

II. TINJAUAN PUSTAKA

1. Komponen Penyusun Daging Babi

Babi (*Sus spp.*) merupakan hewan ungulata yang berasal dari familia Suidae, memiliki bermuncung panjang dan berhidung rata yang berasal dari Eurasia. Babi digolongkan sebagai hewan omnivora yang dapat mengkonsumsi baik berupa daging maupun tumbuh-tumbuhan. Spesies babi yang banyak dimanfaatkan untuk kebutuhan industri dan pangan adalah *Sus barbatus*, *Sus bucculentus*, *Sus cebifrons*, *Sus celebensis*, *Sus domesticus*, *Sus heureni*, *Sus philippensis*, *Sus salvanius*, *Sus scrofa*, *Sus timoriensis*, dan *Sus verrucosus* (Wijaya, 2009).

Pada umumnya peternakan babi dilakukan bertujuan untuk produksi daging, kulit, bulu dan pupuk. Berdasarkan tujuan sebagai produksi daging, babi dibedakan menjadi tipe *pork*, *lard*, dan *bacon*. Tipe tipe *pork* merupakan babi dengan badan yang panjang, badan simetris dan susunan lemak di dalam tubuh babi tersebut tidak banyak. Tipe *lard* merupakan babi dengan badan besar, berkaki pendek besar dan jumlah lemak di dalam tubuh babi tersebut banyak. Tipe *bacon* merupakan babi dengan badan panjang dan jumlah lemak sedang (Susilorini dkk., 2008).

Daging babi mudah dipalsukan menjadi daging lain, dengan cara daging babi dilumuri darah sapi segar. Daging babi memiliki ciri khas berupa serat daging halus dan lemak berwarna putih (Rahma, 2016). Berdasarkan penelitian Vivikananda (2014), lemak hewan pada babi lebih banyak

dari lemak daging hewan lainnya. Hal ini menyebabkan lemak babi lebih sulit untuk dicerna dibandingkan dengan lemak pada hewan lain. Menurut Tharayarah (2013), lemak yang terkandung dalam daging babi merupakan lemak jenuh dengan kandungan kolestrol yang lebih tinggi dibandingkan lemak daging hewan lainnya.

Daging babi dapat dijadikan pilihan alternatif dalam pengganti daging sapi dengan harga yang relatif lebih murah. Daging babi segar memiliki variasi warna dari merah muda keabuan hingga merah, sedangkan daging sapi berwarna lebih merah. Hal ini dikarenakan daging sapi memiliki mioglobin lebih banyak dibandingkan dengan daging babi. Perbedaan kandungan pada daging babi dan daging sapi dapat dijelaskan pada Tabel 1. (Rahma, 2016).

Tabel 1. Perbedaan Komposisi Bahan Daging Babi dan Daging Sapi per 100 gram (Rahma, 2016).

Produk	Air (%)	Protein (%)	Lemak (%)	Mineral (%)	Kalori (kilojoule)
Daging Sapi	54,7	16,5	28,0	0,8	323
Daging babi	41,1	11,2	47	0,6	472

Lemak daging babi dimanfaatkan beberapa pengusaha industri untuk pembuatan gelatin, mentega, minyak hewani, minyak nabati, shampo, roti, biskuit dan manisan. Enzim yang terdapat dalam lambung babi dimanfaatkan untuk pembuatan keju. Bagian lain dari babi berupa kulit, tulang, serat dan jaringan dimanfaatkan untuk pembuatan gelatin (Al-Baghdadi, 2002). Komposisi dalam pembuatan gelatin terdiri atas protein 84-86%, kadar air 8-12%, mineral 2-4% dengan kandungan vitamin dan lemak yang rendah (Lidansyah, 2015).

2. Sediaan Kapsul

Kapsul merupakan sediaan padat yang dapat larut terbungkus di dalam suatu cangkang keras dan lunak. Jenis kapsul dapat dibedakan menjadi kapsul cangkang keras dan kapsul cangkang lunak. Kapsul cangkang keras merupakan kapsul dengan cangkang kapsul yang terbuat dari gelatin, metilselulosa atau pati. Cangkang kapsul keras pada umumnya diisi sediaan bahan padat, serbuk, butiran, atau granul (Syamsuni, 2005).

Kapsul cangkang lunak merupakan kapsul dengan jenis cangkang yang terbuat dari gelatin atau gel lunak. Pada umumnya kapsul cangkang lunak diisi dengan sediaan bahan cairan seperti polietilenglikol (PEG), padat, serbut atau zat padat kering. Sediaan kapsul memiliki beberapa keuntungan yakni mudah ditelan dan cepat larut sehingga sediaan kapsul tersebut cepat diabsorpsi tubuh. Sediaan kapsul memiliki kerugian berupa tidak dapat digunakan untuk zat yang mudah menguap. Hal ini dikarenakan pori-pori pada cangkang kapsul tidak dapat menahan penguapan (Syamsuni, 2005).

