC, 2015; JRC, 2016). Efisiensi sampel sosis adalah 83,01%, sampel ham 86,012%, dan mie 22,910%. Hal ini membuktikan bahwa komposisi *mastermix* yang dipakai sudah tepat. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi akan menurunkan aktivitas polimerase DNA yang akan berdampak pada efisiensi PCR, merusak DNA *template*, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan proses denaturasi DNA *template* tidak sempurna (Handoyo, et al. 2001). Efisiensi PCR produk sosis dan ham masih masuk dalam kriteria persyaratan. Namun pada produk mie, nilai efisiensi PCR belum memenuhi persyaratan. Rendahnya efisiensi sampel mie dapat disebabkan metode ekstraksi yang digunakan kurang tepat. Untuk itu

masih perlu dilakukan optimasi metode ekstraksi untuk mendapatkan konsentrasi dan kemurnian DNA yang lebih baik. Pada penelitian selanjutnya, ekstraksi sampel yang telah mengalami proses kompleks dalam pembuatannya sebaiknya menggunakan kit yang penimbangan sampelnya besar atau pengambilan supernatannya lebih banyak. Dengan demikian peluang terambilnya DNA dalam sampel lebih besar. Seperti sudah dijelaskan sebelumnya proses pembuatan yang kompleks berpotensi merusak DNA yang terkandung di dalamnya sehingga jumlahnya menurun atau untai DNA menjadi lebih pendek sehingga lebih sulit dideteksi. Pembahasan koefisien regresi (R<sup>2</sup>), dan LOD tidak dilakukan karena penelitian ini bersifat kualitatif yang membandingkan nilai CT pada sampel

dengan nilai CT pada kontrol positif. Selain itu diperlukan data yang lebih banyak untuk menghitung analisa regresi dan LOD.

Pada kontrol *mastermix*, dan kontrol NFW setelah diamplifikasi tidak menunjukkan munculnya kurva amplifikasi. Hal ini menunjukkan tidak adanya kontaminasi pada saat pengujian. Pada kontrol sampel negatif juga tidak menunjukkan munculnya kurva amplifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi kit Zeesan SARS COV-2 Test Kit dengan primer-probe porcine hanya sensitif mendeteksi fragmen DNA porcine.

#### 4. KESIMPULAN

Optimasi kit Zeesan SARS COV-2 Test Kit dengan kombinasi primer-probe porcine, pada setting siklus PCR yang sesuai dapat digunakan untuk mendeteksi kandungan DNA porcine pada sampel produk olahan daging. Kadar DNA porcine yang dapat terdeteksi berada pada konsentrasi 1 ng/ul.

#### Daftar Pustaka

Ashoor, S., Monte, W., & Stiles, P. (1998). Liquid chromatographic identification of meats. *J Assoc Off Anal Chem.* 71, 397-403.

Clspedes, A., Garcia, T., Cerrera, E., Gonzales, I., Fernandez, A., Hernandez, P., & Martin, R. (1999). Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5s rDNA gene. *J Agric Food Chem.* 47, 1046-1050.

European Network of GMO Laboratories. (2015). Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing, European Commission Joint Research

Centre. Institute for Health and Consumer Protection.

- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Recation (PCR). In P. S. Bioteknologi, General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction (pp. Vol. 9, No. 1 17-29). Unitas.
- Jones, SI., & Paterson, R. (1985). Double antibody ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. *Meat Sci.* 15, 1-13.
- Kim, H., & LA, S. (1986). Characterization and identification of raw beef, pork, and chicken and turkey meats by their sarcoplasmis protein electrophoretic patterns. *J food Set*, 51, 731-741.
- Sari, F. (2017). Identifikasi Spesies Babi pada Produk Pangan Asal Hewan di Pasar Tradisional Provinsi Riau dengan metode Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Riau Biologia* 2 (1), 55-60.
- The sub-working group "Validation of real-time PCR methods". (2016). Guidelines for the single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods. Bundesamt Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL).
- Tom, M. R., & Mina, M. J. (2020). to Interpret the SARS Cov-2 test, consider the Cycle Threshold Value sample. *Clinical Infectious Diseases*, ciaa619, DDI:1.0.
- Yusuf, Z. K. (2010). Polymerase Chain Reaction (PCT). *Saintek.* 5(6).