



DETEKSI DAN KUANTIFIKASI CEMARAN BABI PADA SAMPEL OLAHAN DAGING MENGGUNAKAN *REAL-TIME* PCR

DETECTION AND QUANTIFICATION OF PORCINE CONTAMINATION ON PRECESSED MEAT USING REAL-TIME PCR

Seagames Waluyo^{1*}, Jekmal Malau¹, Muhareva Raekiansyah¹, Edwin Yulian¹,
Imam Hardiman^{1,2}

¹PT. Sciencewerke Indonesia, Jl. Palmerah Barat No.25, RT.1/RW.15, Palmerah, Kec. Palmerah, Kota Jakarta Barat, Daerah Khusus Ibukota Jakarta 11480, Indonesia

²Department Pharmacy, Faculty of Pharmacy and Science, Universitas Prof. Dr. HAMKA, Jl. Delima II Gg. 4, RT.9/RW.3, Malaka Sari, Kec. Duren Sawit, Kota Jakarta Timur, Daerah Khusus Ibukota Jakarta 13460, Indonesia

*Corresponding author: games.agro@gmail.com

Naskah Diterima: 26 Maret 2021; Direvisi: 21 Juli 2021; Disetujui: 1 Februari 2022

Abstrak

Metode pengujian cemaran babi menjadi faktor penting dalam sertifikasi produk halal. Metode yang cepat dan *robust* diperlukan untuk deteksi dan kuantifikasi cemaran babi. Metode Real-time PCR atau dikenal dengan istilah *quantitative PCR* (qPCR) merupakan metode alternatif untuk deteksi dan kuantifikasi cemaran babi berdasarkan residu keberadaan DNANYa pada sampel olahan pangan. Metode ekstraksi DNA dan *kit* amplifikasi yang tahan terhadap inhibitor menjadi kunci keberhasilan penggunaan qPCR untuk pendeteksian dan kuantifikasi cemaran babi. Pendeteksian cemaran DNA dengan *probe* qPCR digunakan karena mempunyai kelebihan tahan terhadap inhibitor, cepat, spesifik, dan multipel target. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi cemaran DNA babi menggunakan metode ekstraksi DNA secara cepat dan qPCR. Tahapan penelitian ini adalah ekstraksi DNA, amplifikasi, deteksi, dan kuantifikasi DNA babi. Sampel berasal dari produk olahan pangan, seperti bakso, sosis, daging burger, siomay, kuah daging, dan daging isi roti. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat cemaran babi pada sampel bakso, daging burger, dan kuah bakso. Hasil yang didapatkan menunjukkan bakso memiliki persentase kontaminasi sejumlah 25%, sedangkan kuah daging sejumlah 12,5%. Hasil penelitian ini dapat direkomendasikan untuk laboratorium pengujian makanan sebagai metode deteksi cemaran babi dalam produk pangan secara cepat dan akurat.

Kata kunci: Cemaran babi; *Probe*; *Quantitative PCR*

Abstract

Pork contamination testing method is an important factor in halal product certification. A fast and robust method is needed for the detection and quantification of pig contamination. Real-time PCR method or commonly known as quantitative PCR (qPCR) is an alternative method for the detection and quantification of pork contamination based on the pig's DNA residual presence in processed food samples. DNA extraction method and inhibitor-resistant amplification kit are the keys of successful qPCR implementation for the detection and quantification of pig contamination. Detection of DNA contamination with qPCR probe is used because it has some advantages, such as resistant to inhibitors, fast, specific, and multiple targets. This research aimed to detect and quantify pig's DNA contamination using rapid DNA extraction method and qPCR. The stages of this research were pig's DNA extraction, amplification, detection, and quantification. The samples taken from processed food products, such as meatballs, sausage, burgers' meat, dumplings, meat broth, and meat filled in the bread. The results showed that there was pork contamination in the samples of meatballs, burgers' meat, and meat broth. The results showed that the meatballs had a contamination percentage of 25%, while the meat broth had a contamination percentage of 12.5%. The results of this study can be a recommendation for food testing laboratories as a method of detecting the pork contamination in food products quickly and accurately.

