

## IDENTIFIKASI DAGING BABI MENGGUNAKAN METODE PCR-RFLP GEN *Cytochrome b* DAN PCR PRIMER SPESIFIK GEN AMELOGENIN

Pork Identification Using PCR-RFLP of *Cytochrome b* Gene and Species Specific PCR of Amelogenin Gene

Yuny Erwanto<sup>1,3</sup>, Sugiyono<sup>2</sup>, Abdul Rohman<sup>3,4</sup>, Mohammad Zainal Abidin<sup>1</sup>, Dwi Ariyani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No 3, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

<sup>3</sup>Pusat Penelitian Produk Halal, Universitas Gadjah Mada, Jl. Kaliurang Km. 4, Sekip Yogyakarta 55281

<sup>4</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Kaliurang Km. 4, Sekip, Yogyakarta 55281

E-mail: yunyer@yahoo.com

### ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengaplikasikan metode deteksi daging babi dalam campuran daging dengan sapi, kambing dan ayam melalui PCR-RFLP dan PCR dengan primer spesifik untuk babi. Level kontaminasi daging babi dibuat sebesar 1, 3, 5 dan 10% dari total daging dalam campuran. Metode PCR-RFLP menggunakan sepasang primer yaitu gen *cytochrome b* dari mitokondria yang menghasilkan fragmen DNA sebesar 359 bp. Untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi babi dalam adonan daging tersebut diaplikasikan enzim restriksi BseDI yang dapat memotong DNA dari gen *cytochrome b* babi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen *cytochrome b* dari babi dapat terpotong menjadi dua fragmen yaitu sebesar 228 bp dan 131 bp. Untuk desain primer spesifik digunakan gen amelogenin yang mempunyai sekuen yang berbeda diantara ke empat spesies uji yaitu babi, sapi, ayam dan kambing. Primer spesifik didesain pada panjang fragmen sebesar 353 dan 312 bp. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kontaminasi daging babi sebesar 1% masih dapat terdeteksi dengan metode PCR-RFLP tetapi pengujian dengan primer spesifik yang ditujukan hanya untuk deteksi DNA babi masih menunjukkan reaksi silang dengan spesies hewan lain yaitu sapi, kambing dan ayam. Pengujian dengan PCR-RFLP pada gen *cytochrome b* menghasilkan hasil yang lebih baik dan jelas untuk pengujian kontaminasi babi dibandingkan dengan PCR dengan primer spesifik. Metode PCR-RFLP merupakan metode yang potensial untuk analisis deteksi keberadaan unsur babi pada produk olahan pangan khususnya untuk deteksi status kehalalan.

**Kata kunci:** Identifikasi, daging babi, gen *cytochrome b*, *amelogenin*, *polymerase chain reaction*

### ABSTRACT

A polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) and species specific PCR methods had been applied for identifying pork in mixture of meat. Pork sample in various levels (1, 3, 5 and 10%) was prepared in mixture with beef, chicken and mutton. The primary CYTb1 and CYTb2 were designed in the mitochondrial *cytochrome b* (*cytochrome b*) gene and PCR successfully amplified fragments of 359 bp. To distinguish pig species existence, the amplified PCR products of mitochondrial DNA were cut by *BseDI* restriction enzyme. The result showed that pig mitochondrial DNA was cut into 131 and 228 bp fragments. A polymerase chain reaction (PCR) method based on the nucleotide sequence variation in the amelogenin gene has been chosen for the specific identification of pork DNAs in mixture meat. The primers designed generated specific fragments of 353 and 312 bp length for pork. The specificity of the primary designed was tested on 4 animal species including pig, cattle, chicken and goat species. Analysis of experimental mixture meat demonstrated that 1% of raw pork tissues could be detected using PCR-RFLP with *BseDI* restriction enzyme but detection using species-specific PCR showed the cross reactivity to beef, chicken and mutton. The *cytochrome b* PCR-RFLP species identification assay yielded excellent results for identification of pig

species. PCR-RFLP is a potentially reliable technique for detection of the existence of pork in animal food product for Halal authentication.

