



Deteksi Daging Babi pada Tiga Merk Kernet Sapi Berdasarkan Gen *Cytochrome b* dengan Metode PCR

Detection Meat Pork on Three Cornet Beef Brands Based of Cytochrome B Gen using PCR Method

Hendrik Wijaya¹, Sri Darmawati², Aprilia Indra Kartika³

¹Program Studi DIV Analisis Kesehatan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan

^{2,3}Laboratorium Biologo Molekuler, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan

¹hendrikilm9@gmail.com

Abstrak

Identifikasi kandungan cemaran daging babi pada kernet sapi dilakukan dengan metode PCR berdasarkan primer spesifik babi P14. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi campuran daging babi pada tiga macam merk kernet sapi berdasarkan primer spesifik P14 yang menunjukkan lokus PRE-1 pada genom babi. Primer spesifik DNA digunakan untuk isolasi DNA sampel kernet yang akan diamplifikasi secara *in vitro* dengan menggunakan mesin PCR, hasil amplifikasi diidentifikasi dengan menggunakan elektroforesis gel, sehingga akan terlihat pita DNA sesuai dengan ukuran panjang DNA yang diamplifikasi. Pita DNA spesifik P14 dari daging babi dibandingkan dengan pita DNA spesifik daging sapi berdasarkan ukuran produk PCR yang terbentuk. Sampel penelitian adalah kernet sapi di Wilayah Kedungmundu menggunakan metode PCR dengan primer spesifik P14. Berdasarkan hasil isolasi DNA pada 3 merk kernet sapi yang dijual di Supermarket disekitar wilayah Kedungmundu didapatkan sampel kernet negatif mengandung daging babi atau tidak terdapat cemaran daging babi, pada kernet sapi dan sampel kernet positif mengandung daging sapi ditandai dengan hasil produk PCR sampel sebesar 274 bp.

Kata kunci : deteksi daging babi, kernet sapi, PCR

Abstract

Identification contamination meat pork on corned beef with PCR method based specifics primer pork 14. This research for identified mix meat pork on three kind brand corned beef based specifics primer p14 with PRE-1 locus on pork. DNA specifics primer use for DNA isolation sample corned that will amplification in vitro with by PCR engine, results amplification identified with use electrophoresis gel, so visible DNA band according with size length of amplified DNA . P14 specific DNA band for meat pork compared with a specific DNA band corned beef based on size PCR product formed. Sample this research use corned beef from kedungmundu region with specific primer by PCR method. That result DNA isolation 3 brands corned beef are sold the surrounding supermarket region kedungmundu obtained sample corned beef negative contain meat pork or no there is contamination meat pork, corned beef and sample corned beef positive contain meat beef with result product PCR sample 274 bp.

Keywords: detection meat pork, beef corned, PCR

PENDAHULUAN

Produk pangan dalam kehidupan manusia merupakan hal penting dalam memenuhi kebutuhan gizi dan nutrien yang diperlukan oleh tubuh. Sebagian besar produk makanan yang diperjualbelikan telah diolah dan diawetkan untuk memperpanjang masa simpan. Produk olahan yang dikonsumsi dan dipasarkan secara luas memiliki syarat tidak menyebabkan gangguan kesehatan. Agama Islam adalah agama yang juga mengatur umatnya dalam perkara makanan, yaitu antara makanan yang boleh dimakan (halal) dan makanan yang dilarang untuk dimakan (haram). Seluruh produk pangan yang mengandung unsur babi di dalamnya diharamkan dalam Islam untuk dimakan (Muslim, 2013).



Daging olahan adalah daging yang diawetkan dengan cara diasap, diasinkan bahkan ditambahkan dengan bahan kimia. Beberapa contoh daging atau ikan olahan yaitu : ikan asap, ikan asin, dendeng, abon, sosis, kornet dan lain-lain. *Cornet beef* adalah makanan yang dibuat dari daging sapi tanpa tulang (*deboned*) atau hasil potongan daging yang telah dicincang dengan ditambahkan bahan pengawet untuk mempertahankan warna daging agar tampak segar, yang sudah mengalami proses penggaraman (*curing*) sebelum dikalengkan (Griffin and Lewis, 2009), Cit (Ramadhan dkk., 2013).

