

RSNI3

Rancangan Standar Nasional Indonesia 3

Metode deteksi DNA spesifik babi pada produk pangan mengandung gelatin — Metode kualitatif *real-time* PCR menggunakan *hydrolysis probe*

“Apabila diketahui RSNI ini mengandung kekayaan intelektual, pihak yang berkepentingan diminta untuk memberikan informasi beserta data pendukung (pemilik kekayaan intelektual, bagian yang terkena kekayaan intelektual, alamat pemberi kekayaan intelektual, dan lain-lain).”

Daftar isi

Daftar isi	i
Prakata	ii
Pendahuluan	iii
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Prinsip	1
5 Bahan dan pereaksi	2
5.1 Bahan	2
5.2 Pereaksi	2
6 Peralatan	2
7 Prosedur	3
7.1 Persiapan sampel uji	3
7.2 Ekstraksi DNA	4
7.3 Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA	5
7.4 Amplifikasi DNA	6
7.5 Kontrol pengujian	7
8 Interpretasi hasil dan kriteria keberterimaan	7
9 Status validasi	8
10 Jaminan mutu pengujian	8
11 Pelaporan hasil	9
Lampiran A (informatif) Sekuens gen sitokrom b (cyt b)	10
Lampiran B (informatif) Sekuens kontrol positif DNA dan gen target babi	11
Lampiran C (normatif) Prosedur pembuatan larutan bufer lisis A	12
Lampiran D (informatif) Hasil validasi <i>single laboratory</i> dan uji kolaborasi	13
Bibliografi	18

Prakata

SNI XXXX:20XX, *Metode deteksi DNA spesifik babi pada produk pangan mengandung gelatin — Metode kualitatif real-time PCR menggunakan hydrolysis probe*, yang dalam bahasa Inggris berjudul *Method for detecting specific porcine DNA in food products containing gelatin — Qualitative real-time PCR method using hydrolysis probe*, merupakan standar baru yang disusun dengan jalur pengembangan sendiri dan ditetapkan oleh Badan Standardisasi Nasional (BSN) tahun 20XX.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 19-07, Metode Uji Biomolekuler dan Bioteknologi. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 2 September 2024 di Jakarta secara telekonferensi, yang dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholders*) terkait, yaitu perwakilan dari pemerintah, pelaku usaha, konsumen dan pakar. Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal sampai dengan dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari Standar ini dapat berupa hak kekayaan intelektual. Namun selama proses perumusan SNI, Badan Standardisasi Nasional telah memperhatikan penyelesaian terhadap kemungkinan adanya hak kekayaan intelektual terkait substansi SNI. Apabila setelah penetapan SNI masih terdapat permasalahan terkait hak kekayaan intelektual, Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggung jawab mengenai bukti, validitas dan ruang lingkup hak kekayaan intelektual tersebut.

Pendahuluan

Produk berbahan gelatin umumnya mengandung DNA dengan konsentrasi sangat rendah dan inhibitor yang tinggi, sehingga dibutuhkan metode uji yang sensitif, spesifik, dan konsisten dalam mendeteksi kandungan cemaran atau residu babi. Hal ini disebabkan matriks gelatin yang mengandung DNA dalam konsentrasi rendah dan mengandung inhibitor akan menghambat reaksi amplifikasi. Dengan demikian dibutuhkan teknik ekstraksi yang memadai untuk memperoleh DNA sebanyak mungkin kemudian memurnikannya. Jumlah DNA yang cukup dan tidak mengandung inhibitor tinggi menentukan keberhasilan amplifikasi DNA target yang terdapat dalam sampel.

Standar ini disusun dalam rangka menyediakan standar metode uji untuk mendeteksi kandungan DNA babi dengan konsentrasi rendah pada produk mengandung gelatin dengan menggunakan instrumen *real-time* PCR. Standar ini dapat dijadikan acuan dalam kegiatan pengawasan *pre market* maupun *post market* yang dilakukan oleh regulator yang berwenang.

Standar ini disusun dengan memperhatikan ketentuan peraturan perundang-undangan sebagai berikut:

1. Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan;
2. Undang-Undang Nomor 33 Tahun 2014 tentang Jaminan Produk Halal;
3. Peraturan Pemerintah Nomor 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan;
4. Peraturan Pemerintah Nomor 86 Tahun 2019 tentang Keamanan Pangan;
5. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 2021 tentang Penyelenggaraan Bidang Jaminan Produk Halal;
6. Peraturan Badan POM Nomor HK.03.1.23.06.10.5166 Tahun 2010 tentang Pencantuman Informasi Asal Bahan Tertentu, Kandungan Alkohol dan Batas Kedaluwarsa pada Penandaan/Label Obat, Obat Tradisional, Suplemen Makanan dan Pangan;
7. Peraturan Badan POM Nomor 31 Tahun 2018 tentang Label Pangan Olahan beserta perubahannya, yaitu Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 20 Tahun 2021 tentang Perubahan atas Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 31 Tahun 2018 tentang Label Pangan Olahan dan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 6 Tahun 2024 tentang Perubahan Kedua atas Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 31 Tahun 2018 tentang Label Pangan Olahan.

Metode deteksi DNA spesifik babi pada produk pangan mengandung gelatin — Metode kualitatif *real-time* PCR menggunakan *hydrolysis probe*

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode ekstraksi dan amplifikasi untuk mendeteksi DNA spesifik babi dengan konsentrasi rendah pada produk pangan mengandung gelatin, termasuk kapsul yang digunakan untuk pengemas pangan fungsional, secara kualitatif menggunakan *real-time* PCR.