**Keywords:** Pork identification, *cytochrome b*, amelogenin, polymerase chain reaction

## PENDAHULUAN

Penemuan produk makanan yang dipalsukan dengan campuran bahan yang tidak sesuai dengan yang tercantum dalam kemasan semakin banyak terungkap. Pemalsuan daging sapi dengan daging babi pada produk olahan daging seperti abon dan dendeng ditemukan oleh BPPOM. Produk tersebut beredar di berbagai kota besar di Indonesia (Republika, 2009). Penemuan beberapa kasus pencampuran bahan daging babi dalam keadaan segar dengan daging sapi juga pernah terjadi dan ini menunjukkan tidak hanya produk olahan saja yang dicampur babi namun juga daging segar. Upaya melakukan identifikasi telah dilakukan dengan berbagai metode dan metode yang dianggap paling valid saat ini adalah metode PCR dengan berbagai variasinya. Erwanto dkk., (2011) menggunakan metode PCR-RFLP untuk mendeteksi keberadaan daging babi dalam campuran dengan daging lain. Teknik molekular telah berkembang pada dua dekade terakhir yang memungkinkan pengembangan metode yang memudahkan dalam autentifikasi dan *reliable* untuk identifikasi jenis daging (Girish dkk., 2005). Kelemahan dalam metode PCR-RFLP adalah membutuhkan waktu yang panjang karena melalui dua tahap analisis penting yaitu PCR itu sendiri dan pemotongan DNA hasil PCR dengan enzim restriksi. Metode lain yang berkembang adalah metode deteksi dengan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) untuk mendeteksi kandungan lemak babi sehingga aplikasinya untuk mendeteksi daging babi yang sebagian besar merupakan protein membutuhkan preparasi sampel yang tidak mudah (Rohman dkk., 2011).

Laporan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa gen amelogenin terdapat pada kromosome X dan Y yang dapat digunakan untuk membedakan jenis kelamin hewan (Fontanesi, 2008). Hasil penemuan tersebut digunakan sebagai dasar untuk identifikasi asal jenis kelamin karkas atau daging yang beredar dipasaran. Penelitian ternyata tidak cukup hanya membedakan jenis kelamin namun juga dibutuhkan untuk mengetahui spesies hewan asal daging. Hasil penelitian tersebut mampu mendeteksi gen amel pada region intron 3 dengan menggunakan PCR namun hasil PCR harus dilakukan visualisasi menggunakan *polyacrilamid* gel elektroforesis karena kecilnya ukuran fragmen DNA yang berkisar sekitar 9 bp. Hasil studi tersebut mendorong Langen dkk. (2010) menggunakan target gen amelogenin untuk

membedakan daging berasal dari babi jantan atau betina, dengan mengamplifikasi gen menggunakan primer dengan panjang sekitar 741 bp untuk identifikasi babi betina, dan mengamplifikasi gen amelogenin dengan panjang fragmen DNA sepanjang 562 bp untuk target gen amelogenin babi jantan. Hasil penelitian amplifikasi DNA pada produk olahan pangan ternyata tidak selalu menunjukkan keberhasilan. Hal tersebut disebabkan produk olahan sudah mengalami pemasakan sehingga sudah terjadi fragmenasi DNA menjadi ukuran yang lebih pendek (Fajardo dkk., 2006). Identifikasi dengan menggunakan teknik PCR-RFLP berkembang untuk identifikasi olahan daging yang menggunakan gen *cytochrome b* dengan target gen sekitar 360 bp dan telah diaplikasikan untuk identifikasi jenis daging pada produk olahan pangan. Penggunaan enzim restriksi *BseDI*, mampu memotong amplicon gen *cytochrome b* babi menjadi 221 bp dan 138 bp sehingga dapat mendeteksi campuran daging babi pada produk olahan pangan (Erwanto dkk., 2011). Oleh karena itu dalam penelitian ini dikembangkan metode analisis berdasar pada DNA namun menggunakan PCR dengan primer spesifik yang dapat langsung mengetahui ada tidaknya kontaminasi babi dalam campuran daging dibandingkan dengan metode PCR-RFLP yang telah dikembangkan sebelumnya.

## METODE PENELITIAN

### Preparasi Sampel

Daging segar babi, sapi, dan ayam dibeli dari pasar lokal di wilayah Yogyakarta. Semua daging digiling secara terpisah dengan alat yang berbeda untuk menghindari *cross* kontaminasi. Setelah dilakukan pengepakan daging disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan untuk penelitian. Pada penelitian ini daging babi secara individual maupun campuran dengan daging lain dengan rasio daging babi sebesar 1, 3, 5, 10 dan 25% dicampur secara homogen. Setelah isolasi DNA dilakukan analisis dengan PCR menggunakan primer spesifik dan PCR dengan universal primer mitokondrial gen *cytochrome b* dilanjutkan pemotongan dengan enzim restriksi.

### Desain Primer

Penelitian dimulai dengan membuat desain primer spesifik berdasarkan gen amelogenin yang terdapat pada kromosom babi. Primer dibuat dengan bantuan software Mega

4 dan dilakukan *alignment* dengan beberapa spesies daging yang dipasarkan di Indonesia yaitu sapi, ayam dan kambing. Primer yang didesain pada panjang fragmen DNA sekitar 200 sampai 500 bp dengan prinsip dasar bahwa DNA pada produk olahan daging kemungkinan mengalami degradasi sehingga ukuran fragmennya tidak terlalu panjang. Universal primer yang digunakan adalah gen *cytochrome b* sesuai publikasi Kocher dkk. (1989) dengan susunan basa sebagai berikut:

*Forward:* (5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3')

*Reverse:* (5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3')

