



## Biosensor DNA Elektrokimia untuk Deteksi Makanan Mengandung Babi (*Sus scrofa*) Menggunakan *Screen Printed Carbon Electrode* Termodifikasi Emas

Shabarni Gaffar\*, Annisa Ilma Naviardianti, Santhy Wyantuti, Yeni Wahyuni Hartati

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran  
 Jalan Raya Bandung Sumedang Km 21. Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat 45363 Indonesia, Telp/Fax 022-7794391

\*Corresponding author: [shabarni.gaffar@unpad.ac.id](mailto:shabarni.gaffar@unpad.ac.id)

DOI: 10.20961/alchemy.18.1.50170.37-47

Received 08 April 2021, Accepted 09 December 2021, Published 01 March 2022

### Kata kunci:

babi (*Sus Scrofa*);  
 biosensor DNA;  
 elektrokimia;  
 SPCE-Au;  
 differential pulse  
 voltammetry.

**ABSTRAK.** Metode deteksi berbasis *deoxyribonucleic acid* (DNA) merupakan metode yang paling akurat, spesifik, dan sensitif untuk mengidentifikasi adanya campuran komponen babi dalam produk pangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan biosensor DNA secara elektrokimia menggunakan *Screen Printed Carbon Elektrode* termodifikasi emas (SPCE-Au) untuk mendeteksi DNA babi dalam makanan olahan. Permukaan SPCE dimodifikasi dengan emas menggunakan metode adsorpsi pasif, kemudian dikarakterisasi dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Differential Pulse Voltammetry* (DPV). DNA *probe* yang spesifik terhadap DNA mitokondria babi diimmobilisasi ke permukaan SPCE-Au melalui perantara gugus tiol. Proses hibridisasi DNA *probe*-DNA komplemen dikarakterisasi menggunakan DPV berdasarkan sinyal oksidasi guanin. Kondisi percobaan dioptimasi menggunakan desain eksperimen *Box-Behnken*, yaitu konsentrasi DNA *probe* (0,5; 1,0; 1,5  $\mu\text{g/mL}$ ), waktu imobilisasi DNA *probe* (10, 20, 30 menit), dan waktu hibridisasi DNA *probe*-DNA komplemen (5, 10, 15 menit). Kondisi optimum digunakan untuk menentukan respons arus oksidasi guanin menggunakan DPV terhadap variasi konsentrasi DNA komplemen. Selanjutnya, biosensor DNA diaplikasikan terhadap sampel bakso yang mengandung campuran daging babi, ayam, dan sapi. Hasil penelitian menunjukkan modifikasi SPCE dengan Au menghasilkan peningkatan arus yang diuji menggunakan sistem redoks  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  secara DPV. Kondisi optimum percobaan adalah: konsentrasi DNA *probe* 1  $\mu\text{g/mL}$ , waktu imobilisasi DNA *probe* 20 menit, dan waktu hibridisasi DNA *probe*-DNA komplemen 10 menit. Biosensor DNA ini memiliki batas deteksi 0,31  $\mu\text{g/mL}$ , batas kuantifikasi 1,06  $\mu\text{g/mL}$  dan *recovery* 99,2% untuk rentang konsentrasi 0,1 – 2  $\mu\text{g/mL}$ . Deteksi sampel bakso menggunakan biosensor DNA menunjukkan peningkatan respons arus yang signifikan pada sampel yang mengandung 100% daging babi (3,417  $\mu\text{A}$ ) dan masih dapat mendeteksi adanya kandungan daging babi sampai 1%. Metode biosensor DNA babi menggunakan SPCE-Au tanpa indikator dan biokonjugat yang dikembangkan lebih sederhana dan cepat dan mudah untuk diaplikasikan ke sampel nyata.

### Keywords:

pork (*Sus Scrofa*);  
 DNA biosensor;  
 electrochemical;  
 SPCE-Au;  
 differential pulse  
 voltammetry.

**ABSTRACT.** Electrochemical DNA Biosensor for Detection of Pork (*Sus scrofa*) Using Gold Modified Screen Printed Carbon Electrode. The DNA-based detection method is the most accurate, specific, and sensitive method for identifying the presence of a mixture of pork components in food products. This study aims to develop an electrochemical DNA biosensor using a gold-modified Screen Printed Carbon Electrode (SPCE-Au) to detect pork DNA in processed food. The surface of the SPCE was modified with gold using a passive adsorption method, then characterized by scanning electron microscopy (SEM) and differential pulse voltammetry (DPV). The *probe* DNA specific to porcine mitochondrial DNA was immobilized to SPCE-Au surface via an intermediate thiol group. The hybridization of *probe* DNA-complement DNA was characterized using DPV based on the guanine oxidation signal. The experimental conditions were optimized using the Box-Behnken experimental design by applying *probe* DNA concentration (0.5; 1.0; 1.5  $\mu\text{g/mL}$ ), the immobilization of the *probe* DNA (10, 20, 30 minutes), and the hybridization of the *probe* DNA-complement DNA (5, 10, 15 minutes). The optimum conditions were used to determine the DPV current response vs. complementary DNA concentrations. Furthermore, the DNA biosensors were applied to meatball samples containing a mixture of pork, chicken, and beef. The results showed that modification of SPCE with Au produced an increase in current responses tested using  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  redox system by DPV. The optimum conditions of the experiment were: *probe* DNA concentration was 1  $\mu\text{g/mL}$ , time to immobilize *probe* DNA was 20 minutes, and time to hybridize *probe* DNA-complement DNA was 10 minutes. The limit of detection, limit of quantification and percent recovery of DNA biosensor was 0.31  $\mu\text{g/mL}$ , 1.06  $\mu\text{g/mL}$  and 99.2%, respectively. Detection of meatball samples by DNA biosensor showed a significant increase of current response for sample that contains 100% swine DNA (3.417  $\mu\text{A}$ ). The biosensor is still able to detect the pork content until 1%. The pork DNA biosensor using SPCE-Au without indicator and bioconjugate developed in this study is simpler and applicable to real samples.

## PENDAHULUAN

Jaminan keaslian produk makanan merupakan sesuatu yang harus diperhatikan untuk memberikan rasa aman dan kepercayaan pada konsumen. Pencampuran daging dari spesies yang berbeda ke dalam produk makanan olahan telah dipraktikkan secara umum di beberapa negara. Oleh karena itu, konsumen menuntut kualitas produk makanan dengan label yang sesuai untuk berbagai alasan, seperti alasan kesehatan, vegetarian atau larangan agama, seperti Muslim dan Hindu (Nakyinsige *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015).

Pengembangan metode yang lebih cepat dan akurat untuk mengidentifikasi spesies dalam komoditas pangan, seperti mendeteksi daging babi dalam makanan masih terus dilakukan. Berbagai metode analitik yang telah dikembangkan untuk identifikasi babi, diantaranya adalah metode berbasis lipid (Rohman *et al.*, 2011; Stachniuk *et al.*, 2021), metode berbasis protein/*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Adam *et al.*, 2017; Mandli *et al.*, 2018), dan metode berbasis DNA (Ali *et al.*, 2012; Ha *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2016; Soman *et al.*, 2020).