Fragmen gen yang digunakan sebagai sekuens target adalah fragmen gen *cytochrome b* (cyt b)^[3] yang merupakan DNA mitokondria (*GenBank accession number* AM492637.1 sesuai Gambar A.1 pada Lampiran A). DNA mitokondria bersifat *multicopy* sehingga dapat memperbesar peluang deteksi (sensitifitas) DNA babi. Dalam hal meningkatkan spesifisitas, amplifikasi dilakukan menggunakan *hydrolysis probe*.

2 Acuan normatif

Dokumen acuan berikut sangat diperlukan untuk penerapan Standar ini. Untuk acuan bertanggung, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan tidak bertanggung, berlaku edisi terakhir dari dokumen acuan tersebut (termasuk seluruh perubahan/amendemennya).

SNI ISO 16577, *Analisis biomarker molekuler — Istilah dan definisi*

SNI ISO 20813, *Analisis biomarker molekuler — Metode analisis untuk deteksi dan identifikasi spesies hewan pada pangan dan produk pangan (metode berbasis asam nukleat) — Persyaratan umum dan definisi*

SNI ISO 21571, *Bahan pangan — Metode analisis untuk deteksi produk rekayasa genetik dan produk turunannya — Ekstraksi asam nukleat*

SNI ISO 24276, *Bahan pangan — Metode analisis untuk deteksi organisme hasil rekayasa genetika dan produk turunannya — Persyaratan umum dan definisi*

SNI ISO/IEC 17025, *Persyaratan umum kompetensi laboratorium pengujian dan kalibrasi*

ISO 21569, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods*

3 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi yang terdapat dalam SNI ISO 16577, SNI ISO 24276, SNI ISO 21571, dan ISO 21569 berlaku.

4 Prinsip

Ekstraksi DNA sampel dilakukan dengan 2 (dua) tahap, yaitu mengumpulkan DNA sebanyak mungkin dari sampel (*pooling method*) kemudian memurnikan DNA dari inhibitor yang mungkin terbawa saat proses ekstraksi. Selanjutnya ditentukan kualitas dan kuantitas DNA hasil ekstraksi. DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan *primer* cyt b spesifik babi dan pelacak berbasis *hydrolysis probe* menggunakan metode *real-time* PCR.

5 Bahan dan pereaksi

5.1 Bahan

5.1.1 Sampel dari produk pangan berbahan gelatin.

5.1.2 Kontrol positif DNA babi (lihat Lampiran B.1).

5.2 Pereaksi

5.2.1 Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pereaksi sebagai berikut.

5.2.1.1 Air bebas *nuclease*.

5.2.1.2 Bufer lisis CTAB, selanjutnya disebut bufer lisis A, disiapkan sesuai dengan Lampiran C.

5.2.1.3 Etanol 96% sampai dengan 100% pro analisis (p.a.).

5.2.1.4 Protease 7,5 AU/7 ml.

5.2.1.5 Bufer lisis mengandung guanidin hidroklorida 36% sampai dengan 50% , selanjutnya disebut bufer lisis B.

5.2.1.6 Bufer mengandung guanidin hidroklorida 50% sampai dengan 70%, selanjutnya disebut bufer C.

5.2.1.7 Bufer mengandung guanidin hidroklorida 36% sampai dengan 50% dan 2-propanol 20% sampai dengan 50%, selanjutnya disebut bufer D.

5.2.1.8 Bufer pencuci mengandung etanol 70%.

5.2.1.9 Bufer elusi Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM dengan pH 8,0.

5.2.1.10 Larutan amonium asetat 7,5 M

5.2.1.11 Larutan pembersih *DNAse* atau HCl 0,1 N atau sodium hipoklorit 10% (*bleach* yang mengandung 3% klorin aktif).

Ekstraksi dapat menggunakan kit ekstraksi DNA yang tersedia secara komersial dengan memastikan bahwa kit tersebut memiliki minimal kandungan bahan yang tercantum pada 5.2.1.4 sampai 5.2.1.9, sehingga mampu untuk mendapatkan DNA dari sampel yang diuji.

5.2.2 Satu set *primer* dan *probe* (lihat Lampiran B.2).

6 Peralatan

6.1 Peralatan preparasi sampel (misalnya gunting, pinset, spatula).

6.2 Timbangan analitik.

6.3 Pipet mikro berbagai ukuran, mulai dari 1 µl hingga 1.000 µl.

6.4 Pipet sekali pakai (*disposable pipette*) berukuran 10 ml.

- 6.5 *Tip* pipet (sebaiknya berfilter) ukuran 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1.000 µl, dan 10 ml.
- 6.6 Tabung polipropilena, direkomendasikan yang tebal dan tahan panas, berukuran 50 ml.
- 6.7 Tabung mikro *centrifuge* steril ukuran 1,5 ml dan 2 ml.
- 6.8 Tabung *centrifuge* steril ukuran 50 ml.
- 6.9 *Plate* PCR 96 reaksi atau tabung PCR.
Plate PCR direkomendasikan jika menggunakan *platform* PCR berbasis *block*, sedangkan tabung PCR direkomendasikan jika menggunakan *platform* PCR berbasis rotor.
- 6.10 Rak pendingin tabung mikro.
- 6.11 Kolom *maxi membrane cellulose* ukuran 50 ml yang dilengkapi dengan tabung penampung berukuran 50 ml.
- 6.12 Kolom *mini membrane cellulose* ukuran 2 ml yang dilengkapi dengan tabung penampung berukuran 2 ml.
- 6.13 *Freezer*, memiliki kemampuan untuk menyimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.14 *Centrifuge* untuk tabung 1,5 ml, 2 ml, dan 50 ml.
- 6.15 *Centrifuge* untuk *plate* PCR (jika menggunakan platform PCR berbasis *block*).
- 6.16 Mikser (misalnya Vortex^{®1}) dan mini *centrifuge*.
- 6.17 Inkubator putar (*rotary incubator*) atau *waterbath shaker*.
- 6.18 *Vacuum manifold system* (opsional).
- 6.19 *Thermoblock/thermomixer*.
- 6.20 Spektrofotometer UV DNA atau fluorometer DNA.
- 6.21 Instrumen elektroforesis (opsional).
- 6.22 *Real time PCR thermal cycler*.