Pada umumnya gelatin pada sediaan kapsul terdiri atas asam amino berupa glisin, prolin, dan hidroksiprolin (Gilsenan dan Murphy, 2000). Sediaan kapsul yang dikomersilkan pada umumnya 90% terbuat dari gelatin babi (Mita dkk., 2014). Sediaan kapsul umumnya digunakan sebagai obat yang telah dikombinasi dengan bahan obat tertentu sesuai dengan dosis yang diresepkan oleh dokter. Sediaan kapsul yang diresepkan oleh dokter dapat dicontohkan seperti kapsul racikan (Andriani dkk., 2014). Menurut BPOM (2010), contoh sediaan kapsul yang telah dikomersilkan di Indonesia namun

tercatat sebagai *public warning* obat tradisional dan suplemen makanan adalah sediaan kapsul penambah vitalitas pria wanita dan kecantikan berupa suplemen vitamin dari bahan herbal, pelangsing serta penambah berat badan.

Gelatin terbagi atas 2 tipe yakni gelatin tipe A dan B. Gelatin tipe A merupakan gelatin yang diperoleh melalui proses asam. Gelatin Tipe A dapat diproduksi dari kulit babi, kulit dan tulang domba. Gelatin B merupakan gelatin yang diperoleh melalui proses basa. Gelatin Tipe B dapat diproduksi dari kulit atau tulang sapi, kambing dan kerbau (Apriana, 2012).

Pembuatan kapsul di dunia didominasi oleh gelatin tipe A sebesar 45,8%. Gelatin tipe A yang banyak dimanfaatkan dalam pembuatan kapsul berasal dari kulit babi. Pembuatan kapsul di Eropa didominasi oleh gelatin A sebesar 68,8% yang berasal dari kulit babi (Praira, 2008).

Gelatin dibuat dari kulit dan tulang babi, dikarenakan proses pembuatan gelatin dari babi lebih cepat dan tidak memerlukan bahan yang banyak. Jaringan ikat pada babi tidak terlalu kuat dibandingkan dengan sapi. Hal ini menyebabkan proses hidrolisis lebih mudah dilakukan dan tidak membutuhkan banyak zat penghidrolisis, zat penetral dan zat pencuci (Lidansyah, 2015).

Pemanfaatan komponen kaki ayam dapat dijadikan sebagai bahan alternatif dalam pembuatan cangkang kapsul. Kolagen yang dihasilkan dari kaki ayam dapat dijadikan sebagai bahan baku gelatin dengan proses pembuatan yang singkat dan biaya lebih murah dibandingkan dengan gelatin sapi (Siregar dkk., 2015). Pemanfaatan tulang ikan bandeng dan rumput laut

dapat dijadikan sebagai bahan alternatif dalam pembuatan cangkang kapsul (Adawiyah dan Selviastuti, 2014).

3. Metode Identifikasi Cemaran Babi Pada Gelatin

Analisis sumber gelatin dapat diidentifikasi dengan metode *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIS), *Chemical precipitation*, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Kekurangan dari metode tersebut adalah diperlukan hasil yang berulang, dan *soft skill* yang tinggi. Hal ini dikarenakan preparasi sampel yang dilakukan sulit dan memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi (Lidansyah, 2015).

Metode *e-nose* GC-MS merupakan analisis deteksi produk makanan dengan sensor panel data dan aroma tanpa adanya pemisahan komponen [ada sampel. Kekurangan metode ini adalah membutuhkan kalibrasi yang berkala dan sensor rentan kontaminasi (Dirinck dkk., 2009). Metode *Gold Nanoparticle* merupakan metode nanopraktikel logam emas yang dapat mendeteksi suatu DNA. Metode ini memiliki nano partikel emas dengan ukuran dan diameter kecil yang dapat masuk ke dalam selaput sel dan nukleus, mengikat dan memisahkan DNA dari komponen molekul lain (Khan dkk., 2014).

Deteksi cemaran babi pada gelatin dapat digunakan dengan metode *Sodium Dodecyl Sulfat Poly Acrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Metode ini merupakan metode yang dapat menunjukkan pita DNA sampel berdasarkan tingkat migrasi molekul. Metode SDS-PAGE memiliki keunggulan yakni harga relatif murah, persiapan sampel yang sederhana dan

sampel yang dibutuhkan untuk pengujian hanya berjumlah sedikit. (Lidansyah, 2015).