Metode analisis berbasis DNA memiliki beberapa keuntungan, yaitu sifat DNA yang tahan terhadap panas sehingga memungkinkan untuk menganalisis produk makanan yang dimasak dengan suhu tinggi dan DNA merupakan molekul yang stabil pada proses ekstraksi (Piskata *et al.*, 2019). Selain itu, DNA dapat ditemukan pada semua tipe sel dengan informasi genetik yang lestari sehingga analisis DNA sangat mungkin dikerjakan dari beberapa tipe sampel yang berbeda (Ahmed *et al.*, 2017).

Metode deteksi berbasis DNA pada umumnya melalui tahapan amplifikasi DNA yang memperbanyak suatu gen target menggunakan primer oligonukleotida, *probe* yang spesifik dan enzim termostabil, yang dilakukan menggunakan suatu alat *thermo cycler*. Metode ini sangat akurat untuk mengidentifikasi suatu spesies, tetapi pengerjaannya memerlukan waktu yang cukup lama, peralatan yang mahal, dan tenaga terlatih. DNA mitokondria (mtDNA) merupakan target DNA yang paling banyak digunakan karena jumlah *copy*nya yang banyak dan memiliki urutan yang spesifik yang dapat dijadikan sebagai DNA *fingerprint*. Gen yang sering digunakan untuk identifikasi adalah gen sitokrom B (Cyt B) dan daerah D-loop pada DNA mitokondria karena memiliki daerah yang bervariasi sehingga dapat digunakan untuk membedakan spesies (Nguyen *et al.*, 2016).

Sejumlah pengembangan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang akhir-akhir ini digunakan untuk identifikasi DNA babi, diantaranya adalah PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Ali *et al.*, 2011a), spesies spesifik PCR (Hafidz *et al.*, 2020); *realtime* PCR menggunakan *probe* spesifik dengan target gen Cyt B (Ali *et al.*, 2012), target D-loop (Kim *et al.*, 2016); PCR - QIAxcel *capillary electrophoresis system* dengan target Cyt B dan D-loop (Barakat *et al.*, 2014); serta PCR - *Forensically Informative Sequencing* (PCR-FINS) dengan target gen Cyt B dan ATP *synthase* (Soman *et al.*, 2020).

Metode deteksi DNA dengan biosensor memberikan kemudahan karena tidak memerlukan proses amplifikasi DNA sehingga dapat memenuhi kebutuhan metode analisis yang cepat, akurat, sensitif, dan mudah serta murah. Beberapa biosensor telah dikembangkan untuk identifikasi DNA babi dalam campuran daging, seperti sensor kolorimetri menggunakan *gold nanoparticles* (GNPs) (Ali *et al.*, 2011b), DNA sensor elektrokimia menggunakan rutenium (Halid *et al.*, 2015) dan biosensor *fiber optic* (Torelli *et al.*, 2017).

Biosensor elektrokimia memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan sensor DNA lainnya, yaitu sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, respons cepat, mudah dioperasikan, dapat dibuat miniatur sehingga mudah dibawa, kompatibel dengan teknik mikro, instrumen yang diperlukan sederhana, dan produksi ekonomis (Rashid and Yusof, 2017). Elektroda merupakan komponen penting untuk transmisi sinyal pada biosensor elektrokimia. Elektrode berbasis karbon banyak digunakan karena karbon memiliki arus latar belakang yang rendah, rentang potensial yang luas, inert, dan relatif lebih murah (Lucarelli *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012). *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) merupakan salah satu elektrode kerja berbasis karbon yang banyak dikembangkan. SPCE memiliki beberapa kelebihan, seperti mudah dibawa, mudah digunakan, analisis cepat, efisiensi tinggi, biaya rendah, dan ukuran sampel yang kecil sehingga sangat prospektif untuk pengembangan sensor (Parkash *et al.*, 2014). Modifikasi SPCE dilaporkan dapat meningkatkan selektivitas elektroda terhadap analit. SPCE yang dimodifikasi dengan emas akan memberikan hasil stabilitas yang baik sehingga akan meningkatkan respons arus yang dihasilkan karena emas memiliki konduktivitas yang baik (Chan *et al.*, 2016; Rana *et al.*, 2017).

Penggunaan biokonjugat pada biosensor elektrokimia bermanfaat untuk meningkatkan sensitivitas. Biokonjugat yang mengandung nanopartikel dapat meningkatkan sensitivitas dan selektivitas, dan meningkatkan rasio *signal* versus blanko (Emami *et al.*, 2014). Hartati *et al.* (2019) menggunakan SPCE termodifikasi emas dan biokonjugat berupa DNA *probe*-nano partikel emas untuk deteksi mtDNA babi. Hasil pengukuran menunjukkan batas deteksi 0,58 µg/mL dari rentang konsentrasi DNA komplementer 0 – 5 µg/mL. Sementara itu, penggunaan SPCE termodifikasi grafen menghasilkan batas deteksi 1,76 µg/mL untuk *range* konsentrasi 0 – 10 µg/mL (Hartati

*et al.*, 2020). Kedua penelitian ini menggunakan DNA *probe* yang dilaporkan oleh Ali *et al.* (2012). Penelitian biosensor DNA babi masih terus dilakukan untuk mendapatkan biosensor yang lebih sensitif dan sederhana, salah satunya dengan menggunakan SPCE termodifikasi emas tanpa menggunakan biokonjugat dan menggunakan *probe* yang lain. Oleh karena itu, pada penelitian ini kami mengembangkan biosensor elektrokimia tanpa label dan tanpa biokonjugat menggunakan SPCE-Au untuk deteksi DNA babi. Metode ini lebih sederhana dan mudah dilakukan dibanding penggunaan biokonjugat. Selain itu, penelitian ini menggunakan DNA *probe* baru yang dilaporkan oleh Fajriyah *et al.* (2021).

## METODE PENELITIAN

### Alat

SPCE 2MM (GSI Technologies, USA), potensiostat ZP yang terhubung ke komputer menggunakan *software* PSTrace 5.4 (Zimmer & Pecock, UK), *Scanning Electron Microscope* (SEM) Hitachi SU3500 *With EDAX Octane Pro* (Tokyo, Japan), *Microcentrifuge* MicroCL 17R (Thermo Fisher Scientific, Jerman), *Multimode reader* (Tecan, Switzerland), *Autoclave* Medical 2100 (Prestige, USA), neraca analitik AL204 (Mettler Toledo, USA), vorteks (Boeco V-1 plus, Jerman), *hot plate*, *magnetic stirrer*, pipet mikro dan tabung mikro, tip pipet mikro, dan peralatan gelas.

### Bahan

DNA *probe*; 5'-/5ThioMC6-D/TATTIATACCAATCACTAIC-3' (Fajriyah *et al.*, 2021), DNA komplemen sintetik; 5'-GCTAGTGATTGGTATCAATA-3' disintesis oleh *Integrated DNA Technology* (Singapore). Asam kloroaurat (HAuCl<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O), natrium hidroksida (NaOH), asam asetat glasial (CH<sub>3</sub>COOH), kalium ferisianida (K<sub>3</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>]), asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), kalium klorida (KCl) dari Merck (Jerman). *Phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4, (Sigma Aldrich). QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen), Enzim restriksi *Bam*HI (New England Biolabs), agarosa, *buffer* Tris-Acetic acid-EDTA, 1000 bp DNA Ladder, *nuclease free water* (Thermo Scientific, Jerman), SyBR<sup>®</sup> *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA). Sampel daging segar (babi, ayam, dan sapi) (YOGYA supermarket, Bandung) dan aqua-dm (PT. Ikapharmindo Putramas, Jakarta).