7 Prosedur

7.1 Persiapan sampel uji

Preparasi sampel uji sesuai dengan SNI ISO 20813 dan SNI ISO 21571.

¹ Vortex merupakan contoh produk yang sesuai yang tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna dokumen ini dan bukan merupakan dukungan dari Badan Standardisasi Nasional atas produk ini. Produk yang setara dapat digunakan jika dapat dibuktikan memberikan hasil yang sama.

Sampel uji berupa kristal gelatin ditempatkan dalam wadah steril hingga terisi satu per tiga bagian, kemudian dihomogenkan dengan cara dikocok/dibolak-balik. Sampel uji lain misalnya berupa *marsmallow* dicuplik secara acak dan digunting menggunakan gunting steril. Sampel uji berupa kapsul dicuplik secara acak.

7.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA yang dilakukan harus mengikuti setiap langkah kerja yang dituangkan dalam prosedur ekstraksi DNA pada Standar ini. Jika proses ekstraksi DNA dilakukan menggunakan kit yang tersedia secara komersial, maka prosedur kerja ekstraksi DNA harus mengikuti setiap tahapan pada Standar ini.

7.2.1 Masukkan 3 g sampel uji (5.1.1) yang telah homogen atau yang dicuplik secara acak ke dalam tabung *centrifuge* 50 ml steril.

7.2.2 Tambahkan 1,4 ml air bebas *nuclease* (5.2.1.1) dan campur hingga homogen. Tambahkan 600 µl protease (5.2.1.4) kemudian campur sempurna dengan cara membolak-balikkan tabung, kemudian homogenkan.

7.2.3 Inkubasi campuran pada suhu 45 °C selama 45 menit menggunakan inkubator putar dengan kondisi goyang atau menggunakan *waterbath shaker*.

7.2.4 Pipet dan tambahkan 10 ml bufer lisis A (5.2.1.2) ke dalam campuran, kemudian campur sempurna dengan cara membolak-balikkan tabung, kemudian homogenkan.

7.2.5 Inkubasi campuran pada suhu 65 °C selama 60 menit menggunakan inkubator putar dengan kecepatan putar 35 r/min.

7.2.6 Lakukan sentrifugasi campuran dengan percepatan putar $4.000 \times g$ selama 10 menit.

7.2.7 Pipet seluruh supernatan dan pindahkan ke dalam tabung *centrifuge* 50 ml steril. Setelah itu tambahkan 15 ml bufer lisis B (5.2.1.5).

7.2.8 Bolak-balikkan tabung hingga campuran homogen, kemudian inkubasi pada suhu 65 °C selama 30 menit menggunakan inkubator putar dengan kecepatan putar 35 r/min.

7.2.9 Tambahkan 15 ml etanol 96% p.a. (5.2.1.3) ke dalam campuran yang masih dalam keadaan hangat, kemudian bolak-balikkan tabung secara perlahan. Tambahkan 5 ml bufer C (5.2.1.6), bolak-balikkan tabung secara perlahan.

7.2.10 Tuang campuran ke dalam kolom *maxi* yang telah terpasang pada *vacuum manifold system*, kemudian nyalakan perangkat vakum tersebut. Jika tidak terdapat perangkat vakum, proses ini dapat dilakukan dengan cara memipet 15 ml campuran ke dalam kolom *maxi* yang telah dipasang pada tabung penampung, kemudian lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar $3.000 \times g$ selama 0,5 menit sampai dengan 1 menit. Ulangi tahap ini hingga campuran habis.

7.2.11 Tambahkan 10 ml bufer C (5.2.1.6) ke dalam kolom *maxi* kemudian vakum menggunakan *vacuum manifold system* atau lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar $3.000 \times g$ selama 30 detik.

7.2.12 Tambahkan 10 ml bufer pencuci (5.2.1.8) ke dalam kolom *maxi* kemudian vakum menggunakan *vacuum manifold system*, atau lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar $3.000 \times g$ selama 30 detik.

7.2.13 Pindahkan kolom *maxi* ke tabung penampung dan lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar $4.000 \times g$ selama 3 menit.

7.2.14 Pipet 1 ml bufer elusi (5.2.1.9) yang telah dihangatkan pada suhu 65°C dan teteskan tepat di tengah kolom *maxi*, kemudian inkubasi kolom *maxi* menggunakan inkubator/*waterbath* pada suhu 65°C selama 5 menit.

7.2.15 Lakukan sentrifugasi kolom *maxi* dengan percepatan putar $4.000 \times g$ selama 10 menit.

7.2.16 Buang kolom *maxi* dan tambahkan 3 ml bufer D (5.2.1.7) pada tabung penampung yang mengandung DNA, kemudian bolak-balikkan tabung secara perlahan agar campuran menjadi homogen.

7.2.17 Tambahkan 50 μl amonium asetat 7,5 M (5.2.1.10) ke dalam campuran kemudian bolak-balikkan tabung secara perlahan.

7.2.18 Pindahkan campuran ke dalam kolom *mini* kemudian vakum. Jika tidak terdapat vakum, proses ini dapat dilakukan dengan memipet 650 μl campuran ke kolom *mini* kemudian lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar $10.000 \times g$ selama 30 detik. Ulangi tahap ini hingga campuran habis.

7.2.19 Cuci kolom *mini* dengan 750 μl bufer pencuci (5.2.1.8), kemudian vakum. Jika vakum tidak tersedia, proses ini dapat dilakukan dengan cara memipet 650 μl bufer pencuci (5.2.1.8) ke kolom *mini* yang sudah dimasukkan ke tabung penampung. Kemudian lakukan sentrifugasi dengan percepatan putar $10.000 \times g$ selama 30 detik. Buang cairan di dalam tabung penampung. Ulangi prosedur pencucian satu kali.