Identifikasi sumber gelatin dapat dilakukan menggunakan biosensor berbasis *Surface Plasmon Resonance* (SPR) dengan tingkat sensitivitas yang tinggi dalam mendeteksi dan mengidentifikasi biomolekul. Kelebihan metode ini adalah analisis waktu riil interaksi biomolekul dapat dilakukan dengan persiapan sampel yang tidak rumit. Metode ini memiliki biosensor dengan tingkat sensitivitas yang tinggi, sehingga dapat mengidentifikasi sumber gelatin terhadap perbedaan komposisi asam amino gelatin tersebut (Wardani dkk., 2012).

Analisis sumber gelatin dalam produk kapsul dan *gummy* dapat dilakukan dengan amplifikasi DNA menggunakan metode *Real-time PCR* (*Polymerase Chain Reaction*). Metode ini bertujuan untuk mendeteksi ampikon dan mengukur peningkatan fluorensi yang dihasilkan dari sintesis DNA sampel. Kelebihan metode *real-time PCR* adalah sampel dapat dianalisis dalam jumlah sedikit dan dihasilkan data dengan cepat serta akurat (Puspitaningrum, 2015).

4. Isolasi DNA

Deoxiribonucleic Acid (DNA) atau Asam Deoksiribosa Nukleotida (ADN) adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis sebagai pembawa informasi genetik yang diturunkan kepada jasad keturunannya. Asam nukleat merupakan polimer nukleotida yang tersusun dari basa

nitrogen, gula pentosa dan gugus fosfat. DNA terletak di dalam nukleus, kloroplas dan mitokondria (Yuwono, 2008).

Langkah awal dalam analisis molekuler terlebih dahulu dilakukan metode isolasi DNA (Jakubowska dkk., 2012). Isolasi DNA merupakan pemisahan molekul DNA dari molekul lain seperti dinding sel, membran sel dan membran inti, sehingga struktur DNA tersebut dapat dilihat dengan jelas. Isolasi DNA bertujuan memperoleh DNA murni yang digunakan untuk proses rekayasa genetika selanjutnya (Fatih, 2009).

Isolasi DNA memiliki dua prinsip yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Prinsip presipitasi adalah pengendapan DNA agar terpisah dari zat lain yang terdapat dalam sel (Wilson dan John, 2010). Tahap-tahap dalam isolasi DNA adalah isolasi jaringan, pelisisan dinding dan membran sel, pengekstraksian dalam larutan, purifikasi, serta presipitasi (Bello dkk., 2001).

Salah satu cara isolasi DNA adalah metode *Phenol Chloroform Extraction* (PCE) yang dilakukan dengan larutan *Phenol Chloroform Isoamyl Ethanol* (PCI). Prinsip metode ini memisahkan suatu DNA sampel dari molekul lain berupa dinding sel, inti sel dan membran sel (Fatih, 2009). Keuntungan pada metode ini adalah dapat digunakan untuk mengisolasi DNA dari berbagai jenis sampel. (Tenriulo dkk., 2001). Metode PCE mulai

ditinggalkan karena memiliki resiko yang tinggi. Hal ini disebabkan penggunaan fenol dan kloroform yang bersifat toksik (Wulansari dkk., 2014).

Kloroform merupakan pelarut kimia yang bersifat karsinogenik (Tenriulo dkk., 2001). Pada segi waktu, metode PCE membutuhkan waktu yang tidak singkat dan resiko terjadinya residu hasil ekstraksi tinggi. Pada segi finansial, ekstraksi dengan metode PCE lebih terjangkau dibandingkan dengan metode ekstraksi lain (Khosravinia dkk., 2007).

Salah satu pengembangan metode isolasi DNA saat ini adalah metode isolasi DNA dengan *Kit* komersial. Penggunaan *Kit* komersial dapat dilakukan dengan waktu yang lebih efisien dibandingkan dengan metode PCE. Hal ini dikarenakan *Kit* komersial tersebut mengandung semua larutan yang diperlukan dalam isolasi DNA dan dikemas dalam satu paket. Keuntungan penggunaan *Kit* komersial adalah pengerjaan isolasi DNA dapat dilakukan secara sederhana, tidak membutuhkan banyak pelarut dan aman dari resiko terpapar bahan toksik dapat dihindari (Hidayat, 2015). Produk *Kit* komersial merupakan produk impor dengan harga yang mahal dan memerlukan waktu yang lama untuk importasi, hal inilah yang menjadi kelemahan metode isolasi DNA menggunakan *Kit* komersial (Adji, 2014).