### Modifikasi Permukaan SPCE dengan Emas

SPCE dicuci dengan pencelupan ke dalam aqua-dm, kemudian ditetaskan 40 µL HAuCl<sub>4</sub> (1021,8 ppm) dan dielektrodeposisi menggunakan DPV dengan rentang potensial -0,5 V sampai +0,5 V dan laju pemindaian 0,008 V/s (Hu *et al.*, 2014). Kemudian, SPCE dibilas dengan aqua-dm dan dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya, SPCE dan SPCE-Au dikarakterisasi menggunakan DPV dengan cara: ditetaskan 40 µL K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 10 mM dalam KCl 0,1 M. SPCE sebelum dan sesudah modifikasi dikarakterisasi dengan SEM.

### Imobilisasi DNA *Probe* pada SPCE-Au dan Hibridisasi dengan DNA Komplemen

SPCE-Au dicuci dengan aqua-dm, kemudian ditetaskan 40 µL DNA *probe* (1,0 µg/mL) pada permukaan SPCE-Au dan diinkubasi selama 20 menit (waktu optimum) pada 25 °C. Setelah inkubasi, SPCE-Au dicuci kembali dengan PBS (pH 7,4). Respons arus sinyal oksidasi guanin ditentukan secara DPV pada rentang potensial -0,2 V sampai +1,4 V dengan *scan rate* 0,008 V/s.

Pada penentuan respons arus setelah hibridisasi, pada SPCE-Au-DNA *probe* ditetaskan 40 µL DNA komplemen (2 µg/mL) dan diinkubasi pada waktu hibridisasi optimum (10 menit). Respons arus oksidasi guanin ditentukan secara DPV pada rentang potensial -0,2 V hingga +1,4 V dengan *scan rate* 0,008 V/s.

### Optimasi Parameter-Parameter yang Mempengaruhi Percobaan

Parameter percobaan yang dioptimasi adalah: konsentrasi DNA *probe* (X<sub>1</sub>), waktu imobilisasi (X<sub>2</sub>), dan waktu hibridisasi (X<sub>3</sub>). Setiap faktor dibuat tiga variasi, yaitu varian terendah (-1), menengah (0), dan tertinggi (+1) seperti yang diperlihatkan pada Tabel 1. Respons arus hasil percobaan diolah dan ditentukan nilai optimumnya menggunakan desain eksperimen *Box-Behnken* dengan program *Minitab* 18.

**Tabel 1.** Desain eksperimen *Box-Behnken* untuk menentukan kondisi optimum percobaan.

Faktor	Satuan	Varian		
		-1	0	+1
Konsentrasi DNA <i>probe</i>	µg/mL	0,5	1,0	1,5
Waktu imobilisasi	menit	10	20	30
Waktu hibridisasi	menit	5	10	15

### Pembuatan Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat dengan menentukan respons arus variasi konsentrasi DNA komplemen, yaitu 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; dan 2 µg/mL pada kondisi optimum. Sinyal oksidasi guanin diukur pada kondisi optimum menggunakan DPV pada rentang potensial -0,2 V sampai +1,4 V dengan *scan rate* 0,008 V/s. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot puncak arus setiap pengukuran terhadap variasi konsentrasi DNA komplemen dan diperoleh persamaan  $y = bx + a$ . Slope (b) merupakan nilai sensitivitas dari metode yang digunakan. Batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ) dihitung menggunakan rumus  $k \times \frac{S_b}{b}$ , dimana k adalah ulangan dan  $S_b$  adalah simpangan baku,  $k = 3$  untuk batas deteksi dan  $k = 10$  untuk batas kuantifikasi.

### Preparasi DNA Sampel

Daging babi, ayam, dan sapi yang telah dipreparasi menjadi bakso dengan perbandingan berat tertentu, dihaluskan dan ditimbang sebanyak 5 g kemudian diisolasi menggunakan *QIAprep® Spin Miniprep Kit* mengikuti protokol. Isolat DNA divisualisasi dengan elektroforesis agarosa 1% dan dikuantifikasi secara spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm. Rasio serapan 260 nm/280 nm juga ditentukan untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA. Sebanyak 1,0 µg DNA dipotong dengan enzim *BamHI* mengikuti protokol dan dikarakterisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa.

### Penentuan Respons Arus Biosensor DNA terhadap DNA Sampel

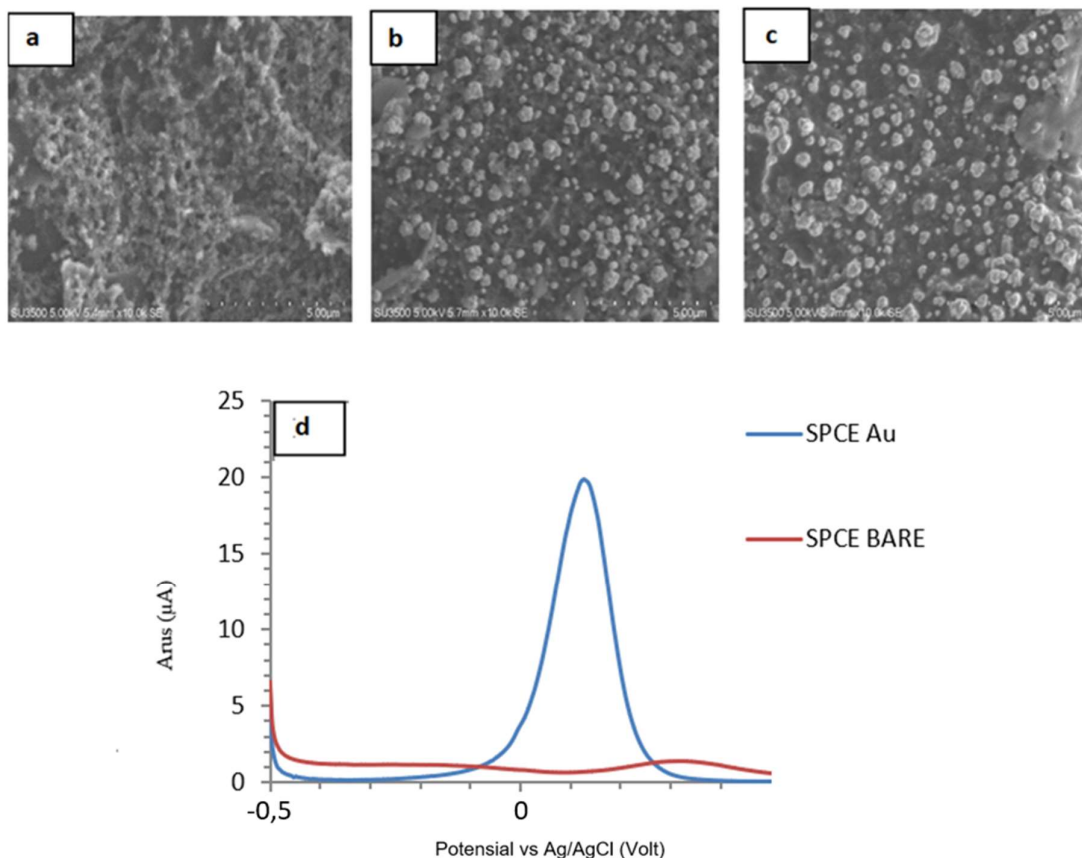
DNA sampel yang telah dipotong dengan enzim restriksi diencerkan hingga 15 kali, kemudian didenaturasi pada suhu  $\pm 95$  °C dalam penangas air selama 10 menit selanjutnya didinginkan dalam wadah es selama 10 detik. Sebanyak 40 µL DNA ditetaskan pada SPCE-Au/DNA *probe*, diinkubasi selama 20 menit. Selanjutnya, elektrode direndam dalam PBS pH 7,4 selama 10 detik. Sinyal oksidasi guanin diukur menggunakan DPV pada rentang potensial -0,2 V sampai +1,4 V dengan *scan rate* 0,008 V/s.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Modifikasi dan Karakterisasi SPCE-Au