### Isolasi DNA

Formulasi daging dengan berbagai konsentrasi daging babi yang telah homogen dilakukan isolasi DNA. Metode ekstraksi sesuai dengan protokol isolasi DNA Kit *High Pure PCR Template* (Roche, Mannheim, Germany). Sampel sebanyak 50 – 100 mg dimasukkan ke dalam tube kapasitas 1,5 ml. Ekstraksi diawali dengan menambahkan 200-300 µl *tissue buffer* dan 40 µl *proteinase K*, dan diinkubasi pada 55°C selama 16 jam. Sebanyak 200 µl *binding buffer* ditambahkan, kemudian diinkubasi 70°C selama 10 menit. Sebanyak 100 µl isopropanol ditambahkan dan dicampur dengan baik. *High Filter Tube* disiapkan dalam *collection tube*. Sampel dimasukkan ke dalam *filter tube*. Semua *tube* dimasukkan ke dalam *table top* sentrifuge dan sentrifugasi pada 8000 x g selama 1 menit. Larutan dibuang dari *collection tube*, 500 µl *inhibitor removal buffer* ditambahkan pada *High Filter Tube*, kemudian sentrifugasi pada 8000 x g selama 1 menit. *High Filter Tube* diambil dan dibuang larutannya. Sebanyak 500 µl *wash buffer* ditambahkan pada *High Filter Tube*, sentrifugasi pada 8000 x g selama 1 menit. *High Filter Tube* diambil dan buang larutannya. Sebanyak 500 µl *wash buffer* ditambahkan pada *High Filter Tube*, kemudian disentrifugasi pada 8000 x g selama 1 menit. Setelah dibuang larutannya, kemudian disentrifugasi pada kecepatan maksimal pada 13.000 x g selama 10 detik. *Collection tube* dibuang, kemudian *High Filter Tube* dimasukkan ke dalam 1,5 ml *microcentrifuge tube* yang baru. Sebanyak 200 µl *prewarmed elution buffer* ditambahkan, kemudian disentrifuge pada 8000 x g selama 1 menit. Larutan DNA disimpan pada suhu -20°C sampai analisis lebih lanjut.

### Reaksi PCR

Amplifikasi gen *cytochrome b* dilakukan dalam volume akhir 25 µl yang mengandung dH<sub>2</sub>O 9,5 µl, *megamix-royal* 12,5 µl (*Taq* polimerase, anti-*Taq* polymerase antibodi dalam

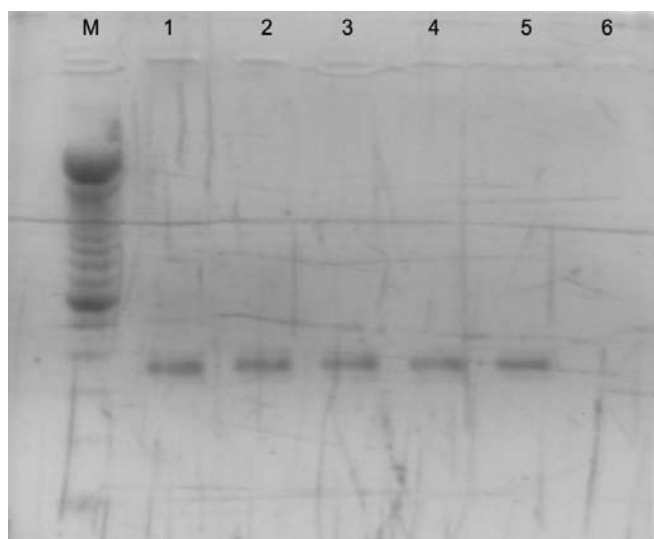
2x reaksi buffer (6mM MgCl<sub>2</sub>), 400 µM dNTPs, *stabilizer* dan *blue loading*, *Microzone*, *Haywards Heath, UK*), masing-masing primer 1 µl (40 pmol) dan 1 µl DNA hasil ekstraksi. Amplifikasi dilakukan dengan program sebagai berikut: predenaturasi 94°C selama 2 menit, denaturasi 95°C selama 36 detik, *annealing* 51°C selama 73 detik, *extension* 72°C selama 84 detik, dengan siklus PCR diulang sebanyak 35. *Post extension* 72°C selama 3 menit, kemudian suhu diturunkan sampai mencapai 4°C. Hasil PCR disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan untuk analisis selanjutnya. Untuk amplifikasi dengan primer spesifik yang didesain, dilakukan dengan volume yang sama namun dengan program optimasi yang divariasikan khususnya saat *annealing* nya yang merupakan faktor paling kritis. Kondisi amplifikasi dengan mesin PCR untuk gen amelogenin sebagai berikut: predenaturasi 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 53-58°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 45 detik, dengan siklus PCR diulang sebanyak 35. *Post extension* 72°C selama 5 menit, kemudian suhu diturunkan sampai mencapai 4°C. Reaksi optimasi dilakukan dengan melakukan berbagai variasi suhu khususnya saat *annealing*. Visualisasi hasil PCR di elektroforesis pada 50 V gel agarose 2% selama 80 menit dalam 1x buffer TBE. Marker 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, USA) digunakan sebagai DNA ladder.