Keywords: *Pork contamination; Probe; Quantitative PCR*

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v16i1.20203>

PENDAHULUAN

Produk makanan dan jasa diharuskan mempunyai sertifikat produk halal. Aturan tersebut termuat dalam UU Nomor 33 Tahun 2014 terkait jaminan produk halal (Aminuddin, 2016). Jaminan produk halal pada pangan seperti mendeteksi cemaran babi, karena dalam agama Islam daging babi termasuk jenis makanan haram. Daging babi bersifat inang bagi parasit, virus, dan patogen yang mudah berpindah ke manusia karena kedekatan secara genetik. Jaminan produk halal pada pangan agar terhindar dari cemaran babi berdasarkan pada risiko mengonsumsi daging babi, seperti tingginya lemak meningkatkan obesitas, diabetes tipe 2, dan menyebabkan alergi (Bott, 2014; Rupa et al., 2009). Cemaran babi terdeteksi di berbagai produk makan, seperti mesin penggilingan daging, daging giling, bakso, gelatin, dan sosis (Baihaqi et al., 2019; Laila-Liyana et al., 2018).

Nucleic Acid Test (NAT) merupakan uji berdasarkan asam nukleat. Asam nukleat merupakan material genetik yang diturunkan dan digunakan sebagai target diagnostik. Asam nukleat sebagai cetakan amplifikasi mempunyai daerah yang unik dan stabil, sehingga dapat digunakan sebagai bahan uji (Sentandreu & Sentandreu, 2014). Keberadaan asam nukleat dapat dideteksi dengan beberapa metode, salah satunya yaitu metode *real-time* PCR atau dikenal dengan istilah *quantitative* PCR (qPCR) (Cavin et al., 2018).

quantitative PCR merupakan metode PCR yang dapat digunakan untuk melakukan relatif kuantifikasi yang membedakannya dengan metode PCR konvensional yang bertujuan untuk kuantifikasi DNA target. qPCR merupakan generasi kedua yang berfungsi mendeteksi keberadaan asam nukleat, salah satu penggunaannya adalah mendeteksi dan kuantifikasi cemaran DNA babi. Teknologi qPCR menggabungkan *thermal cycler* dengan *detector fluorescent* yang berfungsi untuk mendeteksi dan kuantifikasi target (Raso & Biassoni, 2014). Teknologi qPCR secara luas digunakan untuk mendeteksi keberadaan organisme, diagnostik, patogen pada sampel pangan virus, dan *genotyping*, *Genetically Modified Organism* (GMO) (Zauli, 2019; Qu & Stewart, 2019). Pewarna qPCR untuk amplifikasi menggunakan DNA *binding dye* dan *probe*. *Probe* mempunyai kelebihan seperti multiplek target dalam satu sumur, konsumsi waktu yang cepat, dan sensitivitas tinggi (Kim & Kim, 2019). *Probe* qPCR telah berhasil digunakan untuk mendeteksi cemaran DNA babi di produk pangan, seperti roti, bakso, dan permen, serta produk nonpangan, seperti kuas roti, pelembap, sabun, kosmetik, dan kapsul (Kim & Kim, 2019; Kim et al., 2018; Mohamad et al., 2018; Mustaqimah et al., 2021; Septiani, 2021; Sudjadi et al., 2016; Tan et al., 2020; Tanabe et al., 2007; Widayat et al., 2019).