Hasil karakterisasi morfologi permukaan SPCE sebelum dan setelah dimodifikasi emas serta setelah imobilisasi DNA *probe* menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada permukaan SPCE sebelum dan sesudah elektrodeposisi dengan emas. SPCE *bare* terlihat lebih halus, rata, dengan pori-pori seragam. Sementara itu, SPCE-Au memiliki permukaan lebih kasar dan terdapat butiran kecil partikel emas yang menutupi elektrode secara merata. Selanjutnya, permukaan SPCE-Au terlihat lebih tertutup rapat oleh partikel-partikel kecil setelah imobilisasi DNA *probe* ([Gambar 1](#)).

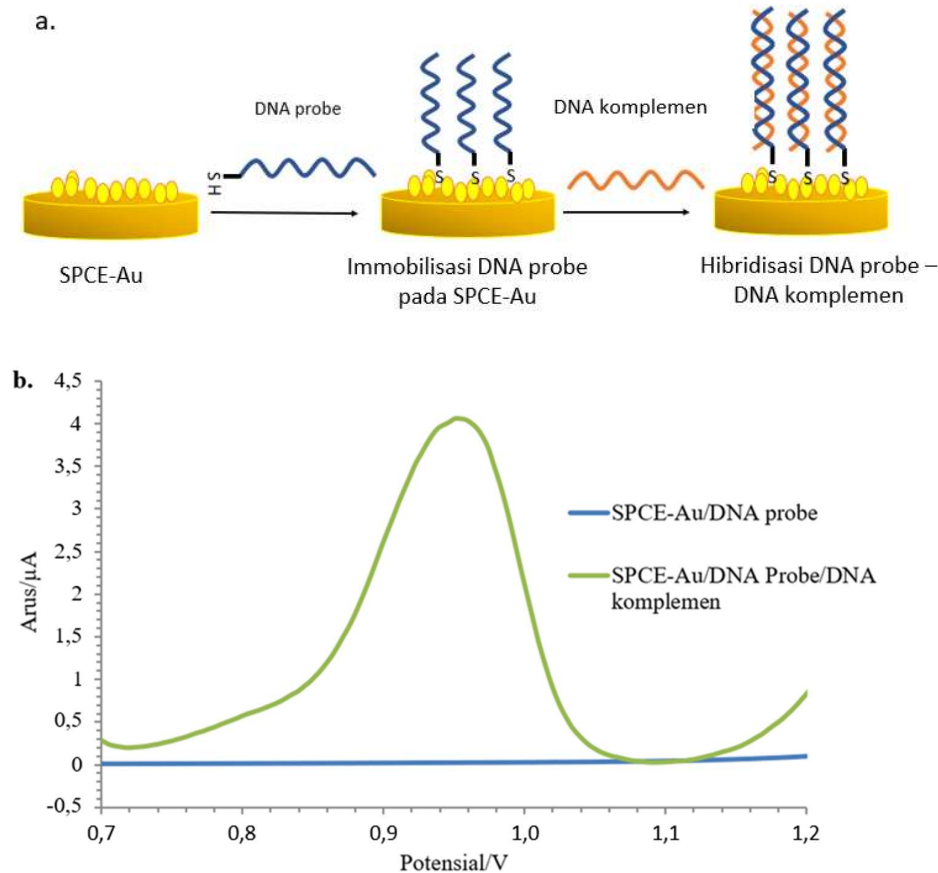
Modifikasi SPCE dengan emas bertujuan untuk meningkatkan sensitivitas dan selektivitas SPCE karena emas memiliki konduktivitas listrik yang tinggi yang berkontribusi pada transfer elektron antara permukaan elektrode dan biomolekul, sehingga meningkatkan sensitivitas sensor elektrokimia ([Lucarelli \*et al.\*, 2004](#)). SPCE sebelum dan setelah modifikasi dikarakterisasi menggunakan DPV pada rentang potensial -0,5 V sampai +0,5 V, *scan rate* 0,008 V/s. Larutan  $K_3[Fe(CN)_6]$  20 mM dalam KCl 0,1 M digunakan sebagai sumber elektron untuk memfasilitasi terjadinya reaksi *redoks*. SPCE-Au menghasilkan puncak arus yang lebih tinggi, yaitu 19,716 µA dibandingkan SPCE *bare* (0,736 µA) ([Gambar 1](#)). Emas yang menempel pada permukaan SPCE berfungsi memfasilitasi transfer elektron sehingga menaikkan puncak arus.



**Gambar 1.** Morfologi permukaan SPCE yang diamati dengan SEM perbesaran 10.000x (a) SPCE *bare*, (b) SPCE-Au, dan (c) SPCEAu/DNA *probe*; (d) Voltammogram DPV SPCE dan SPCE-Au menggunakan sistem *redoks*  $K_3[Fe(CN)_6]$  20 mM dalam 0,1 M KCl. Laju pemindaian 0,008 V/s pada rentang potensial -0,5 V sampai +0,5V.

#### Imobilisasi DNA *probe* pada SPCE-Au dan Hibridisasi DNA *probe*-DNA Komplemen

DNA *probe* diimobilisasi pada permukaan SPCE-Au melalui interaksi antara Au dengan gugus tiol pada ujung 5'DNA *probe* sehingga membentuk *self-assembled monolayer* (SAM) (Gambar 2a). Interaksi antara Au dan gugus tiol terjadi berdasarkan prinsip kemisorpsi sehingga membentuk ikatan kovalen Au-S (Rashid and Yusof, 2017). Pada penelitian ini, terjadinya hibridisasi DNA dideteksi secara elektrokimia dengan adanya puncak oksidasi guanin menjadi 8-Oksoguanin tanpa menggunakan indikator *redoks* eksternal. Penempelan DNA *probe* pada SPCE-Au tidak menghasilkan respons arus karena guanin pada DNA *probe* disubstitusi dengan Inosin yang tidak mudah teroksidasi. Gambar 2b menunjukkan hasil penentuan sinyal oksidasi guanin pada SPCE-Au yang terimobilisasi DNA *probe* dan hibrida DNA *probe*-DNA komplemen. Terbentuknya hibrida DNA *probe*-DNA komplemen menghasilkan sinyal oksidasi guanin pada rentang potensial sekitar 0,95 V dengan tinggi arus puncak 4,145  $\mu$ A. Pada elektrode karbon, puncak oksidasi guanin pada untai DNA diperoleh pada rentang 0,8 V – 1,0 V (Rashid and Yusof, 2017).