### Analisis RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Dua unit enzim restriksi *BseDI* (Fermentas, St.Leon-Rot, Germany) digunakan untuk 7 µl produk PCR dalam 20 µl volume final campuran digesti yang mengandung 10 µl dH<sub>2</sub>O, 2 µl 10x buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA dan 50% gliserol) dan diinkubasi pada 55°C selama 3 jam. Satu mikroliter sampel digesti di elektroforesis pada 50 V gel agarose 2% selama 80 menit dalam 1x buffer TBE. Marker 100 bp (Carlsbad, USA) digunakan sebagai DNA ladder.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

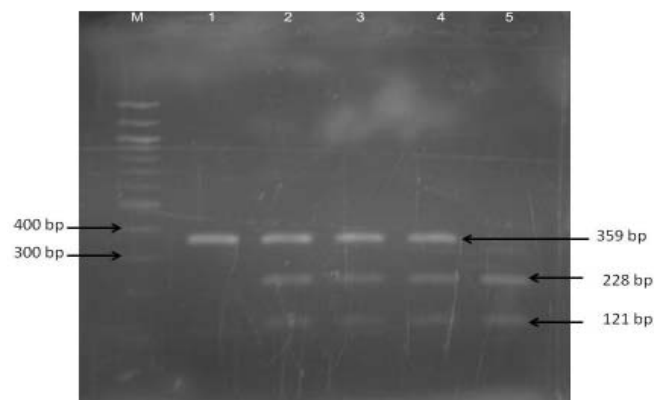
Penggunaan gen *cytochrome b* telah banyak dilakukan dalam penelitian untuk identifikasi jenis daging (Di Pinto dkk., 2005; Asensio, 2007; Hsieh dkk., 2007; Tanabe dkk., 2007; Lin dkk., 2008). Selain menggunakan *cytochrome b* sebagai marker biologi dalam mengidentifikasi spesies dapat juga digunakan gen 12S rRNA (Fajardo dkk., 2006) dan 16S rDNA (Rastogi dkk., 2007) yang ketiganya dari mitokondria. Gambar 1 menunjukkan hasil amplifikasi PCR *cytochrome b* gen dari DNA babi, sapi dan campuran daging dengan berbagai konsentrasi daging babi.



Gambar 1. Hasil analisis elektrophoresis pada 2% agarose produk amplifikasi PCR DNA pada gen *cytochrome b* dengan panjang fragmen sekitar 359 bp. M: 100 bp ladder standar, 1: sapi (100%), 2: (sapi 95 : babi 5%), 3: (sapi 97 : babi 3%), 4: (sapi 99 : babi 1%), 5: babi ( 100%), 6: kontrol negatif (air).

Amplifikasi gen *cytochrome b* menghasilkan fragmen sekitar 359 bp (Gambar 1), Hasil ini menunjukkan bahwa DNA mitokondria dari sampel daging campuran cukup untuk amplifikasi DNA. Amplikon gen *cytochrome b* dari daging ini sesuai dengan Kocheer dkk. (1989), Aida dkk. (2005), dan Erwanto dkk. (2011) yang menghasilkan fragmen sekitar 359 bp. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah *internal primer* gen *cytochrome b* yang mengamplifikasi *initial region* gen *cytochrome b*. Pasangan primer yang digunakan untuk deteksi gen *Cytochrome b* pada semua spesies adalah F (5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3') dan *Cytochrome b* R (5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3'), yang menghasilkan amplicon sebesar 359 bp.

PCR-RFLP adalah amplifikasi suatu fragmen DNA tertentu dengan menggunakan sepasang primer spesifik/ universal sehingga menghasilkan fragmen yang dimaksud. Hasil amplifikasi tersebut didigesti menggunakan enzim restriksi dan menghasilkan potongan fragmen yang panjangnya dapat bervariasi tergantung keberadaan situs restriksi yang dikenali (Hoelzel, 1998). Glick dan Pasternak (1994) menyatakan bahwa prinsip dari metode PCR-RFLP adalah adanya polimorfik sisi restriksi endonuklease untuk masing-masing gen. Fragmen DNA yang dianalisis termasuk daerah penyandi asam amino (exon), intron atau daerah intergenik. Hasil pemotongan dapat berupa fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda-beda.



Gambar 2. Fragmen DNA hasil pemotongan amplicon DNA gen *cytochrome b* dengan enzim restriksi *BseDI* pada agarose 2%. M: Marker 100 bp ladder, 1: sapi (100%), 2: (sapi 95 : babi 5%), 3: (sapi 97 : babi 3%), 4: (sapi 99 : babi 1%), 5: babi ( 100%).