Metode ekstraksi DNA merupakan faktor kritis keberhasilan qPCR. Metode ekstraksi kimia anorganik menjadi alternatif metode kolom karena metode ini cepat dan mudah dijalankan. Bahan kimia seperti NaOH dan Tris-HCl merupakan komponen dasar metode ini. NaOH berfungsi sebagai lisis sel karena mampu merusak membran sel. Muatan positif dari garam-garam (NaCl, EDTA dan Tris-HCl) untuk netralisir asam nukleat yang bermuatan negatif dan sebagai agen chelating Mg^{++} sehingga asam nukleat terhindar dari kerusakan. Setelah sel lisis, asam nukleat dijaga kondisinya oleh EDTA dan Tris-HCl agar tidak rusak. Metode ini telah berhasil mendapatkan DNA dari berbagai sumber, seperti daun, kalus, fungi, dan *oomycete* (Osmundson et al., 2013; Waluyo et al., 2013; Wang et al., 2009).

Kemudahan pengujian cemaran DNA babi menjadi tantangan yang dihadapi ke depannya. Alternatifnya penggunaan metode ekstraksi kimia organik dan *probe* qPCR untuk pengujian ini. *FastScreen™* DNA merupakan kit ekstraksi menggunakan metode ekstraksi kimia organik dan dikombinasikan. Kit *EasyFastPorcine* merupakan kit qPCR untuk kuantifikasi relatif cemaran DNA babi. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi cemaran babi pada produk pangan menggunakan qPCR berbasis *probe* dengan metode ekstraksi DNA cepat secara kimia anorganik.

MATERIAL DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakso, sosis, burger, kuah sayur daging, siomay, dan roti. Semua sampel diperoleh dari pasar lokal di Surabaya pada bulan November 2019. Sebanyak 10 g sampel dihaluskan, kemudian sebanyak 1 g diambil untuk dilanjutkan ke tahap ekstraksi DNA. Penelitian ini menggunakan daging babi sebagai kontrol positif, dan sapi sebagai kontrol negatif. Laboratorium PT Sciencewerke Indonesia merupakan tempat pengujian cemaran DNA babi dalam makanan.

Ekstraksi DNA

Isolasi DNA menggunakan kit *FastScreen™ DNA extraction kit (Progenus, Belgia)*. Sebanyak 1 g sampel dipotong kecil-kecil dan dimasukkan ke dalam tabung I yang berlabel warna merah muda. Tabung dibolak-balik hingga sampel tercampur sempurna dengan *buffer*. Inkubasi pada 95 °C selama 15 menit dan diamkan hingga tabung menjadi dingin. Selanjutnya, sampel dari tabung I dipindahkan ke dalam tabung II yang berlabel biru, kemudian tabung di bolak-balik sebanyak 5 kali. Sebanyak 2 µL supernatan diambil untuk dilanjutkan ke tahap amplifikasi qPCR.

Amplifikasi qPCR

Amplifikasi target DNA babi menggunakan kit *EasyFastPorcine (Progenus, Belgia)*. Setiap reaksi terdiri atas 18 µL *master mix* yang dicampurkan dengan 2 µL DNA sampel, kontrol positif, dan akuabides sebagai kontrol negatif. Amplifikasi menggunakan mesin CFX96 *touch (Biorad, California)* dengan program amplifikasi DNA, terdiri atas: aktivasi enzim pada 50 °C selama 2 menit; denaturasi awal pada 95 °C selama 3 menit; denaturasi pada 95 °C selama 10 detik; dan penempelan serta pemanjangan pada 60 °C selama 1 menit yang dilakukan selama 40 siklus.

Analisis Cq dan Relatif Kuantifikasi qPCR

Nilai Cq menggunakan *software CFX maestro 2.0 (Biorad, California)* dengan mode *single threshold*. Kurva amplifikasi pada *channel FAM* menunjukkan keberadaan babi dan *channel VIC* menunjukkan keberadaan vertebrata dan kalkulasi persentase DNA Babi (%) = $2^{(Ct_{vertebrate} - Ct_{porcine})}$ x 100.