Metode isolasi DNA yang mudah dilakukan dan hasil dapat diperoleh dengan cepat adalah metode Boom (Traore dkk., 2006). Metode Boom merupakan metode isolasi DNA non organik yang dilakukan pertama kali oleh Boom bersama rekannya pada tahun 1990. Penggunaan bahan non organik dalam metode ini adalah *chaotropic* guanidinium tiosianat yang

digunakan sebagai agen purifikasi dan deteksi DNA maupun RNA. Prinsip metode Boom adalah pelisisan dan menonaktifkan nuklease dari *chaotropic* guanidinium tiosianat dengan ikatan asam nukleat pada partikel (Boom dkk., 1990).

Metode Boom dilakukan menggunakan larutan buffer lisis yang terdiri dari *Guanidine* tiosianat (GuSCN), *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (EDTA), Triton-X-100 dan Tris-HCl. GuSCN berfungsi sebagai *chaotropic agent* untuk proses pelisisan sel sehingga DNA sampel akan keluar. EDTA berperan sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium, yang berfungsi untuk mempertahankan aktifitas enzim nuklease. Triton X-100 (*nonionic detergent*) berfungsi sebagai perusak membran sel dan pemecah kromosom. Buffer L2 berperan sebagai pencuci supernatan yang tersisa yang ada di mikrotube, sehingga diperoleh pellet yang bersih dari supernatan (Farmawati dkk., 2015). Larutan Tris-HCl berfungsi sebagai penjaga kestabilan pH dengan kondisi pH yang optimum (Husniyati, 2012).

Pemurnian DNA dengan silika menjadi bahan alternatif dalam metode isolasi DNA yang efisien dan efektif. Prinsip silika adalah pengikatan molekul air oleh denaturan dan interaksi hidrogen dengan permukaan silika. Silika berperan sebagai pengikat DNA sehingga pengotor dan protein yang ada di dalam sampel tidak dapat terikat. Pengotor dan protein yang ada di dalam sampel dapat dihilangkan dengan larutan pencuci (Aini dkk., 2011).

Penelitian Safitri dan Wardani (2015) bertujuan untuk mengetahui adanya cemaran babi pada 9 sampel sosis sapi di Malang. Isolasi DNA pada

sampel sosis sapi tersebut dilakukan dengan metode PCE. Hasil konsentrasi DNA yang diperoleh dari isolasi DNA yang telah dilakukan, berkisar antara 137.54 ng/ μ l – 975.70 ng/ μ l. Berdasarkan rasio pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm diperoleh hasil kemurnian DNA berkisar antara 1.8-2.0. Berdasarkan nilai rasio tersebut, sampel sosis sapi memiliki kemurnian DNA yang baik.

Penelitian Hidayat (2015) bertujuan untuk membandingkan DNA genom yang dihasilkan dari simulasi cangkang kapsul keras dengan metode kit komersial dan metode isolasi DNA SDS 1%. Hasil rata-rata kemurnian DNA yang diperoleh dari isolasi DNA dengan metode kit komersial adalah 1.60325. Hasil rata-rata kemurnian DNA yang diperoleh dari isolasi DNA dengan metode kit komersial adalah 1.31025. Berdasarkan hasil tersebut, maka kemurnian DNA yang dihasilkan dari isolasi DNA dengan metode kit komersial lebih murni dibandingkan dengan metode SDS 1%.

Penelitian Wang dkk. (2011) bertujuan untuk mengembangkan metode isolasi DNA secara sederhana yang dapat menghemat waktu dan biaya. Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode Boom dari berbagai organisme, salah satunya adalah hati tikus. Hasil kemurnian DNA yang diperoleh dari metode isolasi tersebut adalah 1.83. Berdasarkan hasil kemurnian tersebut, diperoleh bahwa DNA hasil isolasi dengan metode Boom memiliki kemurnian DNA yang baik.

5. Analisis Kuantitas dan Kualitas DNA

Pengukuran DNA dapat dilakukan dengan 2 alat yakni spektrofotometer dan elektroforesis. Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur energi secara relatif, jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan dan diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang (Khopkar, 1990). Alat spektrofotometer yang digunakan ketika analisis kuantitas DNA adalah spektronano. Spektrofotometer ini sudah dirancang khusus untuk melihat kuantitas DNA (ng/ μ l) dan kemurnian DNA tanpa harus melalui proses pengenceran. Prinsip spektrofotometer nano adalah pita ganda DNA murni akan menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan berupa protein dan fenol akan menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm (Nugroho dan Rahayu, 2016).

