

JURNAL

**DETEKSI CEMARAN DAGING BABI PADA PRODUK SOSIS SAPI DI
KOTA YOGYAKARTA DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN
REACTION***

Disusun oleh :
Vallery Athalia Priyanka
NPM : 130801398



UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
YOGYAKARTA
2017

Deteksi Cemaran Daging Babi pada Produk Sosis Sapi di Kota Yogyakarta dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*

The Detection of Pork Contamination in the Beef Sausage Products in Yogyakarta City with *Polymerase Chain Reaction* Method

Vallery Athalia Priyanka^{1,*}, Susana Ristiarini¹, Pramana Yuda¹

¹Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta

*valleryathalia@gmail.com

Intisari

Produk makanan dengan bahan dasar daging beresiko terhadap pencampuran dengan daging lain, dimana pencampuran tersebut sulit untuk dideteksi dengan mata telanjang. Kemajuan teknologi khususnya di bidang molekuler menawarkan kemudahan untuk mendeteksi adanya cemaran daging lain pada produk pangan. Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi cemaran daging babi dalam produk sosis sapi dari beberapa pasar di Kota Yogyakarta menggunakan teknik PCR, melakukan verifikasi hasil elektroforesis produk PCR sampel dengan metode sekuensing dan mengetahui primer yang lebih efektif dan sensitif dalam mendeteksi DNA babi pada sampel sosis. Metode PCR yang digunakan menggunakan enzim polimerase Taq *Direct Animal* dan *Hot Start*, serta KOD FX Neo.

Penelitian ini menggunakan 6 primer, terdiri dari 2 primer universal mamalia yaitu primer P195 dan CB, dan 4 primer spesifik babi yaitu P14, PPA6, PPA8, dan *pork*. Primer universal mamalia digunakan untuk mendeteksi kandungan DNA mamalia pada sampel, sedangkan primer spesifik babi untuk mendeteksi kandungan DNA babi pada sampel. Sampel yang digunakan berjumlah 9 sosis. Tujuh sampel diambil dari pasar di Yogyakarta dan 2 sampel diambil dari pasar di Thailand. Berdasarkan penelitian yang dilakukan diperoleh hasil bahwa sampel terdeteksi positif mengandung DNA mamalia dengan primer universal mamalia yaitu P195 dan CB sebesar 100% dan 0%. Primer CB mengamplifikasi DNA mamalia pada semua sampel dengan ukuran tidak spesifik. Presentase cemaran DNA babi dengan primer spesifik babi P14, PPA6, PPA8 dan *pork* masing-masing sebesar 88,89%, 22,22%, 22,22%, dan 22,22%.

Primer PPA6, PPA8, dan *pork* mengamplifikasi DNA babi dengan ukuran tidak spesifik sedangkan primer P14 mengamplifikasi DNA babi dengan ukuran spesifik pada semua sampel, sehingga primer P14 lebih baik dalam mendeteksi cemaran DNA babi pada sampel. Primer P14 diuji sensitifitasnya dalam mendeteksi DNA babi. Satu sampel positif babi dibuat variasi konsentrasi dari 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, dan 100%. Hasilnya primer P14 dapat mendeteksi cemaran DNA babi pada sampel hingga 1%. Dua sampel yang positif tercemar DNA babi menggunakan primer P14 diambil untuk disekuensing. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa pita yang terbentuk dari produk PCR dengan primer P14 adalah spesies *Sus scrofa*.

Abstract

Meat products with meat-based ingredients are at risk of mixing with other meats, where the mixing is difficult to detect by naked eye. Technological advances, especially in the molecular field, offer the ease of detecting other meat contaminants in food products. The purpose of this study was to detect contamination of pork in cow sausage products from several markets in Yogyakarta City using PCR technique, to verify electrophoresis results of PCR samples with sequencing method and to find out more effective and sensitive primers in detecting pig DNA in sausage samples. The PCR method using Taq Direct Animal and Hot Start polymerase enzymes, and KOD FX Neo.