Gambar 2 menunjukkan hasil pemotongan DNA dengan metode PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *BseDI*. Enzim ini mengenali 6 basa sebagai tempat pengenalan pemotongan yaitu CCNNGG dan memotong diantara basa *cytosine* (C) dan *guanine* (G). Dengan metode RFLP ini, amplicon yang mempunyai urutan basa yang sama yaitu CCNNGG akan dipotong oleh enzim *BseDI* menghasilkan fragmen DNA dengan jumlah dan ukuran yang berbeda. Pada penelitian ini proses pemotongan dengan enzim tersebut dilakukan pada suhu 55°C selama 3 jam yang berarti lebih cepat dibanding penelitian Aida dkk. (2005) untuk DNA *cytochrome b* dari produk daging segar yang menggunakan enzim *BsaJI* dengan waktu inkubasi digesti selama 16 jam. Berdasarkan hasil visualisasi dengan elektrophoresis diperoleh bahwa gen *cytochrome b* dari daging babi dapat terpotong menjadi dua fragmen DNA masing-masing dengan panjang fragmen 228 bp dan 121 bp.

Hasil analisis PCR-RFLP dari variasi dua jenis daging dengan level kontaminasi daging babi dari 5 sampai 1% yang dicampurkan pada daging sapi menunjukkan bahwa sampel yang dicampur dengan daging babi (lane 2-4) dan 100% daging babi (lane 5) menghasilkan 2 *band* sebesar 228 bp dan 131 bp, sedangkan yang tidak dicampur daging babi (lane 1) tetap 1 *band* yang tervisualisasi pada agarose 2%. Hasil yang sama diperoleh bila daging babi dicampurkan pada daging ayam dan kambing dengan level yang sama (data tidak ditampilkan).

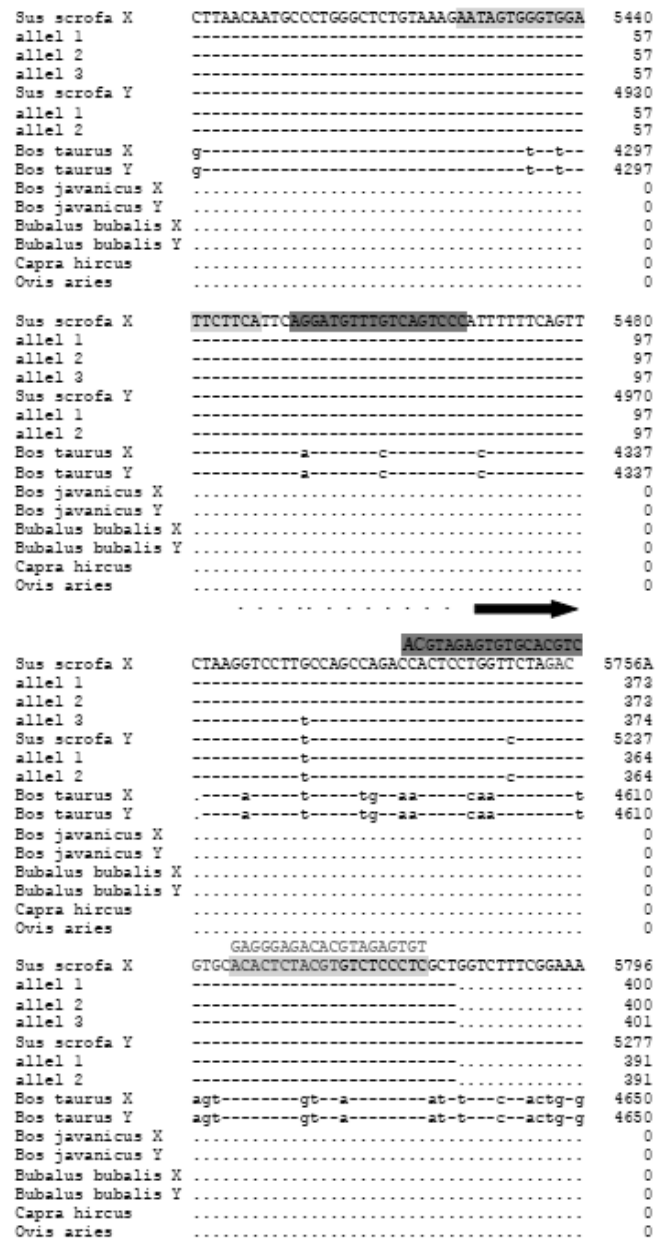
Hasil ini sesuai dengan Erwanto dkk. (2007) dan Ong dkk. (2007) yang menggunakan *cytochrome b* sebagai marker biologi dalam mengidentifikasi jenis daging dan mengungkapkan bahwa kandungan daging babi sampai level 1% dapat terdigesti dengan baik. Aida dkk. (2005) dan Erwanto dkk. (2007) melaporkan bahwa enzim restriksi *BsaJI* dapat digunakan untuk mengidentifikasi campuran

daging babi dalam campuran daging sapi, kambing dan ayam, sedangkan Ong dkk. (2007) menggunakan berbagai enzim restriksi seperti *AluI*, *BsaII* dan *RsaI* untuk mengidentifikasi berbagai jenis campuran daging ayam, babi dan sapi dengan berbagai modifikasi. Dalam mengidentifikasi suatu spesies, primer yang umum digunakan adalah primer universal dan *species-specific primer*. Primer gen *cytochrome b* mitokondrial didesain untuk dapat mengamplifikasi beberapa jenis hewan meliputi mamalia, burung, amphi, reptil, ikan, serangga dan laba-laba, sehingga disebut sebagai *universal primer* (Kocher dkk. 1989). Dalam mengidentifikasi beberapa spesies, selain menggunakan *universal primer* juga dapat menggunakan *species-specific primers*.