Kemurnian DNA dapat diukur dari rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, kemurnian DNA yang baik adalah 1,8-2,0. Kemurnian DNA dibawah 1,8 menunjukkan bahwa DNA yang diisolasi terdapat kontaminan berupa protein atau fenol dalam hasil isolasi DNA. Kemurnian DNA di atas 2,0 menunjukkan bahwa DNA yang diisolasi terdapat kontaminan RNA pada hasil isolasi DNA (Khosravinia dkk., 2007).

Kuantitas DNA dapat juga dikatakan sebagai konsentrasi total DNA yang terkandung dalam sampel yang sudah diisolasi (Khosravinia dkk., 2007). Semakin besar hasil pengukuran kuantitas, maka semakin banyak DNA yang diperoleh dari hasil ekstraksi sampel. Pengukuran kuantitas DNA

dengan spektrofotometer nanodrop berdasarkan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm (Nugroho dan Rahayu, 2016). Menurut Sutrisno dkk. (2013), pengukuran kuantitas DNA dapat dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan perhitungan dengan RNA/DNA *calculator*, dengan rumus sebagai berikut:

$$[\text{DNA}] = \text{Å}260 \times 50 \times \text{Faktor pengenceran}$$

Keterangan :

- Å260 : absorbansi sampel DNA pada panjang gelombang 260 nm.
50 : larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50 ug untai ganda DNA per ml (dsDNA)

Elektroforesis adalah suatu teknik yang mengukur laju perpindahan atau pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Prinsip dasar elektroforesis adalah bahwa tiap molekul biologis memiliki muatan listrik, yang besarnya bervariasi tergantung pada jenis/macam molekul, pH dan komposisi medium. Molekul yang bermuatan listrik tersebut, jika ditempatkan pada suatu medan listrik, akan bergerak ke arah muatan yang berbeda (Klug dan Cummings, 1994).

Prinsip kerja elektroforesis gel dimulai saat makromolekul yang bermuatan listrik ditempatkan pada medium berisi tenaga listrik. Molekul-molekul tersebut akan bermigrasi menuju kutub positif atau kutub negatif berdasarkan muatan yang terkandung di dalamnya. Molekul-molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul-molekul yang bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda) (Klug dan Cummings, 1994).

Elektroforesis dibedakan menjadi 2 tipe yakni elektroforesis vertikal dan horizontal. Elektroforesis vertikal digunakan untuk analisis pita DNA dan protein. Elektroforesis horizontal digunakan untuk analisis pita DNA dan RNA (Westermeier, 2005). Elektroforesis vertikal umumnya dilakukan menggunakan gel akrilamida, sedangkan elektroforesis horizontal dilakukan menggunakan gel *agarose* (Maftuchah dkk., 2014). Ada tiga jenis gel yang dapat digunakan dalam elektroforesis dna yaitu gel poliakrilamida denaturasi, gel alkalin agarosa dan gel *agarose* formaldehid (Davis dkk., 1994).

Gel *agarose* adalah suatu bahan semi padat berupa polisakarida yang diekstraksi dari rumput laut. Penggunaan gel *agarose* dilakukan dengan melarutkannya menggunakan *buffer*, yang dibantu melalui pemanasan (Yuwono, 2008). Karakteristik gel agarose yang umumnya digunakan adalah ukuran pori 150 nm dengan konsentrasi 1% (Westemeier, 2005). Laju migrasi DNA dapat dipengaruhi oleh 2 faktor yakni ukuran molekul DNA dan konsentrasi agarose (Ardhana, 2011).

Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer merupakan larutan buffer sebagai pelarut gel *agorose* dalam proses elektroforesis. TAE buffer berfungsi sebagai penghantar listrik sehingga fragmen DNA dapat bermigrasi di dalam gel *agarose*. Penyimpanan optimum TAE buffer ini pada suhu 4-25°C (Ardhana, 2011). *Red safe DNA gel stain* merupakan alternatif pewarna gel *agarose* pengganti penggunaan pewarna *ethidium bromide* yang dapat digunakan untuk DNA atau RNA. dengan penyimpanan suhu ruang. Pewarna

red safe memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi seperti *ethidium bromide*, namun pewarna ini tidak bersifat karsinogenik (Intron Biotechnology, 2017).

Molekul DNA yang berukuran kecil akan lebih mudah melalui matriks dibandingkan dengan molekul DNA yang berukuran besar, sehingga molekul DNA yang berukuran kecil memiliki laju migrasi yang lebih cepat. Konsentrasi *agarose* digunakan untuk menentukan besarnya matriks yang dapat memisahkan fragmen DNA. Semakin rendah konsentrasi *agarose* yang digunakan, maka akan semakin rendah matriks gel *agarose*, dan fragmen DNA akan terpisah semakin jauh. Penggunaan konsentrasi *agarose* dalam menentukan ukuran molekul DNA yang akan dipisahkan, dapat dilihat pada Tabel 2 (Ardhana, 2011).