HASIL

Ekstraksi DNA dari Olahan Daging

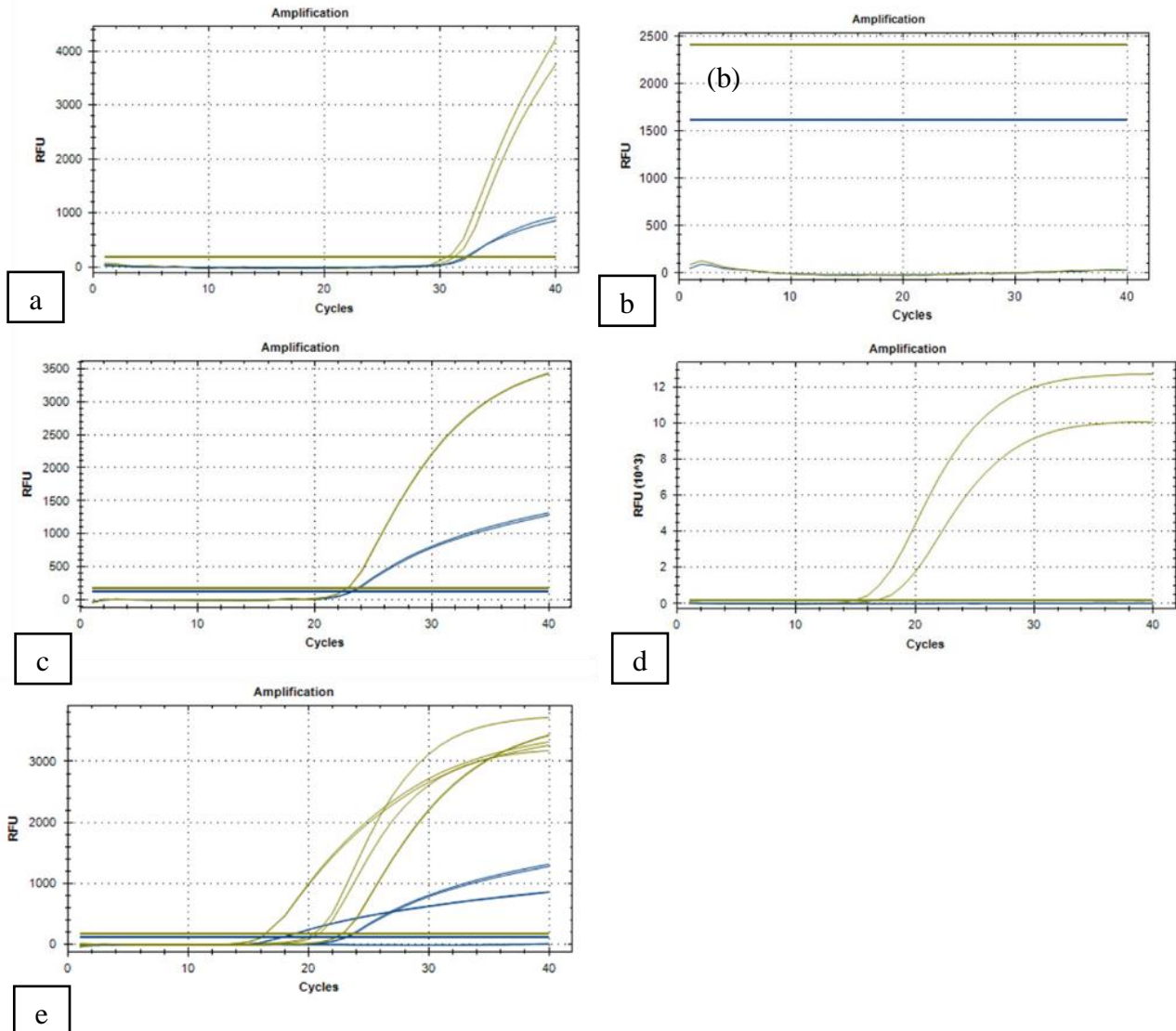
Jenis produk olahan daging, seperti bakso, sosis, daging burger, siomay, roti, dan sayur daging diperoleh dari pasar dan pengujian keberadaan DNA babi. Uji keberhasilan ekstraksi menggunakan qPCR dengan target daerah spesifik vertebrata pada *channel VIC*. Pengujian semua sampel menunjukkan amplifikasi secara *sigmoid* (Gambar 1) dengan nilai Ct berkisar 16–20, kecuali pada sampel isian roti berkisar Ct 30 (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan tahapan ekstraksi berjalan dengan baik karena mampu ekstraksi DNA dari sampel.

