UPT LABKESDA KOTA TANGERANG	**PENETAPAN IDENTIFIKASI DNA BABI PADA PRODUK PANGAN OLAHAN DAN PRODUK/SEDIAAN MENGANDUNG GELATIN METODE REAL TIME PCR**		
	No. Dokumen KALK : SOP/005LM/2025 KAN : IK.LKT-09/M5	**No. Terbit/No.Revisi** 2/2	**Halaman** **1/14**
STANDAR PROSEDUR OPERASIONAL (SPO)	**Tanggal Pembuatan** 18-9-2025 **Tanggal Terbit** 18-9-2025	**Ditetapkan** **Kepala UPT** **Laboratorium Kesehatan Daerah** **Kota Tangerang** **dr. Lulik Sri Adarini, MM** **NIP. 197412242006042017**	

PENGERTIAN	Penetapan berdasarkan keberadaan DNA Babi yang teramplifikasi (perbanyakan) pada sampel, dengan menggunakan Metode Polymerase Chain Reaktor (PCR)
TUJUAN	Untuk memastikan bahwa penetapan identifikasi DNA Babi di dalam sampel makanan/minuman dilakukan dengan cara yang benar, sehingga diperoleh hasil yang akurat.
KEBIJAKAN	SK Kepala UPT Laboratorium Kesehatan Daerah Kota Tangerang Nomor 188.4/017-LKD/VIII/2022
PROSEDUR	**A. ALAT** 1. Homogenizer 2. Tabung 2 ml dengan dasar bentuk U 3. Vortex 4. Mikrosentrifuge yang bias mencapai 17,900 x g 5. Shaking thermoblock dengan suhu mencapai 60 ºC (QIACUBE) 6. Life Touch 1,5 ml microcentrifuge tube (spindown) 7. Mikropipet (1000, 200, 100, 20, 10)µl 8. Disposible Filter Tips steril (1000, 200, 100, 20, 10)µl 9. Disposible Free Powder Gloves 10. Pisau Bisturi / sejenisnya 11. Rotor-gene Q (PCR) **B. BAHAN** 1. Sampel dari makanan atau dari bahan makanan olahan 2. Alkohol Absolute 3. Chloroform 4. Kit Mericon food (Buffer PB ; Buffer AW2 ; Buffer EB ; Primer pig DNA , H 2 0)

C. Tata cara penetapan identifikasi DNA BABI dalam makanan Olahan

I. **Preparasi Sebelum Melakukan Ekstraksi adalah** :

Tambahkan Ethanol Absolute ke dalam Buffer AW2 sesuai dengan yang tertulis pada botol

*) dilakukan ketika pertamakali Reagen kit dibuka dari segel (kondisi baru)

II. **Prosedur Kerja Meliputi :**

A. Proses Disrupsi dan Homogenisasi

B. Proses Ekstraksi dan purifikasi DNA : Manual

- Proses disrupsi dan Homogenisasi Sampel Jaringan Merupakan hal yang sangat penting dalam proses purifikasi dari asam nukleat dan protein.

Efisiensi dari proses disrupsi dipengaruhi oleh :

- Perbandingan antara Buffer dan sampel (jika menggunakan Lysis Buffer)
- Jumlah dan konsistensi dari sampel
- Kecepatan dan waktu
- Tipe dari Tabung yang digunakan

III. **Protokol Mericon Food :**

A. Protokol Standar (Sampel Low Process)

Contoh **:** Daging (daging segar, daging variasi segar, daging beku, daging kering, daging cincang), produk olahan daging (daging fermentasi, daging kornet, daging marinasi, daging asap, tepung daging, kaldu daging, dendeng, abon, sosis, bakso, nugget, burger) mie instan, pasta, bumbu (padat, pasta , cairan) , dll

B. Protokol Small Fragment (Sampel High Process)

Contoh :Bahan sediaan Obat/Farmasi (gelatin,Cangkang Kapsul) ,Kulit dan Produk olahannya (kulit, kerupuk Kulit), kulit samak, Permen lunak, marshmellow, jelly, Rambut/bulu,dll

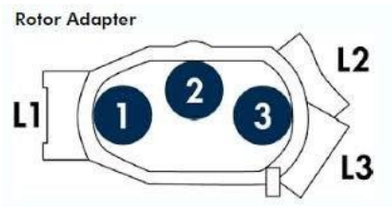
A. Protokol Standar (Sampel Low Process)