Daging babi merupakan sumber protein hewani yang harganya murah dan mudah diperoleh di pasaran. Daging babi sering digunakan sebagai campuran bakso, siomay, dan bakmi goreng. Pencampuran ini tidak disertai informasi yang jelas kepada masyarakat, sehingga masyarakat tidak mengetahui produk olahan tersebut mengandung babi. Masyarakat Muslim diharamkan mengkonsumsi daging babi, beberapa golongan masyarakat juga mempunyai hipersensitivitas atau intoleran terhadap daging babi (Ong *et al.*, 2007).

Penelitian yang dilakukan (Fibriana dkk., 2012) menemukan satu dari tiga belas sampel bakso dari pedagang besar, menengah dan kecil yang diambil secara acak dipusat kota Salatiga positif mengandung daging babi. Upaya untuk melakukan identifikasi telah dilakukan dengan berbagai macam metode, metode yang dianggap paling valid saat ini adalah PCR dengan berbagai variasinya (Erwanto dkk., 2012).

Penelitian yang menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer spesifik banyak digunakan karena dapat mengetahui ada tidaknya kontaminasi babi dalam campuran daging. Analisis PCR menggunakan primer spesifik DNA dengan memanfaatkan urutan DNA mitokondria merupakan metode yang umum digunakan untuk mengidentifikasi spesies tertentu. Penggunaan DNA mitokondria dalam analisis PCR dapat meningkatkan sensitivitas, karena setiap sel memiliki sekitar seribu mitokondria dan setiap mitokondria memiliki sepuluh salinan DNA, sehingga terdapat sepuluh ribu salinan DNA mitokondria dalam sel (Alaraidh *et al.*, 2008 & Kesmen *et al.*, 2009). Penelitian Erwanto (2012) menggunakan enzim *BseDI* pada amplicon mitokondrial gen *cytochrome b* yang dapat digunakan untuk mendeteksi kontaminasi daging babi pada daging lain hingga level kontaminasi 1%.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi ada tidaknya kandungan daging babi dalam produk kornet yang dijual di sekitar wilayah Tembalang menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik DNA Gen Babi P14 yang didasarkan pada informasi DNA sel. Identifikasi olahan daging yang menggunakan gen *Cytochrome b* dengan target gen sekitar 481 bp dan telah diaplikasikan untuk identifikasi jenis daging pada produk olahan pangan (Erwanto dkk., 2012). Primer spesifik DNA digunakan untuk isolasi DNA sampel kornet yang akan diamplifikasi secara *in vitro* dengan menggunakan mesin PCR, hasil amplifikasi diidentifikasi dengan menggunakan elektroforesis gel, sehingga akan terlihat pita DNA sesuai dengan ukuran panjang DNA yang diamplifikasi. Pita DNA spesifik P14 dari daging babi dibandingkan dengan pita DNA spesifik daging sapi berdasarkan ukuran basepair yang terbentuk.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Muhammadiyah Semarang dengan metode PCR. Sekuens primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer P14 yang spesifik pada gen *Cytochrome b* babi *Forward* 5` CCC CGT CTC CTT CCT CCG GTG GTT GAT G 3' dan *Revers* 5` CTG CGA CAC ATG ATG CCT TTA TGT CCC AGC 3' dengan produk PCR 274 bp. Primer Sapi yang spesifik pada gen *Cytochrome b* sapi *Forward* 5` GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA 3' dan *Reverse* 5` CTA GAA AAG TGT AAG ACC CGT AAT ATA AG 3' dengan produk PCR 481 bp. Tahap awal identifikasi DNA dimulai dari isolasi DNA dengan cara manual



(tanpa kit), uji kualitas DNA (elektroforesis gel agarose 1%), amplifikasi gen, dan elektroforesis gel agarose 2%.