Tabel 1. Deteksi qPCR pada olahan daging menggunakan metode ekstraksi cepat

Nama sampel	Kondisi bahan	Ct		Persen
		<i>Porcine</i>	Ver	Kuantifikasi (%)
Daging sapi	Bahan mentah	-	16	Tidak terdeteksi
Daging babi	Bahan mentah	16	16	100
Bakso 1	Proses	18	16	25
Bakso 2	Proses	18	16	25
Sosis 1	Proses	-	20	Tidak terdeteksi
Sosis 2	Proses	-	20	Tidak terdeteksi
Sosis 3	Proses	-	17	Tidak terdeteksi
Daging burger	Proses	17	15	25
Daging burger	Proses	-	17	Tidak terdeteksi
Kuah daging	Proses	20	17	12,5
Siomay	Proses	-	16	Tidak terdeteksi
Daging isi roti	Proses	-	30	Tidak terdeteksi

Amplifikasi DNA Babi dari Olahan Daging Menggunakan qPCR

qPCR bertujuan untuk mendeteksi keberadaan babi dalam sampel secara spesifik. Kami menggunakan daging babi sebagai kontrol positif, daging sapi sebagai kontrol negatif, dan EPC sebagai kontrol reaksi kit. Hasil kontrol EPC menunjukkan adanya kurva amplifikasi pada dua target babi dan vertebrata dengan nilai Ct 30. Hal ini menunjukkan bahwa kit tidak mengalami kerusakan. Pada kontrol positif menunjukkan amplifikasi di kedua *channel* dengan Ct 16, yang menunjukkan bahwa 100% merupakan babi. Pada kontrol sampel negatif memperlihatkan hanya *channel* VIC (vertebrata) yang terdeteksi, sedangkan pada target babi di *channel* FAM tidak ada amplifikasi (Gambar 1). Kedua kontrol menunjukkan kit valid secara spesifik sehingga dapat digunakan untuk membedakan sampel yang mengandung cemaran DNA babi. Sampel bakso dan daging burger 1 terdeteksi DNA babi sebanyak 25%, sedangkan kuah daging sebanyak 12,5%. Adapun, pada sampel sosis, daging burger 2, siomay, dan daging isi roti tidak terdeteksi DNA babi (Tabel 1).



Gambar 1. Kurva amplifikasi deteksi babi di berbagai jenis produk, yaitu EPC internal control *kit* (a), kontrol NTC (b), kontrol positif daging babi (c), kontrol negatif daging sapi (d), dan sampel dari olahan daging (e)

PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA merupakan kunci keberhasilan untuk mendeteksi keberadaan babi dalam sampel menggunakan qPCR. Sampel mengalami proses pemanasan dan penambahan bumbu masakan yang berpotensi merusak DNA dan inhibitor reaksi amplifikasi qPCR. Kami menggunakan *FastScreen™ DNA extraction kit* untuk ekstraksi DNA dan kit *EasyFastPorcine* untuk amplifikasi DNA sampel. Evaluasi keberhasilan ekstraksi menggunakan kit amplifikasi pada *channel* VIC yang

mendeteksi gen endogenus pada golongan vertebrata. Kit ini berhasil melakukan ekstraksi DNA yang ditandai dengan nilai Ct rendah berkisar 16–20 pada target vertebrata, kecuali pada sampel roti dengan nilai Ct berkisar 30 (Tabel 1). Deteksi endogenus gen bertujuan untuk monitor keberhasilan ekstraksi DNA, kuantifikasi secara relatif, menghindari negatif palsu, dan memotong waktu pengujian.