**Gambar 2.** (a) Skema alat biosensor DNA babi. (b). Puncak arus DPV SPCE-Au/DNA *probe* dan SPCE-Au/DNA *probe*/DNA komplemen. Konsentrasi DNA *probe* dan DNA komplemen yang digunakan masing-masing adalah 1 dan 2  $\mu\text{g/mL}$ . *Scan rate* 0,008 V/s pada rentang potensial 0,7 V sampai 1,2 V.

### Penentuan Kondisi Optimum Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Percobaan dengan Desain Eksperimen *Box-Behnken*

Tiga faktor, yaitu konsentrasi DNA *probe* ( $X_1$ ), waktu immobilisasi DNA *probe* ( $X_2$ ), dan waktu hibridisasi DNA *probe*- DNA komplemen ( $X_3$ ) dipilih untuk dioptimasi pada penelitian ini. Setiap faktor bervariasi pada tiga tingkatan yang berbeda, yaitu varian terendah (-1), menengah (0), dan tertinggi (+1). Desain faktorial penuh membutuhkan  $3 \times 3 \times 3$  atau 27 kombinasi yang berbeda dari ketiga faktor ini. Desain *Box-Behnken* mengurangi jumlah ini menjadi 15 kemudian dilakukan 2 kali pengulangan sehingga jumlah total percobaan adalah 30 kali. Respons arus hasil pengukuran (Tabel S1) diolah dengan program *minitab* sehingga diperoleh Persamaan 1,

$$Y = -2,76 + 3,59 X_1 + 0,1801 X_2 + 0,147 X_3 - 1,823 X_1^2 - 0,00470 X_2^2 - 0,00705 X_3^2 + 0,0206 X_1 X_2 + 0,0047 X_1 X_3 - 0,00048 X_2 X_3 \quad (1)$$

Keterangan:

Y = Respons arus ( $\mu\text{A}$ )

$X_1$  = Konsentrasi DNA *probe*

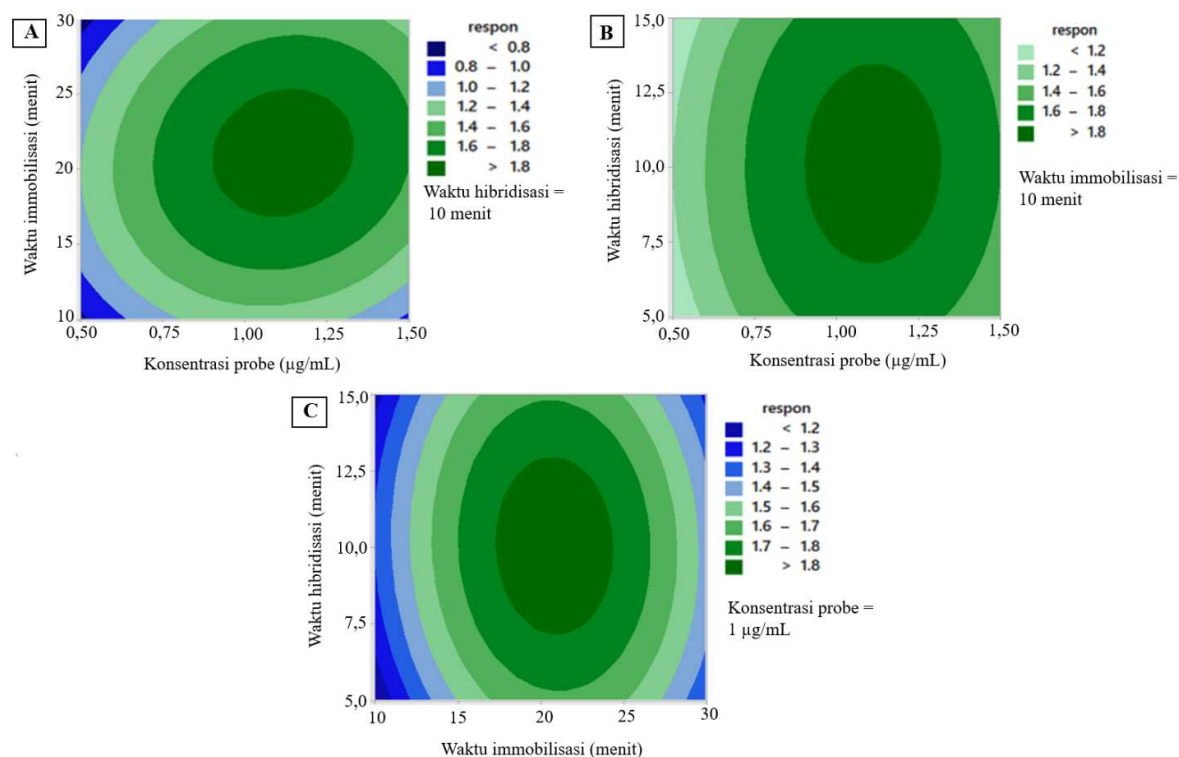
$X_2$  = Waktu immobilisasi

$X_3$  = Waktu hibridisasi.

Faktor yang bernilai negatif berpengaruh menurunkan respons sedangkan faktor yang bernilai positif berpengaruh meningkatkan respons. Pasangan faktor yang menurunkan respons adalah waktu immobilisasi dan waktu hibridisasi, sedangkan faktor yang menaikkan respons arus adalah konsentrasi DNA *probe* dan waktu immobilisasi serta konsentrasi DNA *probe* dan waktu hibridisasi. Uji signifikansi untuk mengetahui pengaruh dari

berbagai variabel yang diuji dengan ANOVA menunjukkan faktor yang menaikkan respons berpengaruh secara signifikan terhadap percobaan karena nilai  $P < 0,05$ , yaitu konsentrasi DNA *probe* ( $P = 0,017$ ) dan waktu immobilisasi DNA-*probe* ( $P = 0,014$ ). *Lack of Fit* (LOF) atau penyimpangan terhadap model linier orde pertama menghasilkan nilai  $P_{lack\ of\ fit} = 0,951$ , artinya LOF tidak bermakna karena nilainya lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan model linier yang digunakan sudah sesuai (Tabel S2).