Isolasi DNA

Proses awal isolasi DNA, dimulai pada penghancuran jaringan dengan cara digerus kemudian ditambahkan 2 ml lysis buffer lalu dimasukkan dalam konikal 15 ml, ditambahkan 20 µl proteinase K, vortex lalu diinkubasi pada suhu 55°C selama 1 jam (digojok tiap 10 menit), ditambahkan phenol CIAA 2 ml kemudian digojok 15 menit, disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit pada suhu ruang, Hasil yang didapatkan adalah 3 lapisan pada konikal berisi sampel daging sapi segar dan daging babi segar, sedangkan pada ketiga sampel kornet terdapat empat lapis. Kedua konikal yang berisi daging segar, dipindahkan lapisan atas kedalam konikal 15 ml, sedangkan ketiga konikal yang berisi sampel kornet, dipindahkan lapisan kedua, ditambahkan etanol absolut dingin 1:1 atau 1:2, dipindahkan benang-benang DNA kedalam 500 µl ethanol 70%, disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, dikeringanginkan kemudian ditambahkan TE 100 µl, selanjutnya periksa kemurnian DNA dengan menggunakan elektroforesis agarose 1%.

Uji Kemurnian DNA

Hasil isolasi kemudian dicek keberadaan DNANYa dengan elektroforesis gel agarose 1%. Tahap ini dimulai dengan penambahan *loading dye* pada sampel, larutan DNA yang bermuatan negatif dimasukkan kedalam sumur-sumur yang terdapat dalam gel agarose dan diletakkan dikutub negatif, kemudian dialiri arus listrik sebesar 100 volt selama 60 dengan menggunakan larutan *buffer* yang bermuatan negatif maka DNA akan bergerak kekutub positif. Lihat pita DNA hasil elektroforesis menggunakan UV transiluminator.

Amplifikasi PCR

Reaksi PCR dibuat dalam total volume 25 µl yang mengandung *nuclease free water* 7,5 µl, master mix 2x 12,5 µl, primer *F* dan *R* masing-masing 2 µl dan 1 µl DNA hasil ekstraksi. Amplifikasi dengan menggunakan primer spesifik P14 dilakukan dengan program sebagai berikut: predenaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 61°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 1 menit, dengan siklus PCR diulang sebanyak 35. *Post extension* 72°C selama 7 menit, kemudian suhu diturunkan sampai mencapai 4°C selama 10 menit. Sedangkan amplifikasi dengan menggunakan primer spesifik sapi digunakan program sebagai berikut : predenaturasi 95°C selama 4 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 49°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 2 menit, dengan siklus PCR diulang sebanyak 35. *Post extension* 72°C selama 10 menit, kemudian suhu diturunkan sampai mencapai 4°C selama 10 menit. 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 divariasi khususnya saat *annealing* yang merupakan faktor paling kritis. Reaksi optimasi dilakukan dengan melakukan berbagai variasi suhu khususnya saat *annealing*.

Elektroforesis Hasil Amplifikasi

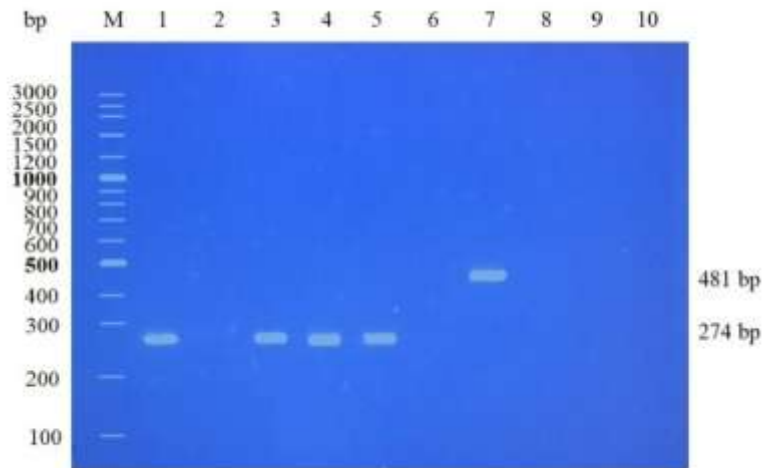
Visualisasi hasil PCR di elektroforesis pada 100 V gel agarose 2% selama 60 menit dalam 1x buffer TAE. Marker 100 bp (*Vivantis*) digunakan sebagai DNA *ladder*. Hasil amplifikasi kemudian dianalisa secara visual dengan UV transiluminator. Sampel dinyatakan positif tercemar babi apabila hasil visualisasi sampel kornet sapi tersebut terbentuk pita DNA tunggal dengan ukuran 481 bp yang sesuai dengan kontrol positif. Sampel kornet sapi dinyatakan negatif tercemar babi apabila hasil visualisasi sampel tersebut tidak terbentuk pita DNA tunggal sesuai dengan kontrol positif.