Metode ekstraksi DNA pada penelitian ini menggunakan metode ekstraksi DNA secara kimia dan organik. Kelebihan metode ini adalah prosedurnya lebih cepat, mudah, murah, dan tidak beracun. Kit ini mempunyai komposisi utama, yaitu Sodium hidroksida (NaOH) dan Tris-HCl. Kombinasi NaOH dan pemanasan berfungsi untuk lisis. Selanjutnya, adanya Tris-HCL berfungsi menjaga asam nukleat tidak rusak. Beberapa studi menunjukkan metode ini mempunyai efisiensi lisis antara 50–80%. Metode yang sama telah banyak digunakan pada berbagai sampel, seperti daun, kalus, fungi, *oomycete* (Osmundson *et al.*, 2013; Waluyo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2009).

Kit *EasyFastPorcine* (*Progenus, Belgia*) untuk amplifikasi keberadaan target toleran terhadap inhibitor. Pada sampel, kontrol positif, negatif dan EPC menunjukkan kurva yang *sigmoid* (Gambar 1a, c, d, dan e). Hal ini menunjukkan bahwa sampel yang tanpa pemurnian DNA dapat dengan baik diamplifikasi oleh kit ini. Inhibitor dalam penelitian berasal dari debris sel, protein, karbohidrat, dan lemak dari sampel. Inhibitor sangat memengaruhi hasil PCR yang dapat menurunkan nilai *Relative Flouresent Unit* (RFU), membuat kurva qPCR menjadi linier dan meningkatkan nilai Ct qPCR. Pengaruh inhibitor dapat diturunkan dengan beberapa Teknik, seperti pemurnian DNA, dilusi sampel DNA, dan menggunakan enzim taqpol yang toleran terhadap inhibitor (Sidstedt *et al.*, 2020).

Deteksi dan kuantifikasi kontaminasi babi dapat dilakukan sekaligus. Batas deteksi kit ini mencapai 5 *copy/μL*, efisiensi reaksi 94%, dengan persen kuantifikasi babi mencapai 0,1% (data tidak dipublikasikan). Kit amplifikasi mendeteksi 2 target sekaligus dalam satu tabung. *Channel FAM* spesifik ke babi dan *VIC* spesifik menempel di bagian yang bisa mendeteksi golongan vertebrata. Validitas kit ditunjukkan pada Gambar 1a dan Gambar 1b menggunakan PC dan NTC. Kontrol reaksi kit berjalan dengan baik sehingga bisa teramplifikasi ke PC, sedangkan NTC dengan *aquabidest* tidak menunjukkan amplifikasi yang membuktikan bahwa tidak terjadi kontaminasi dalam kit ini. Pada sampel babi menunjukkan kenaikan kurva amplifikasi pada channel FAM (warna biru) dan VIC (warna coklat) (Gambar 1c). Pada sampel sapi hanya menunjukkan kenaikan pada channel VIC dan FAM landai. Pengujian pada sampel lapangan menunjukkan bahwa sampel bakso 1 & 2, burger 1, dan kuah daging positif terdeteksi DNA babi yang ditunjukkan kenaikan kurva pada kedua channel FAM dan VIC (Gambar 1e).

SIMPULAN DAN SARAN

Pengujian kuantifikasi kontaminasi DNA babi dalam produk pangan dapat menggunakan kombinasi metode rapid ekstraksi kimia organik dan qPCR. Hasil penelitian menunjukkan terdapat kontaminasi pada beberapa sampel, yaitu sampel bakso dan daging burger sejumlah 25%, serta kuah daging sejumlah 12,5%. Hasil penelitian ini yang menggunakan rapid ekstraksi dan qPCR dapat direkombinasikan bagi laboratorium penguji makanan untuk kuantifikasi cemaran DNA babi dalam produk pangan secara cepat dan akurat.