7.2.20 Lakukan sentrifugasi kolom *mini* dengan percepatan putar $10.000 \times g$ selama 3 menit.

7.2.21 Pindahkan kolom *mini* ke dalam tabung *centrifuge* 1,5 ml steril, kemudian tambahkan 50 μl bufer elusi (5.2.1.9) tepat di tengah kolom.

7.2.22 Inkubasi kolom *mini* menggunakan *thermomixer/thermoblock* pada suhu 65°C selama 5 menit, setelah itu lakukan sentrifugasi kolom *mini* dengan percepatan putar $13.000 \times g$ selama 5 menit.

7.2.23 Pisahkan larutan DNA menjadi dua tabung berukuran 1,5 ml. Isi tabung pertama dengan 15 μl larutan DNA untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer UV DNA serta elektroforesis atau fluorometer DNA. Kemudian isi tabung kedua dengan 35 μl larutan DNA untuk amplifikasi.

7.2.24 Simpan larutan DNA pada suhu -20°C apabila tidak langsung digunakan.

7.3 Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA

Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi dilakukan untuk mengetahui kuantitas dan kualitas DNA yang akan digunakan untuk amplifikasi. Konsentrasi DNA ditentukan dengan mengukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV DNA pada panjang gelombang 260 nm atau menggunakan fluorometer DNA. Kemurnian DNA ditentukan menggunakan spektrofotometer UV DNA dengan membandingkan serapan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan dua konsentrasi DNA cetakan. Konsentrasi DNA yang digunakan adalah maksimum 40 ng/ μl dan 25% dari ≤ 40 ng/ μl .

Integritas DNA hasil ekstraksi dapat dianalisis menggunakan elektroforesis agarosa 1% (opsional).

7.4 Amplifikasi DNA

7.4.1 Komposisi *master mix* PCR

Amplifikasi dilakukan menggunakan *real-time PCR* terhadap DNA sampel yang mengandung DNA target.

Tiap kali pengujian sebaiknya ditambahkan minimal 10% dari total reaksi untuk mengantisipasi kesalahan pipet.

Komposisi *master mix* PCR disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 — Komposisi *master mix* PCR

Pereaksi	Konsentrasi akhir	Volume (µl)
2× <i>master mix</i> PCR	1×	12,5
cyt b babi <i>forward primer</i> 7,5 µM	300 nM	1
cyt b babi <i>reverse primer</i> 7,5 µM	300 nM	1
cyt b babi <i>probe</i> 5 µM	200 nM	1
air bebas <i>nuclease</i>	-	4,5
DNA cetakan maksimum 40 ng/µl dan 25% dari ≤ 40 ng/µl	-	5
Total volume	-	25

7.4.2 Prosedur pembuatan *master mix* PCR

Pembuatan *master mix* dilakukan dengan cara mencampur pereaksi dalam tabung mikro *centrifuge* 1,5 ml atau 2 ml. Homogenkan menggunakan mikser selama 2 detik sampai dengan 3 detik dan lakukan sentrifugasi dengan *mini centrifuge*.

Pipet 20 µl *master mix* ke dalam tabung PCR atau sumur-sumur pada *plate PCR*.

Tambahkan 5 µl DNA hasil ekstraksi, jika menggunakan mesin PCR berbasis *block* lakukan sentrifugasi tabung atau *plate PCR* dengan percepatan putar 2.000 × *g* selama 2 menit.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan dua konsentrasi DNA cetakan. Konsentrasi DNA yang digunakan adalah maksimum 40 ng/µl dan 25% dari ≤ 40 ng/µl.

7.4.3 Proses amplifikasi

Proses amplifikasi dilakukan menggunakan *real-time PCR* pada kondisi sesuai dengan Tabel 2.

Tabel 2 — Kondisi amplifikasi

Tahap	Kondisi	Jumlah siklus
Aktivasi DNA <i>polymerase</i>	95 °C selama 20 detik ¹	1 siklus
Denaturasi	95 °C selama 3 detik	45 siklus
Penempelan <i>primer</i> , amplifikasi, dan elongasi	60 °C selama 30 detik	

¹ Waktu aktivasi DNA *polymerase* disesuaikan dengan *master mix* yang digunakan

7.5 Kontrol pengujian

Kontrol pengujian dijelaskan pada Tabel 3.

Tabel 3 — Kontrol pengujian

Kontrol pengujian	Komposisi
Kontrol <i>master mix</i> (NTC)	5 µl air bebas <i>nuclease</i>
Kontrol blangko ekstraksi	5 µl blangko ekstraksi
Kontrol DNA lain	5 µl pada konsentrasi 40 ng/µl
Kontrol positif DNA	5 µl pada konsentrasi 40 ng/µl
Kontrol positif mendekati titik LOD	2,5 µl kontrol positif pada konsentrasi 3× LOD + 2,5 µl air bebas <i>nuclease</i>
Kontrol inhibitor	2,5 µl kontrol positif pada konsentrasi 3× LOD + 2,5 µl DNA sampel yang telah diencerkan menjadi 25%

8 Interpretasi hasil dan kriteria keberterimaan

Apabila kurva amplifikasi pada posisi eksponensial memotong garis *threshold* pada posisi yang tidak bercampur dengan *background* reaksi, maka hasil pengujian dinyatakan terdeteksi. Penentuan terdeteksi atau tidak bukan hanya melihat adanya Ct (Cq) yang dihasilkan tetapi juga memperhatikan adanya fase eksponensial dari kurva amplifikasi.