This study used 6 primers, consisting of 2 primary universal mammals namely P195 and CB primers, and 4 pig-specific primers namely P14, PPA6, PPA8, and pork. Universal mammalian primers are used to detect mammalian DNA in samples, whereas pig primers primarily detect pig DNA in samples. The sample used amounted to 9 sausages. Seven samples were taken from the market in Yogyakarta and 2 samples were taken from the market in Thailand. Based on the research, it was found that the positive samples contained mammalian DNA with a universal primer of mammals, P195 and CB of 100% and 0%. CB primer amplifies mammalian DNA in all samples of non-specific size. The percentage of pig DNA contamination with p14 specific primers, PPA6, PPA8 and pork were 88.89%, 22.22%, 22.22%, and 22.22%, respectively.

Primer PPA6, PPA8, and pork amplify pig DNA by an unspecified size whereas P14 primers amplify pig DNA with specific sizes in all samples, so P14 primers are better at detecting pig DNA contamination in the sample. Primer P14 tested its sensitivity in detecting pig DNA. One positive sample of pigs made variations in concentrations of 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, and 100%. The result of P14 primers can detect pig DNA contamination in samples up to 1%. Two samples were positively contaminated by pig DNA using P14 primers taken for sequencing. The sequencing results show that the bands formed from PCR products with primers P14 are *Sus scrofa* species.

PENDAHULUAN

Pasar pangan yang semakin global membawa pengaruh baik, namun masyarakat patut berhati-hati dengan bahan makanan dalam bentuk olahan atau mentah yang sangat mudah di dapat namun tanpa melalui pengujian. Makanan olahan, khususnya daging sapi, kerap kali tercampur daging lain seperti ayam atau babi. Pencampuran daging mentah dengan bahan dari spesies lain dimaksudkan untuk menghasilkan produk akhir dengan harga beli yang terjangkau masyarakat dibandingkan jika daging mentah tersebut tersusun murni dengan bahan aslinya (misal daging sapi).

Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 18 Tahun 2012 Tentang Pangan, menyatakan keamanan pangan adalah kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegah pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia, dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan, dan membahayakan kesehatan manusia serta tidak bertentangan dengan agama, keyakinan, dan budaya masyarakat sehingga aman untuk dikonsumsi.

Menurut Soedjono (2004), produk-produk makanan yang dibuat dengan campuran daging lain daripada yang seharusnya seringkali sulit dibedakan, misalnya pada sosis yang dagingnya telah dihancurkan dan dicampur dengan berbagai bahan lainnya. Berbagai teknik untuk mengidentifikasi jenis daging yang digunakan dalam produk pangan terus dikembangkan. Kemajuan teknologi di bidang molekuler menjadi pilihan untuk mengidentifikasi cemaran daging lain. Penelitian yang dilakukan Margawati dkk. (2011) di Bogor, menyatakan bahwa teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) mampu dijadikan alat untuk mendeteksi kontaminasi daging lain karena merupakan teknik yang cepat dan sensitif.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi cemaran daging babi pada produk sosis sapi yang beredar di Kota Yogyakarta yang diambil dari pasar tradisional dan pasar modern sebanyak 9 buah. Penelitian serupa yang sudah dilakukan menggunakan produk olahan daging lain seperti bakso dan menggunakan primer yang bervariasi. Deteksi cemaran daging babi dalam penelitian ini dilakukan dengan 6 primer, yaitu 2 primer universal mamalia dan 4 primer spesifik babi menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

Mendeteksi cemaran DNA babi dapat dilakukan dengan elektroforesis, namun untuk mengetahui urutan basa nukleotida dari DNA babi yang terbentuk perlu dilakukan sekuensing. Sekuensing juga dapat digunakan untuk memastikan bahwa DNA yang terbentuk adalah betul DNA babi. Produk PCR sampel sosis sapi yang teramplifikasi menggunakan primer spesifik babi kemudian diambil dan diproses untuk sekuensing sehingga diketahui urutan