Pada penelitian ini desain primer dilakukan berdasarkan pada gen amelogenin untuk deteksi daging babi. Gen tersebut telah digunakan Fontanesi dkk. (2008) dan Langen dkk. (2010) untuk mendeteksi jenis kelamin daging babi yang beredar di pasaran. Mereka menemukan bahwa daging babi dipasarkan baik dalam bahan segar maupun hasil olahan dapat diidentifikasi berasal dari daging babi jantan atau betina. Metode deteksi dengan primer spesifik tersebut menunjukkan hasil yang positif pada babi dan tidak mengamplifikasi pada gen yang sama dari hewan jenis yang lain yaitu sapi, ayam, kalkun dan beberapa jenis mikroba yang sering mengkontaminasi daging (Langen dkk., 2010). Berdasarkan hasil tersebut penelitian ini mendesain primer menggunakan dasar gen amelogenin dan Gambar 3 adalah hasil *alignent* beberapa spesies yaitu sapi, babi, kambing dan kuda yang didapatkan dari bank gen. Primer spesifik didesain dengan panjang fragmen sekitar 300 - 400 bp sebagaimana disajikan pada Gambar 3.

Berdasarkan penjejarian gen tersebut diketahui ada beberapa gen yang belum diketahui urutan basa nukleotidnya, sehingga dalam menentukan letak primer yang tepat masih belum dapat memastikan dengan baik. Primer spesifik didesain pada panjang fragmen DNA sekitar 300 - 400 bp dengan harapan dapat diaplikasikan pada produk olahan pangan karena selama proses pengolahan kemungkinan adanya degradasi DNA sehingga terpotong menjadi fragmen yang pendek. Hasil desain primer dapat dilihat pada Gambar 4 dengan bantuan software Mega 4 dan dihasilkan dua pasang primer seperti disajikan pada Tabel 1.

Panjang fragmen DNA untuk primer pig a adalah 353 bp dan untuk primer pig b adalah 312 bp. Optimasi dilakukan untuk mengetahui kondisi PCR yang paling optimum agar dapat mengamplifikasi gen target yaitu amelogenin pada spesies babi. Hasil optimasi didapatkan data sebagaimana disajikan pada Tabel 2.



Gambar 3. Hasil penjejarian gen amelogenin dari spesies babi, sapi, dan kambing dari gen bank.

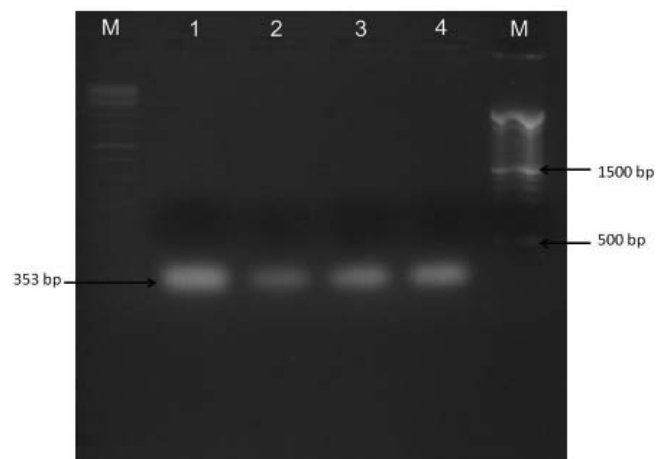
Gambar 4 adalah hasil optimasi PCR untuk primer pig a untuk mengecek keberadaan gen amelogenin dengan primer spesifik babi namun ditemukan *cross* reaksi amplifikasi dengan spesies yang lain yaitu pada ayam, kambing dan sapi. Aplikasi primer spesifik babi yang lain yaitu primer pig b disajikan pada Gambar 5 yang menunjukkan reaksi yang positif tidak hanya pada babi tetapi juga pada gen sapi, ayam dan kambing.