Tabel 2. Konsentrasi *Agarose* dan Ukuran Molekul DNA (Ardhana, 2011).

No.	Konsentrasi Gel Agarose (%)	Efisiensi range pemisahan pada DNA liner (kb)
1.	0,3	60 – 5
2.	0,6	20 – 1
3.	0,7	10 – 0,8
4.	0,9	7 – 0,5
5.	1,2	6 – 0,4
6.	1,5	4 – 0,2
7.	2,0	3 – 0,1

Visualisasi DNA bertujuan untuk menganalisis kualitas dan kuantitas DNA sampel (Amersham, 1999). Gel Doc (*Gel documentation*) merupakan alat visualisasi digunakan untuk mendeteksi pita-pita DNA hasil *running* elektroforesis menggunakan UV *transiluminator*. Prinsip kerja dari Gel Doc adalah sinar UV yang dipancarkan akan memendarkan pewarna gel *agarose* yang menempel pada DNA, sehingga visualisasi pita-pita DNA dapat terlihat.

Pita-pita DNA tersebut akan teramati melalui koneksi langsung antara Gel Doc dengan komputer (Maftuchah dkk., 2014).

UltraSlim LED Illuminator merupakan alat visualisasi DNA yang digunakan untuk melihat hasil elektroforesis dan memotong gel *agarose* dalam tahap preparasi sekuensing dengan mudah. Alat ini memiliki tingkat keamanan penggunaan yang tinggi. Hal ini dikarenakan dilengkapi oleh *blue LED* yang tidak akan menyebabkan kerusakan DNA, mata dan kulit yang terpapar sinar UV (Maestrogen, 2010).

6. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Proses PCR adalah proses replikasi DNA secara enzimatik untuk DNA dalam jumlah besar dengan waktu yang singkat (Russel, 1994). Hal ini dikarenakan jumlah perbanyakan molekul DNA bertambah secara eksponensial, sehingga ribuan molekul DNA dapat dibuat dalam waktu yang singkat (Mullis, 1990). Prinsip kerja PCR yaitu memperbanyak segmen spesifik DNA yang diawali dengan perlekatan dNTP dalam reaksi termal mengikuti acuan primer. *Thermocycler* merupakan alat instrumentasi yang digunakan pada metode PCR (Russel, 1994).

Aplikasi PCR digunakan untuk kepentingan forensik, deteksi *Genetically Modified Organism* (GMO), analisis obat dan diagnosa medis. Keuntungan penggunaan PCR adalah cepat, DNA yang diperlukan dalam jumlah yang sedikit dan teknik isolasi DNA yang sederhana (Graham dan Newton, 1997). Salah satu kelemahan PCR adalah tidak dapat memberikan

informasi adanya gen pembawa toksin, kerusakan gen, mutasi gen (Handayani, 2012).

Salah satu komponen yang digunakan dalam proses PCR adalah *master mix*, yang merupakan campuran larutan-larutan yang digunakan selama proses PCR yang terdiri atas DNA acuan, primer, dNTPs, enzim polymerase DNA, buffer dan $MgCl_2$ (Handoyo dan Rudiretna, 2001). DNA acuan dijadikan sebagai cetakan pembentukan molekul DNA baru yang sama. Proses PCR dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida dengan bantuan enzim *polymerase* (Muladno, 2010).

Primer yang menempel pada ujung 5' DNA acuan yang berada di *leading strain* disebut primer *forward*. Primer yang menempel pada ujung 3' DNA acuan yang berada di *lagging strain* disebut primer *reverse* (Medialab, 2017). Protein *cytochrome b* adalah salah satu protein pembentuk kompleks III sistem fosforilasi oksidasi dari mitokondria, yang mengandung kedua fungsional reaksi redoks Q_o and Q_i . Enzim ini diperlukan oleh semua organisme eukariot dalam peran *cytochrome b* sebagai konservasi energi (Winaya, 2010).

Primer *cytochrome b* dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA spesifik pada gen *cytochrome* mamalia dengan panjang basa 200-500 bp (Gupta dkk., 2014). Penelitian Muangkram dkk. (2016) yang dilakukan bertujuan untuk mengidentifikasi spesies mamalia dengan teknik sekuensing. Primer yang digunakan adalah primer P195 dan CB1CB2 yang diperoleh dari hasil sekuensing data sekuen *GenBank*, yang kemudian di

alignment menggunakan program BLAST NCBI dan diimplementasikan menggunakan program MEGA.