basa nukleotida yang tersusun dan dapat dibandingkan dengan DNA babi yang ada di *database*.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : mikrotube 1,5 ml, mikrotube 2 ml, PCR mikrotube (0,2 ml), *micropipette* BIOHIT, *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, plastik, kertas tissue, spidol marker, *Vortex ABV-1 Vortexer AccuBiotech Co.,Ltd.*, *spindown QikSpin*, *waterbath shaker NI-13S BIOER*, kulkas, *Gyrozen Mini centrifuge*, *G-Spin microcentrifuge*, *conicle*, *oven*, *Spectrophotometer Thermo Scientific Nanodrop Lite*, parafilm, *mikrotube rack*, *electrophoresis MP-300N MAJOR SCIENCE*, *power supply*, timbangan analitik AL204 METTLER TOLEDO, *thermocycler BIOMETRA®*, *gel logic 200 imaging system*, *coolish box*, *gloves*, masker, pisau dan gelas ukur.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel sosis curah, sampel sosis bermerk, sosis babi matang, sosis ayam, sosis babi mentah, daging babi segar, daging sapi segar, larutan proteinase K, larutan kloroform, TAE buffer, *loading dye*, DNA ladder, *SYBR safe DNA gel stain*, *agarose*, *HOT START* dan *DIRECT ANIMAL Taq DNA polymerase*, enzim KOD FX Neo, dNTPs, larutan 2X SSC, fenol DNA, etanol absolut, 75% etanol, TE buffer, larutan HF buffer, dNTPs, dan *destilated water*.

Primer yang digunakan adalah primer P14 (mengamplifikasi fragmen PRE-1, Sulandari dkk (1997)), primer P195 (mengamplifikasi fragmen *cyt b*, Muangkram dkk. (2016)), primer CB (mengamplifikasi fragmen *cyt b*, (Muangkram dkk. (2016)), primer PPA6 (mengamplifikasi fragmen mtATP6, Yoshida dkk. (2009)), primer PPA8 (mengamplifikasi fragmen mtATP8, Yoshida dkk. (2009)), primer pork (mengamplifikasi fragmen *cyt b*, Tanabe dkk. (2007)). Urutan basa primer dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Urutan basa dan ukuran Primer

Nama Primer	Urutan Basa
P14 F	5'-CCCCGTCTCCTTCCTCCGGTGGTTGATG-3'
P14 R	5'-CTGCGACACATGATGCCTTTATGTCCCAGC-3'
P195 F	5'-TTYGCATACGCAATCYTACGATC-3'
P195 R	5'-CTTGKCCTCCRATTCATGTRAG-3'
CB1 F	5'-TCCAACATCTCAGCATGATGAA-3'
CB2 R	5'-GGAAACAGCTATGACCATGCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'
PPA6 F	5'-CTACCTATTGTCACCTTAGTT-3'
PPA6 R	5'-GAGATTGTGCGGTTATTAATG-3'
PPA8 F	5'-ATCTACATGAATCATTACAATTAC-3'
PPA8 R	5'-CTATGTTTTTGAGTTTTGAGTTCA-3'
Pork F	5'-ATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTG-3'
Pork R	5'-CGTTTGCATGTAGATAGCGAATAAC-3'

Tahap Penelitian

1. Pengumpulan sampel

Wilayah pengambilan sampel yang sama dengan tempat *survey* awal dilakukan di D. I. Y. dengan menggunakan metode populasi terjangkau (*accessible population, source population*). Sampel yang digunakan adalah 6 sosis sapi, 1 sosis babi matang, 1 sosis ayam, dan 1 sosis babi mentah. Sampel sosis yang sudah dikumpulkan dipotong menjadi bagian kecil, bagian paling luar sosis dibuang dan yang diambil bagian tengah sosis. Potongan sosis tersebut dicincang hingga halus menggunakan silet dan tusuk gigi di dalam *petridish*.

2. Ekstraksi DNA sampel Sosis Sapi dan DNA Daging Babi

Sampel sosis lalu ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan ke *microtube* 1,5 ml. DNA sampel sosis dan daging babi diekstraksi menggunakan metode ekstraksi PCE. Isolat DNA yang diperoleh kemudian diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan alat spektrofotometer (Safitri dan Wardani, 2015).