Tabel 1. Susunan primer spesifik untuk babi dari gen amelogenin

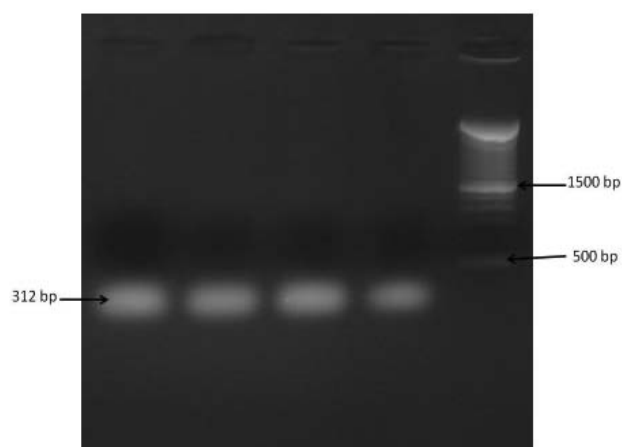
Nama primer	Urutan basa	Nilai Tm (°C)	Posisi sekuen gen amelogenin
Pig a F1	5'aatagtggtggattctca3'	54,54	5428-5437
Pig a R1	5'gaggagacacgtagagt3'	54,17	5780-5799
Pig b F2	5'aggatgttgcagtc3'	52,90	5451-5468
Pig b R2	5'acgtagagtgcacg3'	52,62	5771-5788

Tabel 2. Program PCR hasil optimasi untuk gen amelogenin

Tahapan reaksi	Suhu (°C)	Waktu
Pre denaturasi	95	3 menit
Denaturasi	95	30 detik
Annealing	53,5	30 detik
Ekstension	72	45 detik
Post ekstension	72	5 menit
Jumlah Siklus	35 kali	



Gambar 4. Optimasi PCR dengan primer pig a pada DNA daging asal empat spesies yaitu 1) sapi, 2) kambing, 3) ayam, 4) babi dan Marker 100 bp ladder



Gambar 5. Optimasi PCR dengan primer pig b pada DNA daging asal empat spesies yaitu 1) sapi, 2) kambing, 3) ayam, 4) babi dan Marker 100 bp ladder

Kesmen dkk. (2007) menggunakan *species-specific primers* untuk deteksi spesies daging pada produk sosis dengan beberapa variasi campuran daging (kuda, sapi, keledai dan babi) dan menunjukkan hasil dapat terdeteksi sampai level 1% dengan menghasilkan amplikon yang berbeda-beda. Desain *species-specific primer* didapatkan dari gen ATPase8 (*ATP synthase subunit 8*), ATPase6 (*ATP synthase subunit 6*), ND2=NADH (*dehydrogenase subunits 2*) dan ND5=NADH (*dehydrogenase subunit 5*). Hasil penelitian desain primer spesifik ini belum optimal karena sekuen DNA lengkap dari gen amelogenin untuk spesies sapi, ayam dan kambing belum ada datanya pada bank gen sehingga kesulitan dalam menentukan letak primer yang paling tepat. Penelitian perlu terus dilakukan untuk mencari primer dan optimasi program yang paling tepat. Primer spesifik dalam penelitian ini telah didesain dengan panjang fragmen sekitar 300 bp, yang diharapkan menjadi primer spesifik walaupun dengan panjang fragmen pada kisaran 300 bp mempunyai tingkat kesulitan amplifikasi namun diharapkan mampu untuk deteksi DNA pada olahan pangan yang berlebihan pemasakannya.

Hasil penelitian untuk mengidentifikasi spesies dengan primer spesifik juga telah dikembangkan oleh Martin dkk. (2007) yang mampu mendeteksi keberadaan daging sapi, kambing dan domba sampai dengan level 0.1% pada campuran dengan tepung dari bahan nabati. Penelitian tersebut juga menjelaskan bahwa pemasakan sampai dengan suhu 120°C selama 50 menit masih dapat digunakan untuk reaksi PCR dengan primer spesifik yang didesain dari gen 12SrRNA.

Gen amelogenin dipilih sebagai target gen dalam reaksi PCR karena ditemukan dalam kebanyakan mamalia yang berada pada kromosom X dan Y (Iwase dkk., 2003). Adanya keanekaragaman diantara amelogenin X dan Y, maka gen ini telah digunakan sebagai marker untuk mengecek jenis kelamin pada mamalia termasuk manusia (Gibbon dkk., 2009). Pemanfaatan gen tersebut untuk mendeteksi daging babi di pasaran berasal dari jantan atau betina telah dilakukan oleh Langen dkk. (2010). Primer yang didesain oleh Langen berkisar pada panjang fragmen 741 bp untuk amelogenin X dan 562 bp untuk deteksi amelogenin Y. Amplifikasi pada panjang fragmen di atas 500 bp tersebut mempunyai kendala untuk aplikasi deteksi babi pada produk olahan pangan karena biasanya DNA pada olahan lanjut telah mengalami fragmentasi menjadi fragmen yang lebih pendek. Oleh karena itu penelitian ini mendesain primer dengan hasil amplifikasi DNA sekitar 312 dan 353 bp dan sudah dilakukan optimasi PCR sebagaimana disajikan pada Gambar 4 dan 5 namun masih terjadinya *cross* reaksi dengan sampel daging sapi, kambing dan ayam merupakan permasalahan yang harus diteliti selanjutnya.