Menurut Muangkram dkk. (2016), primer P195 dan CB1 CB2 merupakan primer spesifik yang mengamplifikasi DNA target mamalia pada panjang basa 150-200 bp. Primer 195 terdiri atas primer *forward* 5'-TTYGCATACGCAGCAATCYTACGATC-3' dan primer *reverse* 5'-GTTGKCCTCCRATTCATGTRAG-3'. Primer CB1 CB2 terdiri atas primer *forward* 5'TCCAACATCTCAGCATGATGGA-3' dan primer *reverse* 5'-GGAAACAGCTATGACCATGCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'.

Primer *mammals forward* dengan urutan basa 5'-GACGAGAAGACCCTATGGAGC-3'. Primer *mammals reverse* dengan urutan basa 5'-TCCGAGGTCACCCCAACCTCCG-3' mampu mengamplifikasi DNA mitokondria pada mamalia. Sepasang primer ini diperoleh dari hasil *alignment* 334 DNA mamalia dengan spesies yang berbeda menggunakan program Mega, yang kemudian dilihat kembali hasil *sequence* menggunakan BLAST (Tillmar dkk., 2013).

Enzim polimerase DNA berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerase DNA. *Hot start taq* merupakan *taq* yang umumnya digunakan pada proses PCR dengan tingkat spesifikasi yang tinggi. *Hot start taq* DNA polimerase dapat mempermudah dan menyederhanakan proses PCR dengan tingkat kontaminasi yang kecil (Qiagen, 2008). *Direct animal taq* merupakan *taq* berisikan *hotstart* II DNA polimerase yang didesain dengan tingkat sensitivitas yang tinggi. Hal ini dikarenakan *direct animal taq* dapat

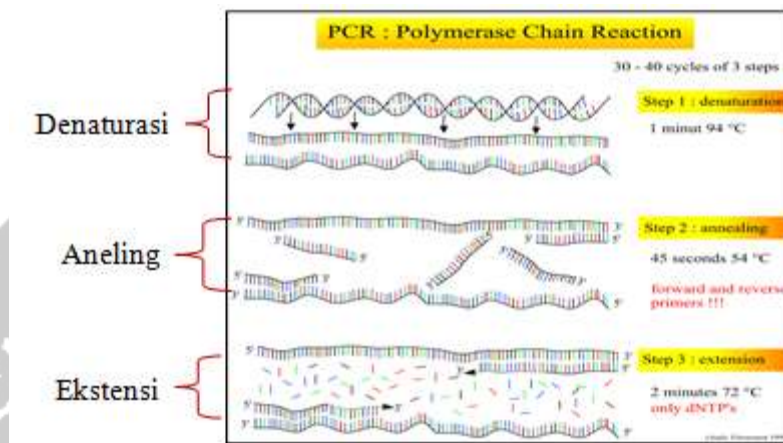
digunakan dalam proses PCR pada DNA dari semua jaringan hewan (Scientific, 2014).

Buffer berfungsi menjaga kondisi pH selama proses PCR. $MgCl_2$ berfungsi sebagai kofaktor yang menstimulasi aktivitas DNA polymerase (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Pada teknik PCR diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP, dCTP, dGTP dan dTTP. Amplifikasi ini dapat menghasilkan lebih dari sejuta kali DNA asli (Muladno, 2010).

PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan, yaitu pemisahan (denaturasi), penempelan primer (*annealing*) dan pemanjangan utas (*extension*) (Gaffar, 2007). Denaturasi (*denaturation*) adalah proses pemisahan rantai DNA acuan *double* heliks menjadi *single* heliks dikarenakan suhu tinggi $94^{\circ}C$ setiap 1 menit. *Annealing* adalah proses penempelan pasangan primer pada DNA target yang memiliki basa yang komplemen pada suhu $54^{\circ}C$ setiap 45 detik. Primer merupakan sekuen basa pendek (15-30 basa) yang terdiri dari primer *forward* dan *reverse* (Lakowicz, 1983). *Extension* adalah proses pemanjangan utas primer atau reaksi polimerisasi yang dikatalisis oleh DNA polymerase pada suhu $72^{\circ}C$ setiap 2 menit (Lakowicz, 1983).

Pada akhir siklus pertama, satu molekul DNA untai ganda dilipatgandakan jumlahnya menjadi dua molekul DNA untai ganda. Dua molekul DNA untai ganda hasil amplifikasi pada siklus pertama menjadi DNA target dan dilanjutkan dengan dilipatgandakan menjadi empat molekul DNA. Empat molekul baru ini kemudian dilipatgandakan lagi jumlahnya

menjadi delapan dan seterusnya. Tahapan dalam amplifikasi PCR, dapat dilihat pada Gambar 1 (Muladno, 2010).