3. Pengukuran Konsentrasi dan Kuantitas DNA

Pengukuran konsentrasi dan kuantitas DNA sampel diukur menggunakan *Thermo Scientific Nanodrop Lite Spectrophotometer*. Alat

dikalibrasi menggunakan *destilated water* sebanyak 1 µl. Sampel yang akan diukur konsentrasi dan kuantitas DNA-nya sebanyak 1 µl diletakkan pada sensor. Konsentrasi dan Kuantitas DNA dapat dilihat pada perbandingan absorbansi A260/A280.

4. Amplifikasi DNA sampel Sosis Sapi dan DNA daging babi

Masing-masing PCR tube yang digunakan diberi label sesuai dengan kode sampel sosis, kontrol positif (DNA daging babi), dan kontrol negatif (*destilated water*). Protokol *master mix* dan siklus PCR sesuai dengan protokol dari *Hot Start Taq DNA Polymerase* dan *Direct Animal Taq DNA Polymerase*.

Setiap larutan di dalam PCR tube dicampur. PCR tube kemudian dimasukkan ke dalam mesin *thermocycler* dengan dilakukan pengaturan sesuai dengan protokol dari masing-masing primer yang digunakan. Hasil amplifikasi PCR divisualisasikan menggunakan elektroforesis dan dilihat dengan GelDoc.

5. Analisa hasil amplifikasi.

Hasil amplifikasi kemudian dianalisa secara visual dengan GelDoc. Sampel dinyatakan positif tercemar babi apabila hasil visualisasi sampel sosis sapi tersebut terbentuk *clear band* yang sesuai dengan kontrol positif. Sampel sosis sapi dinyatakan negatif tercemar babi apabila hasil visualisasi sampel tersebut terbentuk *no band* dengan kontrol positif. Hasil positif cemaran DNA babi kemudian disekuensing. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan aplikasi BLAST yang kemudian akan membandingkan kemiripan hasil sekuensing dengan *database*.

6. Pengujian sensitifitas metode PCR – primer sepsifik

DNA sampel sosis sapi yang terdeteksi positif DNA babi dibuat variasi konsentrasi, yaitu 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, dan 100%. Primer yang diuji sensitifitasnya adalah primer P14. Protokol *master mix* dan siklus PCR yang digunakan adalah siklus PCR dengan *Direct Animal Taq DNA polymerase* dan primer P14 (suhu *annealing* 60°C).

7. Amplifikasi dengan *Direct PCR*

Pengulangan deteksi DNA babi dilakukan pada 2 sampel positif DNA babi yang dipilih secara acak (sampel B dan F). Pengulangan deteksi DNA babi ini dilakukan dengan *direct PCR* yaitu menggunakan potongan kecil sosis dan menggunakan lisat sosis (metode proteinase K). Cara *direct PCR* menggunakan potongan kecil sosis sebagai berikut, potongan kecil sosis sapi diambil menggunakan tusuk gigi. Potongan kecil sosis kemudian dimasukkan ke dalam PCR *tube*. *Master mix* dibuat sesuai dengan protokol yang pada KOD FX Neo.

Deteksi DNA babi menggunakan lisat sosis (metode proteinase K) diawali dengan potongan sampel sosis diambil dimasukkan ke dalam PCR *tube*, kemudian dicampurkan 500 μ l *lysis buffer*. Setelah potongan sampel sosis dicampur dengan *lysis buffer* kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 1 jam, dilanjutkan inkubasi kembali pada suhu 95°C selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan dari pellet. Protokol PCR *Master mix* yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 12.

Master mix masing-masing metode deteksi DNA babi dengan *direct PCR* dan lisat sosis kemudian diamplifikasi dengan siklus PCR yang sama. Masing-masing PCR *tube* kemudian dimasukkan ke dalam mesin *thermocycler* dengan dilakukan pengaturan sesuai dengan protokol KOD FX Neo.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA yang terekstraksi diukur dengan alat spektrofotometer dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kuantitas DNA

Sampel	A260 (10mm)	A260/A280	Konsentrasi (ng/ μ l)
A	0,111	1,87	5,6
B	1,889	1,96	94,4
C	0,194	2,07	9,7
D	0,280	1,92	14,0
E	0,220	2,02	11,0
F	0,919	1,88	46,0
G	0,087	1,76	4,4
H	35,635	2,06	1781,8
I	22,468	2,08	1123,4