Pengujian sampel dilakukan minimal menggunakan 2 porsi uji (2× pengulangan tiap sampel). Setelah dilakukan ekstraksi DNA, masing-masing porsi uji diamplifikasi pada 2 jenis konsentrasi yaitu maksimum 40 ng/µl dan 25% dari ≤ 40 ng/µl.

Pengambilan keputusan hasil uji dilakukan jika seluruh kontrol pengujian valid. Pengujian dikatakan valid jika memenuhi ketentuan pada Tabel 4.

Tabel 4 — Kriteria keberterimaan

Jenis kontrol pengujian	Hasil
Kontrol positif mengandung DNA target (misalnya DNA <i>genome</i> , DNA sintetik, plasmid)	Terdeteksi
Kontrol <i>master mix</i> (NTC)	Tidak terdeteksi
Kontrol blangko ekstraksi	Tidak terdeteksi
Kontrol positif mendekati titik LOD	Terdeteksi
Kontrol inhibitor	Terdeteksi (tidak menunjukkan adanya inhibisi)

Hasil uji sampel dinyatakan terdeteksi apabila:

- a. Kontrol pengujian valid dan terbentuk kurva amplifikasi PCR yang valid;
- b. Porsi uji dinyatakan terdeteksi apabila minimal salah satu konsentrasi (maksimum 40 ng/μl dan 25% dari ≤ 40 ng/μl) dapat teramplifikasi (terdeteksi); dan
- c. Minimal 1 dari 2 porsi uji hasilnya terdeteksi.

Hasil uji sampel dinyatakan tidak terdeteksi apabila:

- a. Kontrol pengujian valid dan tidak terbentuk kurva amplifikasi PCR yang valid; dan
- b. Tidak ada porsi uji yang terdeteksi.

9 Status validasi

Metode ini telah divalidasi secara *single laboratory* dan uji kolaborasi pada porsi uji 3 g sampel. Validasi metode ekstraksi dilakukan secara *single laboratory*. Validasi metode deteksi dilakukan secara *single laboratory* dan uji kolaborasi. Hasil validasi secara rinci terdapat pada Lampiran D.

10 Jaminan mutu pengujian

10.1 Laboratorium harus menerapkan prinsip cara berlaboratorium yang baik sesuai dengan SNI ISO 24276 dan SNI ISO 20813.

10.2 Laboratorium direkomendasikan untuk dilengkapi dengan *biological safety cabinet* level II dan *laminar air flow*.

10.3 Pengujian dilaksanakan oleh personel yang kompeten dan berpengalaman untuk pengujian matriks sejenis.

10.4 Personel yang melakukan pengujian harus menggunakan alat pelindung diri (misalnya masker, sarung tangan bebas tepung, dan lain-lain) yang sesuai.

10.5 Area kerja (*biological safety cabinet* level II dan *laminar air flow*) didekontaminasi menggunakan radiasi UV dan larutan pembersih *DNAse*.

10.6 Area kerja selain yang disebutkan pada 10.5 serta instrumen didekontaminasi menggunakan larutan pembersih *DNAse* atau HCl 0,1 N atau sodium hipoklorit 10% (*bleach* yang mengandung 3% klorin aktif).

10.7 Pereaksi PCR disimpan pada *freezer* terpisah, digunakan pada *laminar air flow* di mana tidak terdapat asam nukleat (kecuali *primer* dan *probe*), menggunakan peralatan (pipet) khusus yang tidak bercampur untuk tahapan uji lainnya.

10.8 Peralatan yang digunakan (pipet, timbangan, dan lain-lain) telah dibersihkan menggunakan larutan pembersih *DNAse* atau HCl 0,1 N atau sodium hipoklorit 10% (*bleach* yang mengandung 3% klorin aktif).

10.9 Spesifikasi peralatan yang digunakan untuk pengujian PCR, misalnya tabung, kontainer, *pipette tip* harus bersifat *molecular grade*, yaitu bebas *DNAse*, bebas DNA, steril, serta tidak mengabsorpsi protein/DNA.

10.10 Untuk mencegah kontaminasi aerosol, digunakan *pipette tip* berfilter.

10.11 Gunakan sarung tangan bebas tepung dan ganti secara berkala jika diperlukan.

10.12 *Master mix* PCR disiapkan pada suhu 0 °C sampai dengan 4 °C (menggunakan *ice bath* atau *cooling blocks*).

10.13 Buat alikuot pereaksi untuk mencegah pembekuan dan pencairan serta kontaminasi.

11 Pelaporan hasil

Hasil uji dilaporkan sesuai prosedur pelaporan pada SNI ISO 20813, SNI ISO 24276 dan SNI ISO/IEC 17025 yang meliputi:

- a. Hasil pengujian secara kualitatif dinyatakan terdeteksi atau tidak terdeteksi dalam jumlah Ct (Cq). Hasil terdeteksi ditunjukkan dengan nilai Ct (Cq) pada angka tertentu yang menggambarkan terdeteksi pada siklus amplifikasi tertentu.
- b. Penulisan laporan menyertakan nilai konsentrasi dan kemurnian DNA, gambar kurva amplifikasi, kontrol pengujian, serta nilai Ct (Cq) yang diperoleh.