HASIL

Jenis penelitian yang digunakan merupakan analisis deskriptif. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang pada bulan Agustus sampai September 2018. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tiga merk kornet sapi.

Gambar 1:

Amplifikasi gen *Cytochrome b* (M) Marker, (1) Daging sapi segar, (2) Daging babi segar, (3) Kornet sapi 1, (4) Kornet sapi 2, (5) Kornet sapi 3 “Nomor 1-5 memakai primer sapi”, (6) Daging sapi segar, (7) Daging babi segar, (8) Kornet sapi 1, (9) Kornet sapi 2 dan (10) Kornet sapi 3 “Nomor 6-10 memakai primer P14”.



Tabel 1:

Fragmen DNA daging sapi, daging babi dan kornet sapi hasil PCR yang diambil dengan elektroforesis agarose.

No	Kode sampel	Primer	Teramplifikasi	Ukuran pita	Mengandung daging babi
1	Daging sapi segar	Sapi	√	274 bp	Tidak
2	Daging babi segar	Sapi	-	-	Tidak
3	Kornet sapi 1	Sapi	√	274 bp	Tidak
4	Kornet sapi 2	Sapi	√	274 bp	Tidak
5	Kornet sapi 3	Sapi	√	274 bp	Tidak
6	Daging sapi segar	P14	-	-	Tidak
7	Daging babi segar	P14	√	481 bp	Ya
8	Kornet sapi 1	P14	-	-	Tidak
9	Kornet sapi 2	P14	-	-	Tidak
10	Kornet sapi 3	P14	-	-	Tidak

Hasil PCR DNA genom daging sapi, daging babi dan sampel kornet sapi menggunakan primer P14 ditunjukkan pada gambar 1 Hasil elektroforesis produk PCR menunjukkan adanya pita spesifik yang berukuran 481 bp pada daging babi dan pita spesifik yang berukuran 274 bp pada daging sapi dan sampel kornet sapi. Ketebalan pita DNA hasil amplifikasi dipengaruhi oleh jumlah DNA yang terisolasi. Semakin banyak DNA yang terisolasi maka semakin tebal pita DNA. sebaliknya semakin sedikit DNA yang terisolasi maka semakin tipis pita DNA yang tervisualisasi pada gel agarose. Primer P14 merupakan salah satu dari 13 primer yang menunjukkan lokus PRE-1 pada genom babi, dan menjadi salah satu standar analisis makanan yang mengandung daging babi. Hasil PCR menunjukkan



bahwa lokus PRE-1 yang diwakili oleh primer P14 hanya terdapat dalam DNA genom babi dan tidak terdapat dalam genom sapi (Fibriana dkk., 2012). Pada tabel 1, disajikan data hasil pengamatan panjang fragmen DNA hasil PCR, DNA yang teramplifikasi dengan primer spesifik sapi adalah daging sapi (1), kornet sapi 1 (3), kornet sapi 2 (4) dan kornet sapi 3 (5) dengan produk PCR 274 bp. Sedangkan DNA yang teramplifikasi dengan primer spesifik P14 adalah daging babi (7) dengan produk PCR 481 bp. Dari proses amplifikasi DNA diperoleh produk PCR yang diinginkan yaitu pita spesifik 274 bp dan 481 bp. Daging sapi dan daging babi sebagai kontrol positif yang dijadikan dasar untuk menyimpulkan bahwa kornet mengandung daging sapi dan tidak mengandung daging babi.

PEMBAHASAN

Penambahan proteinase K dan phenol CIAA untuk menghilangkan kandungan protein. Hasil proses didapatkan tiga lapisan pada konikal berisi sampel daging sapi segar dan daging babi segar, sedangkan pada ketiga sampel kornet terdapat empat lapis. Lapisan paling bawah adalah polisakarida, lapisan tengah berupa molekul protein yang berbentuk cincin putih, sedangkan lapisan paling atas adalah fase akuos berisi materi genetik DNA dan RNA (Yanuhar, 2010). Namun pada sampel kornet, terdapat satu lapisan lagi. Kedua konikal yang berisi daging sapi, dipindahkan lapisan atas ke dalam konikal 15 ml, sedangkan ketiga konikal yang berisi sampel kornet, dipindahkan lapisan kedua. Lapisan kedua dipilih karena pada proses isolasi sebelumnya, pada lapisan pertama tidak mengandung DNA.