- **Ekstraksi**

1. Homogenitas 2 gram sampel dengan homogenizer* (*bila perlu)
2. Disiapkan Tabung sampel 2 ml steril bertutup,
3. Ditimbang 200 mg sampel yang sudah dihancurkan* atau ditimbang 200 mg sampel langsung dari makanan olahan yang telah disiapkan.
4. Dimasukkan ke dalam tabung sampel 2 ml steril, kemudian tambahkan **1000 µl Food Lysis buffer**,
5. Di tambahkan 1 Bit steinless kedalam tube sampel, kemudian **Micro Smesh 5 menit (300 second); 4000 rpm**
6. Di sentrifuge (KUBOTA) atau di **spindown 1menit (60 second)**,140 atau (tekan flashing sampai angka 140 kemudian lepas, tunggu sampai berhenti) atau tekan tombol no.2 , klik flashing
7. Ditambahkan **20 µl Proteinaseka , kemudian Vortex 30 detik (sampel Lysis_larut)**
8. Inkubasi di QIACUBE pada **suhu 60ºC; 2 x 30 menit (total 60 menit) * (1800 second); 1500 rpm**
    a. Caranya : Tool _ Shaker _ Select _ > Time (save)
    b. Temperatur (save)
    c. Fragency (save)
    d. Back
    e. Back
    f. *) Untuk mengedit : Edit _ masukkan sesuai manual Book
    g. Start , apabila telah selesai **Klik Start** kembali 30 menit (total 2 x @30 menit =60')
    h. *) Total inkubasi 60 menit (dianggap tingkat kesulitan sampel tinggi)
9. Di diamkan dalam suhu ruang selama ± 1 menit
10. Di masukkan ke freezer / ice block suhu **- 20ºC** selama 5 menit (untuk mengurangi presipitasi)
11. Sentrifuge (KUBOTA), **2500 x g ; 5 menit (300 second**)

atau Tekan Tombol No.1

12. Di Siapkan tube bertutup 2 ml , kemudian masukan 500 µl kloroform (CHCL 3) kedalam tube tersebut
13. Di Ambil 700 µl Sampel Lapisan Atas secara perlahan (lapisan bening), Di masukkan ke dalam tube yang berisi Kloroform (500 µl CHCL 3)
14. DiVortex 15 detik (Berbuih putih susu)
15. Di Sentrifuge (KUBOTA) **15 menit ; 14000 x g** atau Tekan Tombol No. 2
16. Di Ambil 350 µl Lapisan Bening (atas) , Masukkan ke dalam Tabung Sampel QIACUBE
17. Di Siapkan Rotor Adapter, Spin column (ungu), Elution Tube 1,5 ml, Reagen Bottle rack (buffer), **Diatur sesuai Protokol kit , sbb :**



18. **<u>Posisi tube dalam Rotor Adapter</u>**

    i. **QIAquick spin column** **L1**
    ii. **-**
    iii. **Elution Tube (1,5)** **L3**

    iv. **<u>Posisi Reagen dalam Rak Bottle QIACUBE</u>**

    b. Buffer PB
    c. _
    d. _
    e. _
    f. Buffer AW2
    g. Buffer EB

19. Setting QiaCube, consumable dan reagen pastikan semua tips ada dan tutup botol reagen sudah terbuka, rotor adapter di posisi yang tepat sesuai dengan urutan

sampel.

20. Pilih DNA > Dneasy Mericon Food Kit > select> food sample>Standar > set volume elusi 60µl >save>start >next 4x >start
21. Kalau sudah selesai , Pilih Complete
22. Ambil Tabung Elusi yang sudah terisi DNA Sampel
23. DNA hasil Elusi dapat Langsung di gunakan untuk proses PCR atau simpan pada suhu (-20ºC) atau -80ºC untuk penyimpanan lama.

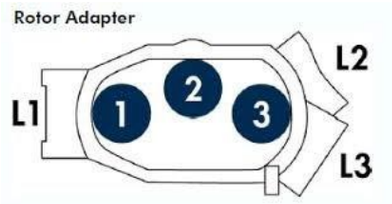
B. Protokol Small Fragment (Sampel High Process)