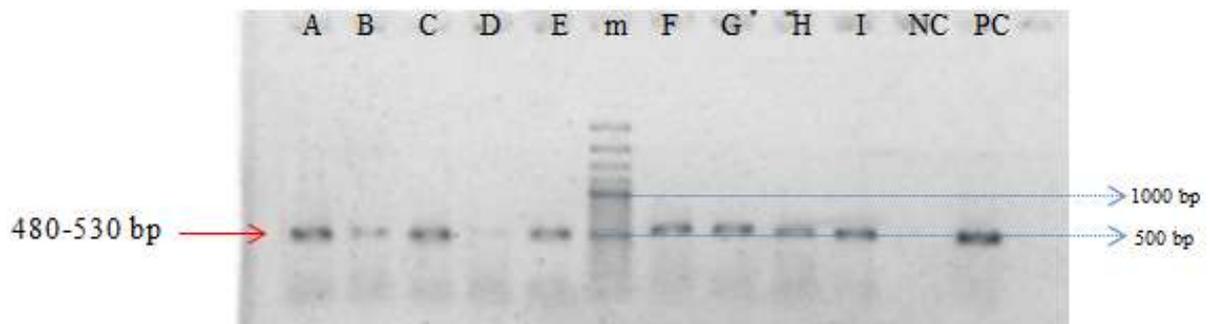
Hasil perbandingan A260/A280 pada setiap sampel menunjukkan ada tidaknya kontaminasi RNA atau protein pada DNA hasil ekstraksi. Data menunjukkan bahwa hasil ekstraksi DNA cukup baik, tidak terkontaminasi RNA ataupun protein, maka baik untuk digunakan dalam amplifikasi. Rasio absorbansi A260/A280 yang diukur berkisar antara 1,8 – 2,0. Menurut Wilfinger dkk. (1997), rasio 1,8 – 2,0 secara umum diterima sebagai murni untuk DNA. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa metode PCE dapat digunakan untuk mengekstraksi DNA dari sosis.

A. Analisis Molekuler DNA Babi dengan Variasi Primer

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil analisis molekuler dengan variasi primer, sebagai berikut:

1. Primer P14

Menurut Fibriana dkk. (2012), primer P14 adalah primer yang dapat mengamplifikasi lokus PRE-1 yang ada pada genom babi. Hasil produk PCR lokus PRE-1 yang diamplifikasi oleh primer P14 menghasilkan panjang basa 481 bp. Berdasarkan metode PCR dengan primer P14, sampel A sampai I, kontrol negatif, dan kontrol positif diperoleh hasil seperti Gambar 1.



Gambar 2. Hasil visualisasi produk PCR kontrol positif dan sampel dengan primer P14.

Ket. m : DNA ladder (100bp), A-F : sampel sosis sapi, G : sampel sosis babi matang, H : sosis ayam, I : sosis babi mentah, NC : *destilated water*

Dari proses amplifikasi DNA PC diperoleh produk PCR sesuai yang diinginkan, yaitu pita spesifik berukuran 480 hingga 530 bp. Daging babi sebagai PC dijadikan dasar untuk menyimpulkan A, B, C, E, F, G, H, dan I mengandung DNA babi. Pada NC (*negative control*, yaitu *destilated water*)

dan sampel sosis D tidak teramplifikasi, sehingga disimpulkan sampel sosis D tidak mengandung babi.

Sampel B dan F yang positif teramplifikasi primer P14 selanjutnya dilakukan sekuensing. Hal ini untuk memastikan pita DNA tersebut adalah DNA babi. Hasil sekuensing kemudian dianalisis menggunakan BLAST NCBI. Analisis ini untuk membandingkan urutan DNA hasil sekuensing dengan *database*. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 3.