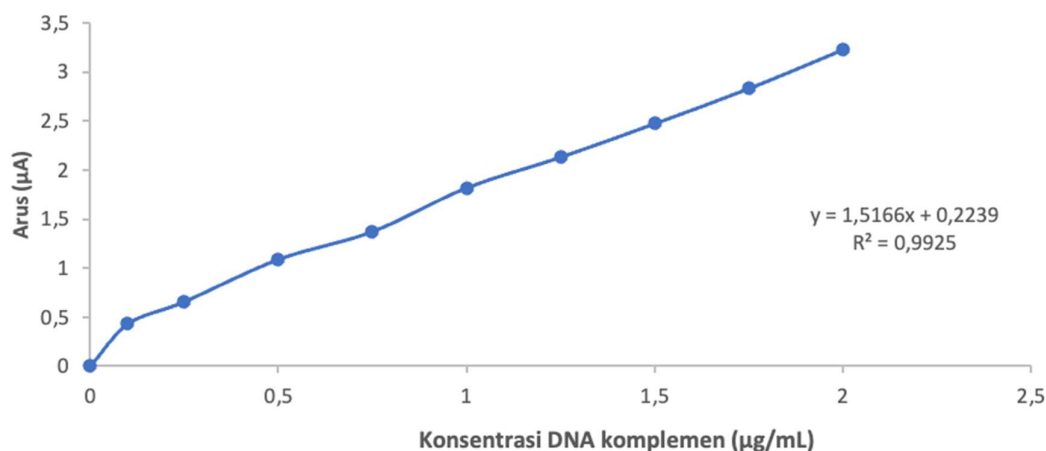
Salah satu cara untuk menunjukkan model *response surface* adalah membuat plot kontur respons arus versus tiga faktor yang diuji. Gambar 3 menunjukkan plot kontur yang dihasilkan terdiri dari berbagai variasi warna, dimana masing-masing variasi menunjukkan *range* besarnya respons yang dihasilkan. Interaksi antar faktor dan nilai optimum tiap faktor dapat diketahui dari plot kontur (Gambar 3). Respons tertinggi ditunjukkan oleh daerah berwarna hijau tua pada plot kontur yang terletak pada bagian tengah plot seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3 sehingga dapat diketahui nilai yang diperoleh optimum untuk interaksi dari ketiga faktor yang mempengaruhi. Kondisi optimum yang digunakan pada penelitian ini adalah percobaan yang menghasilkan respons arus tertinggi diantara 30 percobaan. Kondisi optimum percobaan yang diperoleh melalui desain eksperimen *Box-Behnken* adalah konsentrasi *probe* 1  $\mu\text{g/mL}$ ; waktu immobilisasi 20 menit; dan waktu hibridisasi 10 menit.



**Gambar 3.** Plot kontur respons arus terhadap a) Konsentrasi *probe* dan waktu immobilisasi. b) konsentrasi *probe* dan waktu hibridisasi c) waktu immobilisasi dan waktu hibridisasi.

### Kurva Kalibrasi dan Parameter Analitik

Hubungan antara konsentrasi DNA komplemen dengan puncak oksidasi guanin digunakan untuk membuat kurva standar dan diperoleh persamaan garis  $y = 1,5166x + 0,2239$  dimana  $y$  adalah respons arus,  $x$  konsentrasi analit,  $a$  intersep, dan  $b$  adalah kemiringan (*slope*) dengan koefisien korelasi 0,9925 sehingga rentang konsentrasi DNA komplemen 0,1 – 2  $\mu\text{g/mL}$  menghasilkan hubungan linier yang cukup baik antara konsentrasi dengan arus yang dihasilkan (Gambar 4).



**Gambar 4.** Kurva kalibrasi sinyal oksidasi guanin terhadap DNA komplemen (0,1 – 2 µg/mL).

Berdasarkan persamaan kurva standar, dapat ditentukan sensitivitas biosensor, yaitu dari nilai kemiringan (*slope*) kurva standar. Sensitivitas sensor menunjukkan seberapa jauh kepekaan sensor terhadap kuantitas yang diukur. Semakin besar nilai sensitivitas sebuah sensor, maka semakin peka sensor tersebut, sehingga semakin baik pula kualitas sensor tersebut. Berdasarkan kurva standar  $y = 1,5166x + 0,2239$  dapat disimpulkan bahwa metode analisis kandungan DNA babi menggunakan SPCE-Au secara elektrokimia ini memiliki sensitivitas yang baik.

Batas deteksi/konsentrasi terkecil yang masih dapat dideteksi dengan baik oleh SPCE-Au adalah 0,319 µg/mL. Batas kuantitasi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat diukur dengan akurat dan presisi oleh alat/instrumen. Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh batas kuantifikasi, yaitu 1,06 µg/mL (Tabel S3). Batas deteksi yang diperoleh pada penelitian ini lebih kecil dibandingkan dengan penelitian biosensor DNA lainnya untuk deteksi babi yang menggunakan *probe* berbeda, seperti yang terlihat pada Tabel 2. Pemilihan urutan *probe*, metoda deteksi dan modifikasi elektroda kemungkinan besar mempengaruhi sensitivitas dari biosensor DNA.

**Tabel 2.** Perbandingan batas deteksi biosensor DNA untuk deteksi DNA babi dari beberapa penelitian.

Topik Penelitian	Batas Deteksi	Metode Deteksi	Referensi
Biosensor elektrokimia menggunakan SPCE termodifikasi grafena oksida	1,76 µg/mL	Oksidasi guanin	Hartati <i>et al.</i> , 2020
Biosensor elektrokimia menggunakan biokonjugat AuNP dan SPCE termodifikasi emas	0,58 µg/mL	Indikator metilen biru	Hartati <i>et al.</i> , 2019
Sensor nanopartikel emas (kolometri)	4 µg/mL	kolorimetri	Ali <i>et al.</i> , 2012
Biosensor elektrokimia menggunakan SPCE termodifikasi emas	0,319 µg/mL	Oksidasi guanin	Penelitian ini

Selanjutnya, nilai presisi, akurasi, dan *recovery* diperoleh dengan melakukan enam kali pengukuran pada satu konsentrasi DNA komplemen, yaitu 0,75 µg/mL. Presisi menyatakan kedekatan nilai-nilai dari dua atau lebih pengukuran dengan metode yang sama. Presisi (ketelitian) ditentukan dari harga koefisien variasi (%KV) dan diperoleh nilai presisi 98,25%. Akurasi merupakan tingkat kedekatan pengukuran kuantitas terhadap nilai yang sebenarnya. Berdasarkan perhitungan, diperoleh nilai akurasi sebesar 99,2%. Pengujian *recovery* dilakukan untuk melihat bahwa kadar yang diperoleh sesuai dengan kandungan sampel yang sebenarnya, dan diperoleh *recovery* 99,20%, menunjukkan hasil yang diperoleh masuk dalam rentang *recovery* yang baik (dalam rentang 80 – 100%) (Tabel S4).