- **Ekstraksi**

1. Homogenitas 2 gram sampel dengan homogenizer* (*bila perlu)
2. Disiapkan Tabung sampel 2 ml steril bertutup,
3. Ditimbang 200 mg sampel yang sudah dihancurkan* atau ditimbang 200 mg sampel langsung dari makanan olahan yang telah disiapkan.
4. Dimasukkan ke dalam tabung sampel 2 ml steril,
5. Dimasukkan ke dalam tabung sampel 2 ml steril, kemudian tambahkan **1000 µl Food Lysis buffer**,
6. Di tambahkan 1 Bit steinless kedalam tube sampel, kemudian **Micro Smesh 5 menit (300 second); 4000 rpm**
7. Di sentrifuge (KUBOTA) atau di **spindown 1menit (60 second)**,140 atau (tekan flashing sampai angka 140 kemudian lepas, tunggu sampai berhenti) atau tekan tombol no.2 , klik flashing
8. Ditambahkan **25 µl Proteinaseka , kemudian Vortex 30 detik (sampel Lysis_larut)**
9. Inkubasi di QIACUBE pada **suhu 60ºC; 60 menit * (1800 second); 1500 rpm**
    a. Caranya : Tool _ Shaker _ Select _ > Time (save)
    b. Temperatur (save)

c. Fragency (save)
d. Back
e. Back
f. *) Untuk mengedit : Edit _ masukkan sesuai manual Book
g. Start , apabila telah selesai **Klik Start** kembali 30 menit (total 2 x @30 menit =60')
h. *) Total inkubasi 60 menit (dianggap tingkat kesulitan sampel tinggi)

10. Di diamkan dalam suhu ruang selama ± 1 menit
11. Di masukkan ke freezer / ice block suhu **- 20ºC** selama 5 menit (untuk mengurangi presipitasi)
12. Sentrifuge (KUBOTA), **2500 x g ; 5 menit (300 second**) atau Tekan Tombol No.1
13. Di Siapkan tube bertutup 2 ml , kemudian masukan 500 µl kloroform (CHCL 3) kedalam tube tersebut
14. Di Ambil 700 µl Sampel Lapisan Atas secara perlahan (lapisan bening), Di masukkan ke dalam tube yang berisi Kloroform (500 µl CHCL 3)
15. DiVortex 15 detik (Berbuih putih susu)
16. Di Sentrifuge (KUBOTA) **15 menit ; 14000 x g** atau Tekan Tombol No. 2
17. Di Ambil 250 µl Lapisan Bening (atas) , Masukkan ke dalam Tabung Sampel QIACUBE
18. Di Siapkan Rotor Adapter, Spin column (ungu), Elution Tube 1,5 ml, Reagen Bottle rack (buffer), **Diatur sesuai Protokol kit , sbb :**



19. Posisi tube dalam Rotor Adapter

i. QIAquick spin column L1
ii. -
iii. Elution Tube (1,5) L3

iv. Posisi Reagen dalam Rak Bottle QIACUBE

b. Buffer PB
c. _
d. _
e. _
f. Buffer AW2
g. Buffer EB

20. Setting QiaCube, consumable dan reagen pastikan semua tips ada dan tutup botol reagen sudah terbuka, rotor adapter di posisi yang tepat sesuai dengan urutan sampel.
21. Pilih DNA > Dneasy Mericon Food Kit > select> food sample>**Small Fragment** > set volume **elusi 100µl** >save>start >next 4x >start
22. Kalau sudah selesai , Pilih Complete OK
23. Ambil Tabung Elusi yang sudah terisi DNA Sampel
24. DNA hasil Elusi dapat Langsung di gunakan untuk proses PCR atau simpan pada suhu (-20ºC) atau -80ºC untuk penyimpanan lama.

D. ukur kemurnian / konsentrasi DNA dengan Spektro Nanometer dengan mengunakan **Blangko Reagen EB** (batas kemurnian DNA : 1,8 – 2,0)

- A260/280 = kemurnian Absorbansi antara DNA dan protein
- A230/320 = Absorbansi yang di absorbsi organic berasal dari matrik sampel/reagen
- < 1,8 = Kontaminasi Protein
- > 2,0 = Kontaminasi RNA

E. Deteksi DNA BABI Dengan Kit QIAGEN MERICON PIG

Kit Contents

***mericon* Plant and Animal Identification Assays** See Table 1 for specific kits		**(24)**	**(96)**
Number of reactions		**24**	**96**
Yellow	*mericon* Assay*	2 x 12 reactions	1 x 96 reactions
Red	Positive Control DNA	20 reactions	20 reactions
	QuantiTect® Nucleic Acid Dilution Buffer	1.5 ml	1.5 ml
	RNase-Free Water	1.9 ml	1.9 ml
Blue	Multiplex PCR Master Mix†	2 x 130 µl	1040 µl
	50x ROX Dye Solution	45 µl	210 µl
	Quick-Start Protocol	1	1

* Contains target-specific primers and probes, as well as the internal control (IC)

† Contains HotStarTaq® *Plus* DNA Polymerase, dedicated multiplex real-time PCR buffer, and dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