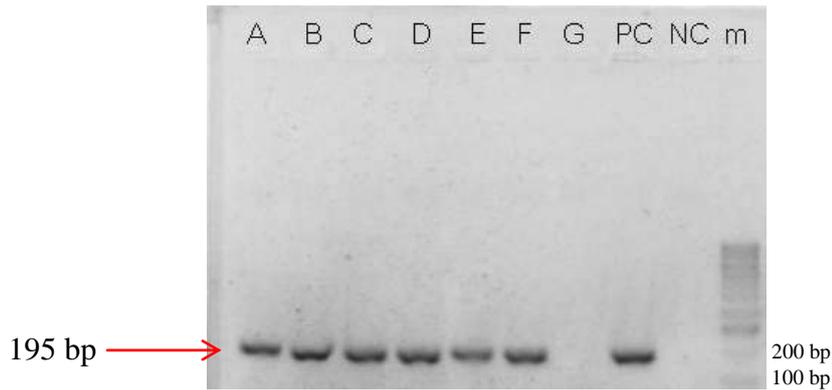
Tabel 3. Hasil pencarian hasil sekuensing sampel DNA babi menggunakan primer P14 dengan data sekuen DNA babi dari NCBI.

No	Description Species	Identity
1	<i>Pig DNA sequence from clone CH242-139C2 on chromosome 1, complete sequence</i>	95%
2	<i>Pig DNA sequence from clone CH242-59K14 on chromosome 4, complete sequence</i>	95%
3	<i>Sus scrofa genome assembly, chromosome: X</i>	95%
4	<i>Pig DNA sequence from clone CH242-77E21 on chromosome X, complete sequence</i>	95%
5	<i>Sus Scrofa genome assembly, chromosome: X</i>	95%
6	<i>Sus scrofa BAC clone KNP 893F3</i>	94%
7	<i>Sus scrofa DNA, TRDV gene segments for T cell receptor delta-chain</i>	94%

Berdasarkan Tabel 3. Diperoleh hasil bahwa sampel B dan F memiliki homologi sebesar 95% dengan spesies *Sus scrofa*. Kemiripan hasil sekuensing produk PCR dan sekuens *database* spesies *Sus scrofa* menunjukkan bahwa primer P14 baik untuk mengidentifikasi DNA babi pada sosis.

2. Primer P195

Menurut Muangkram dkk. (2016), primer P195 merupakan primer universal mamalia yang mengamplifikasi gen *cyt b* sepanjang 195 bp. Berdasarkan metode PCR dengan primer P195, sampel A sampai I, kontrol negatif, dan kontrol positif diperoleh hasil seperti Gambar 2.



Gambar 3. Hasil visualisasi produk PCR kontrol positif dan sampel dengan primer P195.

Ket. m : DNA ladder (100bp), A-F : sampel sosis sapi, G : sampel sosis babi matang, NC : *destilated water*

Dari proses amplifikasi DNA PC diperoleh produk PCR sesuai yang diinginkan, yaitu pita spesifik berukuran 195 bp. Kontrol positif yaitu DNA daging babi dijadikan acuan bahwa sampel A, B, C, D, E, dan F teramplifikasi DNA babi atau DNA mamalia. Sampel G menunjukkan hasil negatif, hal ini mungkin terjadi *human error*. Kontrol negatif menunjukkan hasil negatif sehingga hasil visualisasi ini bebas kontaminasi.

3. Primer CB (*cyt b*)

Menurut Muangkram dkk. (2016), primer CB merupakan primer universal mamalia yang mengamplifikasi gen *cyt b* sepanjang 200 bp. Berdasarkan metode PCR dengan primer P195, sampel A sampai I, kontrol negatif, dan kontrol positif diperoleh hasil seperti Gambar 3.



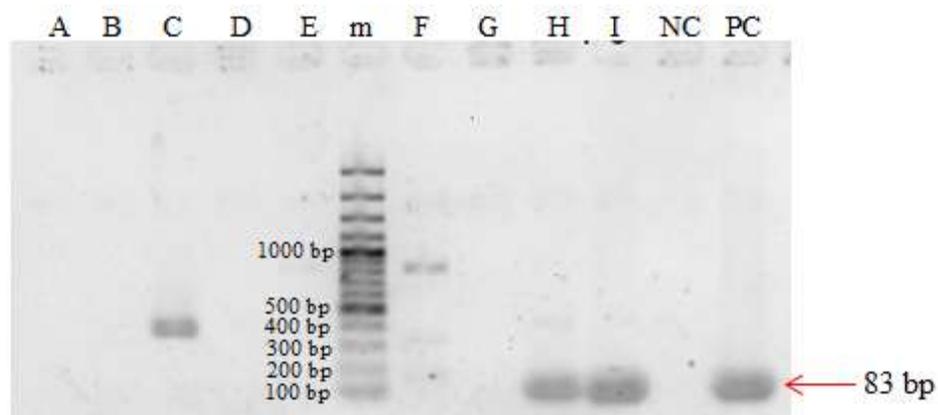
Gambar 3. Hasil visualisasi produk PCR kontrol positif dan sampel dengan primer CB.