Lampiran A
(informatif)
Sekuens gen *cytochrome b* (cyt b)

```

1 atgaccaaca tccgaaaatc acaccacta ataaaaatta tcaacaacgc attcattgac
61 ctcccagccc cctcaaacat ctcacatga tgaaacttcg gttccctctt aggcattctgc
121 ctaatcttgc aaatcctaac aggcctgttc ttagcaatac attacacatc agacacaaca
181 acagctttct catcagttac acacatttgt cgagacgtaa attacggatg agttattctgc
241 tatctacatg caaacggagc atccatattc tttatttgcc tattcatcca cgtaggccga
301 ggtctatact acggatccta tatattccta gaaacatgaa acattggagt agtcctacta
361 tttaccgtta tagcaacagc cttcataggc tacgtcctgc cctgaggaca aatatcattc
421 tgaggagcta cggatcacac aaatctacta tcagctatcc cttatatcgg aacagacctc
481 gtagaatgaa tctgaggggg cttttccgtc gacaaagcaa ccctcacacg attcttcgcc
541 ttccacttta tcctgccatt catcattacc gccctcgtag ccgtacatct cctattcctg
601 cacgaaaccg gatccaacaa ccctaccgga atctcatcag acatagacaa aattccattt
661 caccatact acactattaa agacattcta ggagccttat ttataatact aatcctacta
721 atccttgtag tattctcacc agacctacta ggagaccag acaactacac cccagcaaac
781 ccactaaaca cccccaccca tattaaacca gaatgatatt tcttattctg ctacgctatt
841 ctacgttcaa ttcctaataa actaggtgga gtggtggccc tagtagcctc catcctaatac
901 ctaattttta tgcccatact acacacatcc aaacaacgag gcataatatt tcgaccacta
961 agtcaatgcc tattctgaat actagtagca gacctatta cactaacatg aattggagga
1021 caaccgtag aacaccggtt catcatcacc ggccaactag cctccatctt atacttcta
1081 atcattctag tattgatacc aatcactagc atcatcgaaa acaaccnatt aaaatgaaga

```

Gambar A.1 — Sekuens amplikon babi 131 bp (nukleotida 126-256) (bagian yang digaris bawah) pada DNA mitokondria *Sus scrofa* gen *cytochrome b* GenBank AM492637.1

Lampiran B
(informatif)
Sekuens kontrol positif DNA dan gen target babi

B.1 Kontrol positif DNA babi

Sekuens lengkap sisipan nukleotida amplicon babi 131 bp (diberi garis bawah) pada kontrol positif DNA sintetik babi 500 bp adalah sebagai berikut.

CTCTTAGGCATCTGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTA
CACATCAGACACAACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATTTGTCGAGACGTAAT
TACGGATGAGTTATTCGCTATCTACATGCAAACGGAGCATCCATATTCTTTATTTGCCT
ATTCATCCACGTAGGCCGAGGTCTATACTACGGATCCTATATATTCTAGAAACATGA
AACATTGGAGTAGTCCTACTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCT
GCCCTGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCT
ATCCCTTATATCGGAACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCGTAGGTGC
ACAGTAGGTCTGACGTGACTCCCCGACCTGGGGTCCCCAGCACACTTAGCCGTGTTC
CTTGCACTCTCTGCATGTCCCCAGTCTGGCCTGA

B.2 Gen target babi (*primer dan probe*)

cyt b porcine forward primer : 5'- CTT GCA AAT CCT AAC AGG CCT G -3'
cyt b porcine reverse primer : 5'- CGT TTG CAT GTA GAT AGC GAA TAA C - 3'
cyt b porcine probe : 5'- (FAM) – ACA GCT TTC TCA TCA GTT AC -
 (NFQ)(MGB) – 3'

Lampiran C
(normatif)
Prosedur pembuatan larutan bufer lisis A

C.1 Perekasi

- a. CTAB 20 g/l.
- b. NaCl 1,4 M.
- c. Tris HCl 0,1 M.
- d. Larutan EDTA 0,5 M, pH 8,0.
- e. Larutan NaOH 1 M.

C.2 Peralatan

- a. *Beaker glass*.
- b. Batang pengaduk.
- c. pH meter.
- d. Labu ukur.
- e. Autoklaf.

C.3 Prosedur

C.3.1 Untuk membuat 500 ml larutan bufer lisis A, timbang 10 g CTAB; 41 g NaCl; dan 7,87 g Tris HCl, kemudian larutkan dengan 400 ml air dalam *beaker glass*.

C.3.2 Tambahkan larutan NaOH, ukur menggunakan pH meter hingga mencapai pH 8,0.

C.3.3 Tambahkan 20 ml larutan EDTA 0,5 M hingga konsentrasi akhir larutan menjadi 20 mM.

C.3.4 Tuang larutan ke dalam labu ukur 500 ml, tambahkan air sampai tanda tera, dan homogenkan. Setelah larut sempurna, sterilkan larutan bufer lisis A menggunakan autoklaf pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, tekanan 15 Psi selama 15 menit.

CATATAN Larutan bufer lisis A steril dapat disimpan selama 6 bulan pada suhu ruang.

Lampiran D
(informatif)
Hasil validasi *single laboratory* dan uji kolaborasi

Validasi metode uji pada Standar ini dilakukan melalui metode *single laboratory* dan uji kolaborasi. Kriteria keberterimaan dan hasil uji parameter untuk setiap parameter validasi metode ekstraksi dan metode deteksi DNA ditunjukkan pada Tabel D.1, Tabel D.2, Tabel D.3 dan Tabel D.4. Hasil uji kolaborasi yang dilakukan dengan 13 laboratorium peserta ditunjukkan pada Tabel D.5.