Genom yang *smear* pada hasil elektroforesis gel agarose 1% disebabkan karena adanya kontaminasi RNA, protein dan tidak utuhnya genom yang terisolasi. Genom yang mengalami fragmentasi menjadi banyak fragmen yang berbeda ukuran dan tertahan pada gel sesuai dengan ukurannya dan menghasilkan gambar yang *smear* (Mulyana. Y., 2010). Genom yang mengalami fragmentasi dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya adalah lamanya waktu homogenisasi dengan *lysis buffer* (Aljanabi *et al.*, 1999), penggerusan dengan menggunakan mortar yang cukup kuat (Santiana, 2010) dan aktivitas DNase yang dapat memotong ikatan pospodiester DNA (Weir, 1993).

Pemilihan suhu pada proses PCR sangat penting karena suhu merupakan faktor paling kritis dalam menentukan keberhasilan suatu PCR khususnya suhu *annealing*. Suhu *annealing* untuk primer P14 yang digunakan dalam penelitian ini adalah 61°C. Suhu ini digunakan karena pada proses amplifikasi sebelumnya, kontrol positif tidak teramplifikasi sehingga dilakukan perubahan suhu. Suhu *annealing* juga tergantung pada komposisi basa, panjang dan konsentrasi primer.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi DNA pada 3 merk kornet sapi yang dijual di Supermarket di sekitar wilayah Kedungmundu didapatkan sampel kornet negatif mengandung daging babi atau tidak terdapat cemaran daging babi pada kornet sapi dan sampel kornet positif mengandung daging sapi ditandai dengan hasil produk PCR sampel sebesar 274 bp.

DAFTAR PUSTAKA

- Alaraidh, I.A., 2008. Improved DNA Extraction Method for Porcine Contaminants Detection in Imported Meat to The Saudi Market, *Saudi Journal of Biological Sciences* 15 (2): 225-229.
- Aljanabi, S.M., L. Forget & A. Dokun, 1999. *An Improved and Rapid Protocol for Isolation of Polysaccharide-Free Sugarcane DNA*. Plant molecular Biology Reporter (17): 1-8
- Erwanto, Y., Abidin, M.Z., Rohman, A. & Ariyani, D., 2012. Identifikasi Daging Babi Menggunakan Metode PCR-RFLP Gen *Cytochrome b* dan PCR Primer Spesifik Gen *Amelogenin*.



- Fibriana, F., Widiyanti, T., Retnoningsih, A. & Susanti., 2012. Deteksi Daging Babi pada Produk Bakso di Pusat Kota Salatiga Menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Biosantifika* 4(2): 106-112.
- Griffin H.V. & W. L. Lewis., 2009. The Chemistry Of Curing Meat. *Journal Of Animal Science*. Page : 439-448
- Kesmen, Z., Sahin, F. & Yetim, H., (2007). PCR Assay for Identification of Animal Species in Cooked Sausages. *Meat Science* 77: 649-653.
- Mulyana, Y., 2010. Analisis Cemar Daging Babi pada Kernet Sapi di Wilayah Ciputat dengan Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Skripsi. Fakultas Kedokteran & Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Muslim, Eko, Y.P., 2013. Isolasi dan Identifikasi Daging Babi Pada Produk Bakso di Surabaya dan Yogyakarta dengan Teknik Polymerase Chain Reaction-Restriction Frafment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta.
- 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 fragmen length polymorphism in species differentiation of meat from animal origin. *ASEAN Food Journal* 14(1): 51-59.
- Ramadhan, A.F., Radiati, L.E. dan Thohari, I. 2013. Tingkat Penggunaan Ekstrak Angkak (*Monascus purpureus*) Sebagai *Curing* alternative dengan Metode *Curing* Basah Terhadap Kualitas Kernet Daging Sapi.
- Weir, A.F., 1993. *Nucleases*, dalam : Michael M Burrell, *Enzymes of Molecular Biology*. New Jarsey: Humana press inc.
- Yanuhar, U. (2010). *Apresiasi Penyakit Virus*. Semarang:BKI Press.