## KESIMPULAN

Metode PCR-RFLP menggunakan enzim *BseDI* pada amplicon mitokondrial gen *cytochrome b* dapat digunakan untuk mendeteksi kontaminasi daging babi pada daging lain sampai level kontaminasi 1%. Pengembangan primer spesifik dengan gen amelogenin pada target gen sepanjang 312 dan 353 bp dapat digunakan untuk amplifikasi gen tersebut namun masih terjadi *cross* reaksi dengan spesies dari sapi, ayam dan kambing. Penelitian perlu dilanjutkan untuk menghindari *cross* kontaminasi dengan spesies lain.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian penelitian Hibah Bersaing tahun 2011 melalui LPPM, Universitas Gadjah Mada dengan nomor kontrak LPPM-UGM/720/BIDI/2011 untuk itu penulis mengucapkan terima kasih atas dukungan pendanaan tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aida, A.A., Y.B. Che-Man, Y.B., Wong, C.M. V.L., Raha, A.R. dan Son, R. (2005). Analysis of raw meats and fats of pig using polymerase chain reaction for halal authentication. *Meat Science* **69**:47-52.
- Asensio, G.L. (2007). PCR-based methods for fish and fishery product authentication. *Food Control & Technology* **18**:558-566.
- Di Pinto, A., Forte, V.T., Conversano, M.C. dan Tantillo, G.M. (2005). Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control* **16**: 391-394.
- Erwanto, Y., Arief. B.W. dan Rusman (2007). Identifikasi daging babi dengan PCR-RFLP sebagai acuan untuk menentukan status kehalalan. *Proceeding Seminar Hasil Penelitian Kluster*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Erwanto, Y., Abidin, M.Z., Rohman, A. dan Sismindari (2011). PCR-RFLP Using *BseDI* enzyme for Pork Authentication in Sausage and Nugget Products. *Media Peternakan* **34**:1.
- Fajardo, V., Gonzales, I., Lopez-Calleja, I., Martin, I., Hernández, P.E., Garcia, T. dan Martin, R. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 1144-1150.
- Fontanesi, L., Scotti, E. dan Russo, V. (2008). Differences of the Porcine Amelogenin X and Y chromosome genes (AMELX and AMELY) and their application for sex determination in pigs. *Molecular Reproduction and Development* **75**:1662-1668.
- Gibbon, V., Paximadis, M., Strkalj, G., Ruff, P. dan Penny, C. (2009). Novel methods of molecular sex identification from skeletal tissue using the amelogenin gene. *Forensic Science International Genetics* **3**: 74-79.
- Girish, P.S., Anjaneyuhu, A.S.R., Viswas, K.N., Shivakumar, B.M., Anand, M., Patel, M. dan Sharma, B. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragmen length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science* **70**: 107-112.
- Glick, B. R. dan Pasternak, J.J. (1994). *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. ASM Press, Washington, D.C.: 64-67.
- Hoelzel, A.R. (1998). *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach*. 2<sup>nd</sup> ed. Department of Biological Sciences. University of Durham.
- Hsieh, H.S., Tuu-jiyi, C. dan Deng-Fwu, H. (2007). Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. *Food Control* **18**: 369-374.
- Iwase, M., Satta, Y., Hirai, Y., Hirai, H., Imai, H. dan Takahata, N. (2003). The amelogenin loci span an ancient pseudoautosomal boundary in diverse mammalian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 5258-5263.
- Kesmen, Z., Sahin, F. dan Yetim, H. (2007). PCR assay for identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science* **77**: 649-653.
- Kocher, T.D., Thomas, A., Meyer, S.V., Edwards, S. dan Paabo, F.X. (1989). Dynamic of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **86**: 6169-6200.
- Langen, M., Peters, U., Körner, U., Gissel, C., Stanislawski, D. dan Klein, G. (2010). Detection of male pork tissue in meat and meat products by PCR. *Meat Science* **86**: 821-824.

- Lin, W. dan Deng-Fwu, H. (2008). Application of species-specific PCR the identification of dried bonito product (Katsuobushi). *Food Chemistry* **106**: 390-396.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Pez-Calleja, I., Hernández, P.E., González, I. dan Martín, R. (2007). Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Science* **75**: 120-127.
- Ong, S.B., Zuraini, M.I., Jurin, W.G., Cheah, Y.K., Tunung, R., Chai, L.C., Haryani, Y., Ghazali, F.M. dan Son, R. (2007). Meat molecular detection: sensitivity of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in species differentiation of meat from animal origin. *ASEAN Food Journal* **14(1)**: 51-59.
- Rastogi, G., Mahesh S. Dharne, Sandeep W., Ashutosh K., M.S. Patole dan Yogesh S.S. (2007). Species identification and authentication of tissues of animal origin mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science* **76**: 666-674.
- Republika (2009). Dendeng babi ditemukan lagi. *Harian Umum Republika on line*. 17 April 2009.
- Rohman, A., Erwanto, Y., Sismindari dan Jacob, C.M. (2011). Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. *Meat Science* **88**: 91-95.
- Tanabe, S., Eiji, M., Akemi, M. dan Kazuhiro, M. (2007). PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredient in processed foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **71**: 1-5.