Gambar 1. Siklus Pada PCR melalui 3 Tahap (Sumber: Lakowicz, 1983).

7. Primer Spesifik Babi

Primer standar dalam identifikasi kandungan DNA babi suatu produk adalah primer P14 yang memiliki panjang nukleotida 481 bp. Primer ini merupakan salah satu dari ke-13 lokus PRE-1 (*Porcine Repetitive Element*) yang terdapat pada genom babi (Fibriana dkk., 2012). Lokus PRE-1 merupakan sekuen *Short Interspersed Nucleotide Element* (SINE) genom babi yang pertama kali ditemukan oleh Singer dkk. (1987). Ciri khas lokus PRE-1 adalah memiliki *split* promotor RNA polymerase III dan kaya akan poly (A) pada ujung 3'. Sekuen PRE-1 terletak pada bagian sentromer dari kromosom di dalam genom babi (Nuraini, 2004).

Primer yang umumnya digunakan dalam identifikasi kandungan DNA babi pada produk pangan dan farmasi adalah *cytochrome b*. Primer *cytochrome b* merupakan salah satu bagian dari sitokrom yang berperan sebagai transportasi elektron di dalam mitokondria (Marlina dkk., 2013).

Selain *cytochrome b*, primer yang dapat digunakan untuk identifikasi kandungan babi adalah primer gen leptin. Penggunaan dengan primer ini tidak dianjurkan dikarenakan dapat mengamplifikasi DNA sapi, sehingga hasil amplifikasi DNA menjadi tidak spesifik (Safitri dan Wardani, 2015).

Penelitian Yoshida dkk. (2009) dilakukan untuk mendeteksi ada tidaknya DNA babi pada 52 daging dan makanan olahan yang ada di Jepang sebagai salah satu upaya inspeksi yang dilakukan kantor analisis makanan dan bahan pertanian di Jepang. Metode yang digunakan adalah PCR, dengan primer PPA 6 dan PPA 8 yang dapat mengamplifikasi mitokondria DNA babi pada panjang basa 83 bp dan 126 bp. Kedua primer ini memiliki target *sequence* pada mitokondria DNA babi yakni mtATP 6 dan mtATP 8. Penelitian Tanabe dkk. (2007) dilakukan untuk mendeteksi ada tidaknya DNA babi pada 25 daging dan makanan olahan. Metode yang digunakan adalah PCR, dengan primer *pork* yang dapat mengamplifikasi DNA mitokondria babi pada panjang basa 130 bp.

8. Sekuensing DNA

Sekuensing DNA merupakan suatu proses pengenalan urutan basa nukleotida pada suatu fragmen DNA. Hasil sekuensing dapat digunakan untuk berbagai aplikasi, antara lain sebagai konfirmasi identitas suatu klon, identifikasi mutasi gen tertentu, karakteristik cDNA dan verifikasi DNA rekombinan. Metode sekuensing dapat dilakukan dengan metode Maxam-Gilbert dan Sanger. Metode Maxam-Gilbert adalah suatu metode sekuensing dengan bahan kimia spesifik, yang digunakan sebagai pemotong fragmen

DNA target. Metode Sanger adalah suatu metode sekuensing dengan enzim DNA polimerase yang akan membentuk salinan komplementer dari fragmen DNA (Annisa, 2012).

Hasil data sekuensing dapat dianalisis dengan berbagai *software* yang tersedia. *Software* yang umumnya digunakan untuk *viewing* dan *editing* data sekuensing adalah *software* Chromas Lite (Sulandri dan Zein, 2009). Hasil *editing* data sekuensing dilanjutkan dengan analisa menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang dapat diakses secara *online* pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Program BLAST ini dikembangkan oleh *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dan digunakan untuk menelusuri identifikasi sekuen dari suatu sampel. Identifikasi suatu sampel tersebut dilakukan perbandingan antara sekuen sampel dengan sekuen biologis secara cepat (Annisa, 2012).

9. Hipotesis

- a. Sediaan kapsul suplemen kecantikan yang ada di Kota Yogyakarta positif mengandung DNA babi.
- b. Primer spesifik babi yang digunakan dalam penelitian ini dapat mengamplifikasi DNA babi pada sampel sediaan kapsul suplemen kecantikan.
- c. Hasil sekuensing sampel produk PCR memberikan konfirmasi yang sesuai dengan metode elektroforesis dari hasil amplifikasi sampel menggunakan primer spesifik babi.