SET UP PCR

*Hal Yang perlu dilakukan sebelum Running : *(dilakukan pertamakali kit dipakai (baru))

- Tambahkan (untuk kit 96) 1040 µl (multiplex PCR master mix (tube Tutup Biru) ke dalam tube mericon assay (tube tutup kuning), mix dengan pipetting atau vortex lalu sentrifuge beberapa detik
- Dissolve Positif DNA (tube tutup merah) tambahkan 200 µl Quantitec Nucleic acid dilution buffer (tube tutup hitam) vortex lalu sentrifuge beberapa detik
- Set up sample dan control reaksi seperti tabel berikut ini :

Table 14. Setup of sample and control reactions

Component	Sample	Positive PCR control	Negative PCR control
Reconstituted *mericon* Assay	10 µl	10 µl	10 µl
Sample DNA	10 µl	–	–
Dissolved Positive Control DNA	–	10 µl	–
QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer or RNase-free water	–	–	10 µl
Total volume	**20 µl**	**20 µl**	**20 µl**

- Di ruang Biobase (sebelumnya nyalakan lampu UV 15 menit)
- Disiapkan Tube PCR 0,2 ml untuk sampel, untuk control Positif, untuk control negative (NTC)
- Disiapkan tube meriqon Pig Assay (Tube Tutup kuning)
- Dimasukkan 10 µl tube tutup kuning ke dalam masing masing tube PCR yang telah di siapkan.
- Untuk Control negative tambahkan 10µl H2O

RUANG DETEKSI DAN IDENTIFIKASI

- Disiapkan tube PCR yang telah di isi dengan mericon pig Assay @10µl
- Sampel di vortek 10 detik , di setrifuge 1 menit (di spindown)
- Ditambahkan larutan sampel 10 µl ke dalam tube sampel, yang telah berisi meriqon Assay
- Ditambahkan control positif (tube tutup merah) 10µl (dilakukan paling terakhir !!)
- Di sentrifuge 1 menit (di spindown)
- Di ukur dengan PCR
- Masukkan tube yang berisi sampel dan control ke dalam mesin run sesuai dengan program real PCR (Program Templete tersetting ada di Folder labkesda)

Table 15 . Cycling protocol for Rotor-Gene Q or Rotor-Gene 6000

Step	Time	Temperature	Comments
Initial PCR activation step	5 min	95°C	Activation of HotStarTaq *Plus* DNA polymerase
3-step cycling:			
Denaturation	15 s	95°C	Data collection at 60°C
Annealing	15 s	60°C	
Extension	10 s	72°C	
Number of cycles	45		
Detection	**Reporter**	**Excitation/emission**	**Channel**
Target	FAM	495/520 nm	Green
Internal control	MAX	524/557 nm	Yellow

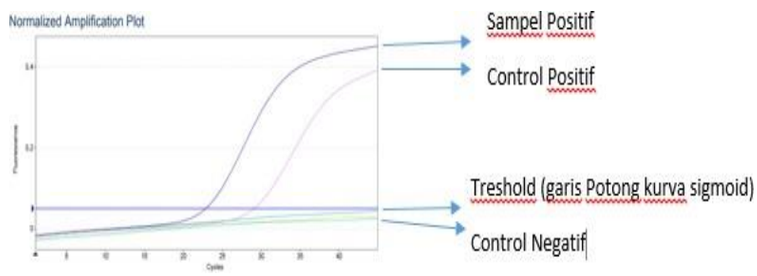
INTERPRESTASI HASIL

KETENTUAN	NILAI Ct	KETERANGAN
Control Inhibitor di cycling Yellow (Intenal Control)	28 - 32	Tidak ada inhibitor , sebagai indicator diterima / tidaknya suatu reaksi
Sampel Positif di cycling Green	≤35	-

Catatan :

- Untuk menentukan Treshold (keberterimaan Treshold) adalah 0,9 -1,1 (efisiensi reaksi)
- Cycle Yellow : Untuk melihat kondisi sampel yang di PCR
- Inhibitor : untuk PMI , apabila ada 1 plate yang tidak memenuhi maka analisa tidak bisa di pakai , dan harus di ulang
- Cycle green : Untuk melihat target ada Babi atau Tidak
- NTC sebagai Control Master mix (tidak Boleh naik)
- Cycle Yellow semua sampel harus naik, artinya klo naik semua tidak ada inhibitor dari proses

Contoh Gambar kurva sigmoid :



Cara pengoperasian Alat Rotor PCR :

- Pilih Software yang ingin digunakan , ada 2 cara :