Tabel D.1 — Kriteria keberterimaan dan hasil uji untuk setiap parameter validasi metode ekstraksi DNA (untuk sampel serbuk gelatin)

Parameter validasi	Kriteria keberterimaan	Hasil	Kesimpulan
Konsentrasi dan jumlah DNA	Nilai rata-rata konsentrasi DNA dan jumlah DNA yang diperoleh mencukupi untuk proses analisis PCR selanjutnya	Rata-rata nilai konsentrasi DNA adalah 33,81 ng/μl, rata-rata jumlah DNA adalah 1.669,08 ng	Memenuhi syarat
Integritas DNA (opsional)	Integritas DNA dari sampel rendah DNA akan terlihat <i>smear</i> yaitu berupa DNA yang terdegradasi sepanjang lintasan DNA pada gel agarosa. Umumnya pada konsentrasi DNA >11 ng/μl DNA yang terdegradasi dapat tervisualisasi pada <i>Gel Documentation System</i> meskipun sangat tipis.	Isolat DNA dapat tervisualisasi dan nampak terdegradasi sepanjang lintasan DNA pada gel agarosa	Memenuhi syarat
Keberadaan inhibitor PCR	Untuk produk olahan: 1. Nilai slope kurva linear = (-4,1) s.d. (-3,1) 2. Efisiensi PCR 75% s.d. 110% 3. $R^2 \geq 0,98$ 4. Nilai ΔCt (Cq) < 0,5	Untuk produk olahan: 1. Nilai slope kurva linear = (-3,83) s.d. (-3,23) 2. Efisiensi PCR 82,35% s.d. 103,86% 3. $R^2 = 0,983$ s.d. 0,998 4. Nilai ΔCt (Cq) = 0,04 s.d. 0,38	Memenuhi syarat

Tabel D.2 — Kriteria keberterimaan dan hasil uji untuk setiap parameter validasi metode deteksi DNA (untuk sampel serbuk gelatin)

Parameter validasi	Kriteria keberterimaan	Hasil	Kesimpulan
Limit deteksi atau <i>limit of detection</i> (LOD)	Pengenceran terendah yang menunjukkan terdeteksi DNA target dari 12 replikasi PCR ditetapkan sebagai nilai LOD _{95%} . Nilai LOD _{95%} dinyatakan dalam bobot DNA (ng).	Pengenceran terendah yang menunjukkan terdeteksi DNA target dari 12 replikasi PCR adalah 0,01 ng	Nilai limit deteksi adalah 0,01 ng
Spesifisitas	<ul style="list-style-type: none"> a. Hasil analisis <i>in silico</i> menunjukkan bahwa kedua <i>primer</i> dan <i>probe</i> hanya mengenali sekuens DNA target. b. Hasil sekuensing amplicon sesuai dengan sekuens DNA target c. Hasil uji reaksi silang pada <i>template</i> DNA non-target harus menunjukkan hasil tidak terdeteksi. d. Hasil uji spesifisitas DNA target pada <i>template</i> campuran DNA target dan DNA non-target harus menunjukkan hasil terdeteksi. 	<ul style="list-style-type: none"> a. Hasil analisis <i>in silico</i> menunjukkan bahwa kedua <i>primer</i> dan <i>probe</i> hanya mengenali sekuens DNA target b. Hasil sekuensing amplicon sesuai dengan sekuens DNA target c. Hasil uji reaksi silang pada <i>template</i> DNA non-target menunjukkan hasil tidak terdeteksi. d. Hasil uji spesifisitas DNA target pada <i>template</i> campuran DNA target dan DNA non-target menunjukkan hasil terdeteksi. 	Memenuhi syarat
<i>Robustness</i>	<i>Robustness</i> metode memenuhi syarat bila hasil uji memberikan hasil terdeteksi dan nilai Ct (Cq) berada pada $\pm 35\%$ dari nilai Ct (Cq) yang diperoleh pada $3 \times \text{LOD}$ pada kondisi normal.	Hasil uji terdeteksi dengan selisih nilai Ct (Cq) terbesar berada pada $\pm 5,9\%$ dari nilai Ct (Cq) yang diperoleh pada $3 \times \text{LOD}$ pada kondisi normal.	Memenuhi syarat

Tabel D.3 — Kriteria keberterimaan dan hasil uji untuk setiap parameter validasi metode ekstraksi DNA (untuk sampel *marshmallow*)

Parameter validasi	Kriteria keberterimaan	Hasil	Kesimpulan
Konsentrasi dan jumlah DNA	Nilai rata-rata konsentrasi DNA dan jumlah DNA yang diperoleh mencukupi untuk proses analisis PCR selanjutnya	Rata-rata nilai konsentrasi DNA adalah 1,75 ng/μl, rata-rata jumlah DNA adalah 87,5 ng	Memenuhi syarat
Integritas DNA (opsional)	Integritas DNA dari sampel rendah DNA akan terlihat <i>smear</i> yaitu berupa DNA yang terdegradasi sepanjang lintasan DNA pada gel agarosa. Umumnya pada konsentrasi DNA >11 ng/μl. DNA yang terdegradasi dapat tervisualisasi pada <i>Gel Documentation System</i> meskipun sangat tipis.	Opsional	Tidak dilakukan
Keberadaan Inhibitor PCR	Untuk produk olahan: 1. Nilai slope kurva linear = (-4,1) s.d. (-3,1) 2. Efisiensi PCR 75% s.d. 110% 3. $R^2 \geq 0,98$ 4. Nilai ΔCt (Cq) < 0,5	Untuk produk olahan: 1. Nilai slope kurva linear = (-3,783) s.d. (-3,226) 2. Efisiensi PCR 85,49% s.d. 104,16% 3. $R^2 = 0,988$ s.d. 1 4. Nilai ΔCt (Cq) = 0,021 s.d. 0,221	Memenuhi syarat

Tabel D.4 — Kriteria keberterimaan dan hasil uji untuk setiap parameter validasi metode deteksi DNA (untuk sampel *marshmallow*)