#### Penentuan Respons Biosensor pada Sampel Daging

DNA diisolasi dari daging babi, sapi, dan ayam dan campuran daging dengan perbandingan tertentu menggunakan *QIAprep® Spin Miniprep Kit*, diikuti dengan karakterisasi dengan elektroforesis agarosa dan penentuan konsentrasi dan kemurnian dengan spektrofotometer *multimode reader*. Sampel yang digunakan pada



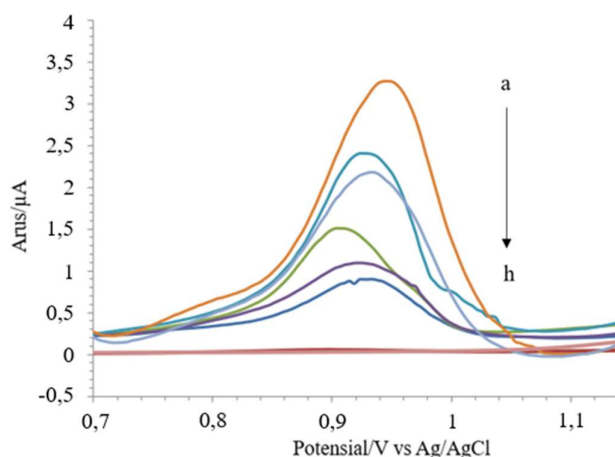
penelitian ini adalah sampel dalam bentuk bakso, yang berisi campuran daging babi, ayam, dan sapi dengan persentase tertentu (Tabel 3).

**Tabel 3.** Hasil kuantisasi isolat DNA.

Isolat DNA (%)	Absorbansi		Konsentrasi DNA (ng/ $\mu$ L)	Rasio $A_{260}/A_{280}$
	260	280		
A 100	0,1116	0,0561	111,6	1,99
B 100	0,0717	0,0365	71,7	1,96
S 100	0,0723	0,0361	72,3	2,00
B: A: S = 1: 74: 25	0,0787	0,0390	78,7	2,02
B: A: S = 5: 70: 25	0,0352	0,0177	35,2	1,99
B: A: S = 10: 65: 25	0,0481	0,0242	48,1	1,99
B: A: S = 20: 55: 25	0,0550	0,0281	55,0	1,96
B: A: S = 50: 25: 25	0,1505	0,0755	150,5	1,99

B= babi, A=ayam, S=sapi

Tabel 3 memperlihatkan konsentrasi DNA yang diperoleh cukup bervariasi namun dengan kemurnian yang sudah tinggi, yaitu dengan rasio diatas 1,9. Isolat DNA kemudian dipotong menggunakan enzim restriksi *Bam*HI. Enzim *Bam*HI memiliki tujuh situs pemotongan pada mtDNA babi, sehingga akan menghasilkan tujuh fragmen DNA dengan panjang yang berbeda-beda. Isolat DNA hasil restriksi digunakan untuk menguji respons arus. Sebanyak 40  $\mu$ L DNA hasil restriksi yang diencerkan 15 kali, didenaturasi pada suhu 95 °C selama 5 menit kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, kemudian diteteskan pada permukaan SPCE-Au/DNA-*probe*. Respons arus biosensor DNA terhadap isolat DNA dari sampel ditunjukkan pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Sinyal DPV oksidasi guanin dari isolat DNA sampel bakso. a) babi 100%; b) babi 50%; c) babi 20%; d) babi 10%; e) babi 5%; f) babi 1%; g) sapi 100%; h) ayam 100%.

Pada Gambar 5 terlihat terdapat peningkatan respons arus oksidasi guanin dengan adanya peningkatan kandungan babi dari campuran sampel. Semakin besar kandungan babi dalam sampel, semakin tinggi pula arus puncak yang terukur pada voltametri pulsa diferensial. Adanya DNA komplementer yang berhibridisasi dengan DNA *probe* pada elektrode menyebabkan kenaikan puncak arus. Pada sampel 100% ayam dan 100% sapi tidak ada arus puncak arus, artinya hibridisasi tidak terjadi karena urutan DNA pada sample ayam dan sapi tidak komplemen dengan urutan *probe*. Biosensor yang dikembangkan dapat mendeteksi DNA babi sampai kandungan daging babi 1%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa biosensor DNA tanpa label dan tanpa biokonjugat menggunakan SPCE-Au dapat digunakan untuk mendeteksi DNA babi dalam sampel makanan.

## KESIMPULAN

Modifikasi SPCE dengan emas meningkatkan respons arus  $K_3[Fe(CN)_6]$  pada DPV dari 0,736  $\mu$ A menjadi 19,716  $\mu$ A. Kondisi optimum biosensor DNA babi yang dikembangkan adalah konsentrasi DNA *probe* 1  $\mu$ g/mL, waktu imobilisasi DNA-*probe* 20 menit, dan waktu hibridisasi DNA-komplemen 10 menit. Sensitivitas biosensor

DNA babi sebesar 1,5139 untuk rentang konsentrasi DNA komplementer 0,1 – 2 µg/mL; batas deteksi 0,319 µg/mL; batas kuantifikasi 1,060 µg/mL; dan perolehan kembali 99,20%. Biosensor DNA babi menggunakan SPCE-Au berdasarkan sinyal oksidasi guanin dapat mendeteksi DNA babi dalam sampel sampai kandungan daging babi 1%.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Maulida Fajriyah atas *probe* yang digunakan pada penelitian ini. Penelitian ini didanai oleh Hibah Internal Universitas Padjadjaran No.3771/UN6.D/LT/2018.