Hasil yang diperoleh dalam penelitian valid, namun tidak dapat dijadikan simpulan umum yang menggeneralisasi ataupun merepresentasikan jenis sampel secara keseluruhan, maupun tidak pula merepresentasikan keseluruhan jenis sampel yang sama untuk cakupan sampling pasar lokal di Surabaya. Dibutuhkan tambahan data, pengulangan sampel uji, dan analisa statistik lebih lanjut agar data yang dihasilkan akurat dalam justifikasi keberadaan cemaran babi pada sampel olahan daging di pasar lokal Surabaya.

REFERENSI

Aminuddin, M. Z. (2016). Sertifikasi produk halal: Studi perbandingan Indonesia dan Thailand. *SHAHIH: Journal of Islamicate Multidisciplinary*, 1(1), 2527-8126. doi: 10.22515/shahih.v1i1.52.

- Baihaqi, M., Rachmawati, Y., Rokhim, S., Munir, M., & Hamidah, L. (2019). Real time PCR assays for detection and quantification of porcine DNA in meat milling samples. *1st International Conference on Science and Technology (ICOST)*, 1-7. doi: 10.4108/eai.2-5-2019.2284634.
- Bott, R. (2014). Scientific evidence that porcine meat (pork) is prohibited for human health. *International European Conference on Interdisciplinary Scientific*, 55(1), 67-75.
- Cavin, C., Cottenet, G., Cooper, K. M., & Zbinden, P. (2018). Meat vulnerabilities to economic food adulteration require new analytical solutions. *Chimia*, 72(10), 697-703. doi: 10.2533/chimia.2018.697.
- De Kock, R., Baselmans, M., Scharnhorst, V., & Deiman, B. (2020). Sensitive detection and quantification of sars-cov-2 by multiplex droplet digital RT-PCR. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 40(4), 807-813. doi: 10.1007/s10096-020-04076-3.
- Kim, M. J., & Kim, H. Y. (2019). A fast multiplex real-time pcr assay for simultaneous detection of pork, chicken, and beef in commercial processed meat products. *LWT - Food Science and Technology*, 114, 1-6. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108390.
- Kim, Y. S., Yu, H. K., Lee, B. Z., & Hong, K. W. (2018). Effect of DNA extraction methods on the detection of porcine ingredients in halal cosmetics using real-time PCR. *Applied Biological Chemistry*, 61(5), 549-555. doi: 10.1007/s13765-018-0389-x.
- Laila-Liyana, M. N., Sahilah, A. M., Nur-Qistina, Z., Mohd-Khan, A., Aminah, A., & Abdul-Salam, B. (2018). Detection of porcine dna in cooked meatballs using polymerase chain reaction (PCR) assay. *International Food Research Journal*, 25(5), 1953-1958.
- Mohamad, N. A., Mustafa, S., Mokhtar, N. F. K., & El Sheikha, A. F. (2018). Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of porcine DNA in gelatin and gelatin capsules. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(12), 4570-4577. doi: 10.1002/jsfa.8985.
- Mustaqimah, D. N., Septiani, T., & Roswiem, A. P. (2021). Deteksi DNA babi pada produk sosis menggunakan real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Indonesia Journal of Halal*, 3(2), 106-111. doi: 10.14710/halal.v3i2.10130.
- Osmundson, T. W., Eyre, C. A., Hayden, K. M., Dhillon, J., & Garbelotto, M. M. (2013). Back to basics: An evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. *Molecular Ecology Resources*, 13(1), 66-74. doi: 10.1111/1755-0998.12031.
- Qu, C., & Stewart, K. A. (2019). Evaluating monitoring options for conservation: comparing traditional and environmental DNA tools for a critically endangered mammal. *The Science of Nature*, 106(9), 1-9. doi: 10.1007/s00114-019-1605-1.
- Raso, A., & Biassoni, R. (2014). Twenty years of qPCR: A mature technology? *Methods in Molecular Biology*, (1160), 1-3. doi: 10.1007/978-1-4939-0733-5_1.
- Reijns, M. A. M., Thompson, L., Acosta, J. C., Black, H. A., Sanchez-Luque, F. J., Diamond, A., ... Jackson, A. P. (2020). A sensitive and affordable multiplex RT-qPCR assay for SARS-CoV-2 detection. *PLOS Biology*, 18(12), 1-20. doi: 10.1371/journal.pbio.3001030.
- Rupa, P., Schmied, J., & Wilkie, B. N. (2009). Porcine allergy and IgE. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(1), 41-45. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.09.013.
- Waluyo, S., Sustiprijatno., & Suharsono. (2013, June 27-28). *Optimasi antibiotik higromisin sebagai penunjang transformasi genetik tembakau*. Paper presented at Seminar Nasional Riset Pangan, Obat-Obatan dan Lingkungan untuk Kesehatan, IPB Convention Centre, Botani Square, Bogor, Jawa Barat, Indonesia. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/331674684_Optimasi_antibiotik_higromisin_sebagai_penunjang_transformasi_genetik_tembakau
- Sentandreu, M. A., & Sentandreu, E. (2014). Authenticity of meat products: Tools against fraud. *Food Research International*, 60, 19-29. doi: 10.1016/j.foodres.2014.03.030.
- Septiani, T. (2021). Identification of rat meatballs in traditional market in area of Jakarta using real time - PCR. *Indonesia Journal of Halal*, 3(1), 94-99. doi: 10.14710/halal.v3i2.9244.

- Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *In Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(9), 1-9. doi: 10.1007/s00216-020-02490-2.
- Sudjadi., Wardani, H. S., Sepminarti, T., & Rohman, A. (2016). Analysis of porcine gelatin DNA in a commercial capsule shell using real-time polymerase chain reaction for halal authentication. *International Journal of Food Properties*, 19(9), 2127-2134. doi: 10.1080/10942912.2015.1110164.
- Tan, L. L., Ahmed, S. A., Ng, S. K., Citartan, M., Raabe, C. A., Rozhdestvensky, T. S., & Tang, T. H. (2020). Rapid detection of porcine DNA in processed food samples using a streamlined DNA extraction method combined with the SYBR Green real-time PCR assay. *Food Chemistry*, 309, 1-27. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125654.
- Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., & Akiyama, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(12), 3131-3135. doi: 10.1271/bbb.70683.
- Wang, C., Wang, X., Tang, Y., Zhang, J., Yu, S., Xu, J., & Bao, Z. (2009). A rapid and cheap protocol for preparation of PCR templates in peanut. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(2), 9-10. doi: 10.4067/S0717-34582009000200009.
- Widayat, W., Agustini, W. T., Suzery, M., Al-Baarri, A. N., & Putri, S. R. (2019). Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) sebagai alat deteksi DNA babi dalam beberapa produk non-pangan. *Indonesia Journal of Halal*, 2(1), 26-33. doi: 10.14710/halal.v2i1.5361.
- Zauli, D. A. G. (2019). PCR and infectious diseases, synthetic biology - new interdisciplinary science, *IntechOpen*, 1–10. doi: 10.5772/intechopen.85630.
- Zhang, Y., Wang, C., Han, M., Ye, J., Gao, Y., Liu, Z., ... Zhang, Z. (2020). Discrimination of false negative results in RT-PCR detection of SARS-CoV-2 RNAs in clinical specimens by using an internal reference. *Virologica Sinica*, 35(6), 1-10. doi:10.1007/s12250-020-00273-8.