A. Rotor-gene Genecraft

B. Q-Rex

A. **Cara Rotor-gene Genecraft**

Double klik > Rotor Gene GeneCraft pada jendela windows

- Klik Icon Advanced
- Cari di folder Labkesda
- Klik Labkesda
- Klik Meriqon Pig Kit
- Klik New
- New Run Wizard > pilih Rotor Type 36-Well Rotor > show
- Cheklist > Looking ring Attached (gambar RotoR)
- Next > isi operator ; misal : Nama > isi Note (bila Perlu);misal : No. sampel/Lab
- Start Run
- Beri nama File > save file
- Beri Nama sampel dan Pilih type nya : unknown (untuk sampel) ; positif Control (untuk DNA Babi) ; NTC (untuk negative Control)

- Proses Running ditunggu sampai posisi Rotor StandBay

Cara pengolahan Data Hasil Running Rotor :

- Klik icon **Analysis** pada layar disebelah atas kanan
- **Klik Cycling A yellow** :
- untuk melihat Internal Control (QC. Reagen)
- Keluar Quantitation Analysis pada cycling yellow
- Klik posisi Linier scale menjadi Log Scale
- Isi Treshold 0,05 Klik kotak kecil sebelah kanan
- Klik kurva disembarang tempat (bisa digeser)
- Akan keluar angka Citi (CT) di quantity Results
- NILAI CT < 33 (apabila besar kemungkinan ada inhibitor di reagennya)

- **Klik Cycling A Green** > Untuk Melihat DNA hasil analisis
- Keluar Quantity Analysis pada cycling Green
- Klik posisi Linier scale menjadi Log Scale
- Isi Treshold 0,05 Klik kotak kecil sebelah kanan
- Klik kurva disembarang tempat (bisa digeser, diletakkan pada saat kurva mulai naik.
- Akan keluar angka Citi (CT) di quant Results
- NILAI CT
- Control Positif harus ada nilai CT nya
- Tidak ada nilai yang keluar di kolom CT berarti sama dengan 0 atau Negatif

Cara mendapatkan Report Data :

- 1, Klik Icon Report
- Klik Cycling Green , Pilih Quantitation (standart Report) > show
- Keluar Window Report , Klik > Tombol to Word (bisa diubah logonya)
- Klik Save in Microsoft Word > di print

*) cara yang sama dilakukan untuk mendapatkan report Cycling Yellow

Cara Q-Rex Rotorgene (terbaru)

Klik > **icon Q-Rek**

- User ID : admin
- Psw : (kosongkan)
- Pilih :
- New Experiment
  (apabila akan buat optimasi baru)
- Favorite Templete (Templete yang sering dipakai atau sudah di buat)
- Pilih : Templete : Food Mericon PigDNA
- General
  - Run Profile > Cek : - Rotor yang di gunakan
- Thermal Profile
- Chennel (gambar Kamera)

  Sampel Layout - Isi nama (sesuai dengan penempatan sampel pada rotor)

  Run Analysis

  Report/Exsport - Type , Klik Kanan isi : sampel ; NC ; PC; NTC

  Save Exsperiment - Save exsperiment as : File Name 05072023_mericonfood DNA)
- OK

  Start Run

  Analysis - Add Analysis > Basic

<table>
<tr><td rowspan="2">UPT LABKESDA
KOTA TANGERANG</td><td colspan="3">PENETAPAN IDENTIFIKASI DNA BABI PADA PRODUK PANGAN OLAHAN DAN PRODUK/SEDIAAN MENGANDUNG GELATIN METODE REAL TIME PCR</td></tr>
<tr><td>No. Dokumen
KALK : SOP/005LM/2025
KAN : IK.LKT-09/M5</td><td>No. Terbit/No.Revisi
2/2</td><td>Halaman
14/14</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="3">• Cek Green Cq/Ct/Takeoff
• Cek Yellow Cq/Ct/Takeoff
• Normalization
o Use Noise Slope Correction
• Cq Calculation
o isi Treshold 0,05

Report - Standar
✓ Basic
Generate Report
Save Exsperiment</td></tr>
<tr><td>UNIT TERKAIT</td><td colspan="3">Laboratorium Halal
Laboratorium Makanan dan Minuman</td></tr>
<tr><td>REFERENSI*</td><td colspan="3">1. Kit Qiagen-DNeasy mericon food kit
2. UU No. 33 Tahun 2014 , Tentang Jaminan Produk Halal
3. Fatwa Mui No.80 Tahun 2022 Tentang Produk Dan/Atau Bahan Yang Harus Dilakukan Uji Laboratorium.</td></tr>
</table>