#### INFORMASI PENDUKUNG

Informasi pendukung (*Supplementary Information*, SI) artikel ini dapat dilihat pada tautan <https://jurnal.uns.ac.id/alchemistry/rt/suppFiles/50170/0>.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adam, T.P., Kayleigh, K.F., Omar, N., and Rosalee, S.H., 2017. Comparison of Real-Time PCR and ELISA-based Methods for the Detection of Beef and Pork in Processed Meat Products. *Food Control* 71, 346–352. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.07.017.
- Ahmed, S.A., Pin, L.L., and Raabe, C.A., 2017. A Combined Rapid DNA Extraction and Multiplex PCR for the Detection of Porcine DNA in Raw and Processed Food. *Contemporary Issues and Development in the Global Halal Industry*, 201–208.
- Ali, M.E., Hashim, U., Mustafa, S., Che-Man, Y.B., Dhahi, T.S., Kashif, M., Uddin, M.K., and Abd Hamid, S.B., 2012. Analysis of Pork Adulteration in Commercial Meatballs Targeting Porcine-Specific Mitochondrial Cytochrome B Gene by TaqMan *probe* Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Meat Sciences* 91(4), 454–9. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.02.031.
- Ali, M.E., Hashim, U., Mustafa, S., and Che-Man, Y.B., 2011a. Swine-specific PCR-RFLP Assay Targeting Mitochondrial Cytochrome B Gene for Semiquantitative Detection of Pork in Commercial Meat Products. *Food Analytical Methods* 5, 613–623.
- Ali, M.E., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y.B., Yusop, M.H., Bari, M.F., Islam, K.N., and Hasan, M.F., 2011b. Nanoparticle Sensor for Label Free Detection of Swine DNA in Mixed Biological Samples. *Nanotechnology* 22(19), 195503. doi: 10.1088/0957-4484/22/19/195503.
- Barakat, H., El-Garhy, H.A., and Moustafa, M.M., 2014. Detection of Pork Adulteration in Processed Meat by Species-Specific PCR-QIAxcel Procedure Based on D-loop and *cytb* Genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(23), 9805–16. doi: 10.1007/s00253-014-6084-x.
- Chan, K.F., Lim, H.N., Shams, N., Jayabal, S., Pandikumar, A., and Huang, N.M., 2016. Fabrication of Graphene/Gold-Modified Screen-Printed Electrode for Detection of Carcinoembryonic Antigen. *Materials Science and Engineering* 58, 666–674.
- Emami, M., Shamsipur, M., and Irajirad, R., 2014. A Breast Cancer Biomarker Based on AntiHER2–iron Oxide Nanoparticle Bioconjugates. *The Analyst* 139, 2858–2866. doi: 10.1039/c4an00183d.
- Fajriyah, M., Rohmatulloh, Y., Gaffar, S., Angraeni, A., and Hartati, Y.W., 2019. Electrochemical Biosensor for Mitochondrial DNA of *Sus Scrofa* Detection using A Cerium-Modified Screen Printed Carbon Electrode, Proceedings of the 1st International Conference on Islam, Science and Technology, ICONISTECH.
- Ha, J., Kim, S., Lee, J., Lee, S., Lee, H., Choi, Y., Oh, H., and Yoon, Y., 2017. Identification of Pork Adulteration in Processed Meat Products using the Developed Mitochondrial DNA-based primers. *Korean Journal of Food Science Anim Resource* 37(3), 464–468. doi: 10.5851/kosfa.2017.37.3.464.
- Hafidz, M.M.M., Makatar, W.H., Adilan, H., and Nawawee, T., 2020. Detection of Pork in Processed Meat Products by Species-Specific PCR for Halal Verification: Food Fraud Cases in Hat Yai, Thailand. *Food Research* 4 (S1), 244–249. doi: 10.26656/fr.2017.4(S1).S21.
- Halid, N.I.A., Hasbullah, S.A., Ahmad, H., Heng, L.Y., Karim, N.H.A., and Harun, S.N., 2015. Electrochemical DNA Biosensor for Detection of Porcine Oligonucleotides using Ruthenium (II) Complex as Intercalator Redox. *AIP Conference Proceedings* 1614, 313. doi: 10.1063/1.4895214.
- Hartati, Y.W., Suryani, A.A., Agustina, M., Gaffar, S., and Anggraeni, A., 2019. A Gold Nanoparticle–DNA Bioconjugate–Based Electrochemical Biosensor for Detection of *Sus scrofa* mtDNA in Raw and Processed Meat. *Food Analytical Methods* 12(11), 2591–2600.

- Hartati, Y.W., Setiawati, T.A., Sofyatin, T., Fitrilawati, Anggraeni, A., and Gaffar, S., 2020. Electrochemical DNA Biosensor for Detection of Pork (*Sus scrofa*) using Screen Printed Carbon-Reduced Graphene Oxide Electrode, *Science Asia* 46, 72–79. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2020.011.
- Hu, C., Dou, W., and Zhao, G., 2014. Enzyme Immunosensor Based on Gold Nanoparticles Electroposition and Streptavidin-biotin System for Detection of *S. pullorum* and *S. gallinarum*. *Electrochimica Acta* 117, 239–245. doi: 10.1016/j.electacta.2013.11.132.
- Kim, M., Yoo, I., Lee, S.Y., Hong, Y., and Kim, H.Y., 2016. Quantitative Detection of Pork in Commercial Meat Products by TaqMan® Real-Time PCR Assay Targeting the Mitochondrial D-loop region. *Food Chemistry* 210, 102–6. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.084.
- Kumar, A., Kumar, R.R., Sharma, B.D., Gokulakrishnan, P., Mendiratta, S.K., and Sharma, D., 2015. Identification of Species Origin of Meat and Meat Products on the DNA Basis: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(10), 1340–1351. doi: 10.1080/10408398.2012.693978.
- Liu, Y., Dong, X., and Chen, P., 2012. Biological and Chemical Sensors Based on Graphene Materials. *Chemical Society Reviews* 41, 283–307. doi: 10.1039/C1CS15270J.
- Lucarelli, F., Marrazza, G., Turner, A.P., and Mascini, M., 2004. Carbon and Gold Electrodes as Electrochemical Transducers for DNA Hybridisation Sensors. *Biosensing and Bioelectronic* 19(6), 515–30. doi: 10.1016/s0956-5663(03)00256-2.
- Mandli, J., El Fatimi, I., Seddaoui, N., and Amine, A., 2018. Enzyme Immunoassay (ELISA/immunosensor) for a Sensitive Detection of Pork Adulteration in Meat. *Food Chemistry* 255, 380–389. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.184.
- Nakyinsige, K., Man, Y.B., and Sazili, A.Q., 2012. Halal Authenticity Issues in Meat and Meat Products. *Meat Science* 91(3), 207–14. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.02.015.
- Nguyen, H.D., Bui, T.A., Nguyen, P.T., Kim, O.T.P., and Vo, T.T.B., 2016. The Complete Mitochondrial Genome Sequence of the Indigenous I pig (*Sus scrofa*) in Vietnam. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 30(7), 930–937. doi: 10.5713/ajas.16.0608.
- Parkash, O., Yean, C.Y., and Shueb, R.H., 2014. Screen Printed Carbon Electrode Based Electrochemical Immunosensor for the Detection of Dengue NS1 Antigen. *Diagnostics* 4, 165–180. doi: 10.3390/diagnostics4040165.
- Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., and Borilova, G., 2019. The Quality of DNA Isolated from Processed Food and Feed via Different Extraction Procedures. *Molecules* 24(6), 1188. doi: 10.3390/molecules24061188.
- Rana, S., Mittal, S.K., Singh, N., Singh, J., and Banks, C.E., 2017. Schiff Base Modified Screen Printed Electrode for Selective Determination of Aluminium(III) at Trace Level. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 239, 17–27. doi: 10.1016/j.snb.2016.07.133.
- Rashid, J.I.A. and Yusof, N.A., 2017. The Strategies of DNA Immobilization and Hybridization Detection Mechanism in the Construction of Electrochemical DNA Sensor: A Review. *Sensing and Bio-Sensing Research* 16, 19–31. doi: 10.1016/j.sbsr.2017.09.001.
- Rohman, A., Sismindari, Erwanto, Y., and Che Man, Y.B., 2011. Analysis of Pork Adulteration in Beef Meatball using Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Meat Sciences* 88(1), 91–95. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.12.007.
- Soman, M., Paul, R.J., Antony, M., and Padinjarattath, S.S., 2020. Detecting Mislabelling in Meat Products using PCR-FINS. *Journal of Food Science Technology* 57(11), 4286–4292. doi: 10.1007/s13197-020-04641-w.
- Stachniuk, A., Sumara, A., Montowska, M., and Fornal, E., 2021. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Bottom-Up Proteomic Methods in Animal Species Analysis of Processed Meat for Food Authentication and the Detection of Adulterations. *Mass Spectrometry Reviews* 40(1), 3–30. doi: 10.1002/mas.21605.
- Torelli, E., Manzano, M., and Marks, R.S., 2017. Chemiluminescent Optical Fibre sensor for Porcine Meat Detection. *Sensors Actuators B: Chemical* 247, 868–874. doi: 10.1016/j.snb.2017.03.064.