Parameter validasi	Kriteria keberterimaan	Hasil	Kesimpulan
Limit deteksi atau <i>limit of detection</i> (LOD)	<p>a. Pengenceran terendah yang menunjukkan terdeteksi DNA target dari 12 replikasi PCR ditetapkan sebagai nilai LOD_{95%}.</p> <p>b. Nilai LOD_{95%} dinyatakan dalam <i>w</i> DNA (<i>w</i> sampel), contoh: ng DNA <i>porcine</i>.</p>	Nilai limit deteksi 0,05 salinan/ μ l \times 5 μ l = 0,25 salinan/ μ l	Nilai limit deteksi adalah 0,25 salinan/ μ l
Spesifisitas	<p>a. Hasil analisis <i>in silico</i> menunjukkan bahwa kedua <i>primer</i> dan <i>probe</i> hanya mengenali sekuens DNA target</p> <p>b. Hasil sekuensing amplicon sesuai dengan sekuens DNA target</p> <p>c. Hasil uji reaksi silang pada template DNA non-target harus menunjukkan hasil tidak terdeteksi.</p> <p>d. Hasil uji spesifisitas DNA target pada template campuran DNA target dan DNA non-target harus menunjukkan hasil terdeteksi.</p>	<p>a. Hasil analisis <i>in silico primer</i> dan <i>probe</i> (100%) hanya mengenali sekuens DNA target</p> <p>b. Hasil sekuensing amplicon sesuai dengan sekuens DNA target.</p> <p>c. Hasil uji reaksi non target menunjukkan hasil tidak terdeteksi</p> <p>d. Hasil uji spesifisitas DNA target dan DNA nontarget menunjukkan hasil terdeteksi</p>	Memenuhi syarat
<i>Robustness</i>	<i>Robustness</i> metode memenuhi syarat bila hasil uji memberikan hasil terdeteksi dan nilai Ct (Cq) berada pada $\pm 35\%$ dari nilai Ct (Cq) yang diperoleh pada $3 \times$ LOD pada kondisi normal.	Persentase selisih nilai Ct (Cq) terbesar 6,6% merupakan nilai yang lebih kecil dari 35% dari nilai Ct (Cq) yang diperoleh pada $3 \times$ LOD pada kondisi normal.	Memenuhi syarat

Tabel D.5 — Hasil uji kolaborasi

Parameter	Hasil	Keterangan
Jumlah laboratorium yang memberikan hasil uji	13 dari 13	-
Jumlah contoh uji tiap laboratorium	3	-
Jumlah contoh uji terekstraksi	26 dari 26	-
Jumlah contoh uji teridentifikasi dengan benar	39 dari 39	-
RSD Ct (Cq) rata-rata sampel kontrol positif DNA sintetik	9,1%	Kriteria keberterimaan $\leq 25\%$
RSD Ct (Cq) rata-rata ekstraksi sampel alami A	5,7%	Kriteria keberterimaan $\leq 25\%$
RSD Ct (Cq) rata-rata ekstraksi sampel <i>spike B</i>	19,8%	Kriteria keberterimaan $\leq 25\%$
Kisaran LOD (Pengenceran 6 titik dengan 3 ulangan/laboratorium)		
Jumlah laboratorium yang memberikan hasil uji	13 dari 13	-
Jumlah data kisaran LOD	39	-
Data terdeteksi pada 0,04 salinan	6 dari 39	-
Data terdeteksi pada 0,4 salinan	27 dari 39	-
Data terdeteksi pada 4 salinan	39 dari 39	Kisaran LOD terkecil dari 13 laboratorium

Bibliografi

- [1] Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional – BPOM. 2020. *Ekstraksi dan Isolasi DNA dari Produk Berbahan Gelatin 145/MBM/MA-PPOMN/20*. Jakarta.
- [2] Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional – BPOM. 2020. *Deteksi Fragmen Gen Sitokrom B (cyt b) Porcine pada Produk Berbahan Gelatin dengan Metode Real-Time PCR 148/MBM/MA-PPOMN/20*. Jakarta.
- [3] Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional – BPOM. 2023. *Ekstraksi dan Isolasi DNA Marsmallow 46/MBM/MA-PPOMN/23*. Jakarta.
- [4] Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional – BPOM. 2023. *Deteksi Fragmen Gen Sitokrom B (cyt b) Porcine pada Marsmallow dengan Metode Real-Time PCR 47/MBM/MA-PPOMN/23*. Jakarta.
- [5] Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional – BPOM. 2022. *Laporan Uji Kolaborasi 2021-2022 Deteksi DNA Spesifik Porcine pada Produk Berbahan Gelatin*. Jakarta.
- [6] Soichi Tanabe, Makiko Hase, Takeo Yano, Masahiko Sato, Tatsuya Fujimura, and Hiroshi Akiyama. 2007. *A Real-time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton, and Horseflesh in Foods*. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 71 (12), 3131-3135.
- [7] FDA Foods Program Regulatory Science Steering Committee (RSSC). 2019. *Guidelines for The Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis for The FDA Foods Program, 1st Edition*, 16.
- [8] 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).
- [9] Grohmann et al. 2016. *Guidelines for The Validation of Qualitative Real-Time PCR Methods by Means of a Collaborative Lebensmittelsicherheit (BVL)*.

Informasi perumus SNI

[1] Komite Teknis Perumusan SNI

Komite Teknis 19-07 Metode Uji Biomolekuler dan Bioteknologi

[2] Susunan keanggotaan Komite Teknis Perumusan SNI

Ketua : Sony Suhandono
Sekretaris : Nuri Wulansari
Anggota : Febriana Sari
Dini Apriori
Nur Azizah
Puji Rahayu
Ahmad Rusdan Handoyo Utomo
Mohammad Zainal Abidin
Reflinur
Mastur
Temmy Desiliyarni
Aksarani 'Sa Pratiwi
Nurul Haruningtyas
Raafqi Ranasasmita

[3] Konseptor Rancangan SNI

Febriana Sari

[4] Sekretariat pengelola Komite Teknis Perumusan SNI

Direktorat Pengembangan Standar Agro, Kimia, Kesehatan dan Penilaian Kesesuaian
Deputi Bidang Pengembangan Standar
Badan Standardisasi Nasional