Ket. m : DNA ladder (100bp), A-F : sampel sosis sapi, G : sampel sosis babi matang, H : sosis ayam, I : sosis babi mentah, NC : *destilated water*

Terlihat pada Gambar 3. bahwa sampel B, C, D, E, F, H, dan I positif DNA mamalia namun tidak spesifik. Sampel A membentuk *smear band*. Ukuran produk PCR yang diharapkan adalah 200 bp, namun yang terbentuk adalah 350 hingga 370 bp. Hal ini dapat disimpulkan bahwa primer CB dapat mengamplifikasi daerah gen *cyt b* lebih panjang dari yang diperkirakan.

4. Primer PPA6

Menurut Yoshida dkk. (2009), primer PPA6 merupakan primer spesifik mengamplifikasi DNA babi pada mtATP6 sebagai sekuen target. Ukuran produk PCR yang diharapkan adalah 83 bp. Berdasarkan metode PCR dengan primer PPA6, sampel A sampai I, kontrol negatif, dan kontrol positif diperoleh hasil seperti Gambar 4.



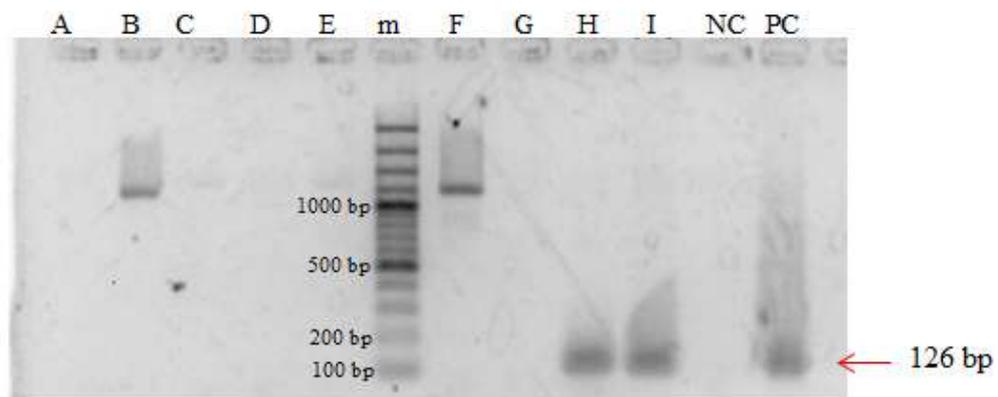
Gambar 5. Hasil visualisasi produk PCR kontrol positif dan sampel dengan primer PPA6

Ket. m : DNA ladder (100bp), A-F : sampel sosis sapi, G : sampel sosis babi matang, H : sosis ayam, I : sosis babi mentah, NC : *destilated water*

Pada Gambar 4. terlihat bahwa sampel C dan F membentuk *unspecified band*, karena ukuran DNA nya melebihi dari panjang basa yang diharapkan 83 bp, yaitu sekitar 400 bp dan 900 bp. Sampel H dan I berhasil mengamplifikasi DNA sepanjang 83 bp, hal ini menunjukkan bahwa sampel H dan I positif mengandung DNA babi. Sedangkan DNA sampel A, B, D, E, dan G tidak teramplifikasi.

5. Primer PPA8

Menurut Yoshida dkk. (2009), primer PPA8 merupakan primer spesifik mengamplifikasi DNA babi pada mtATP8 sebagai sekuen target. Ukuran produk PCR yang diharapkan adalah 126 bp. Berdasarkan metode PCR dengan primer PPA6, sampel A sampai I, kontrol negatif, dan kontrol positif diperoleh hasil seperti Gambar 5.



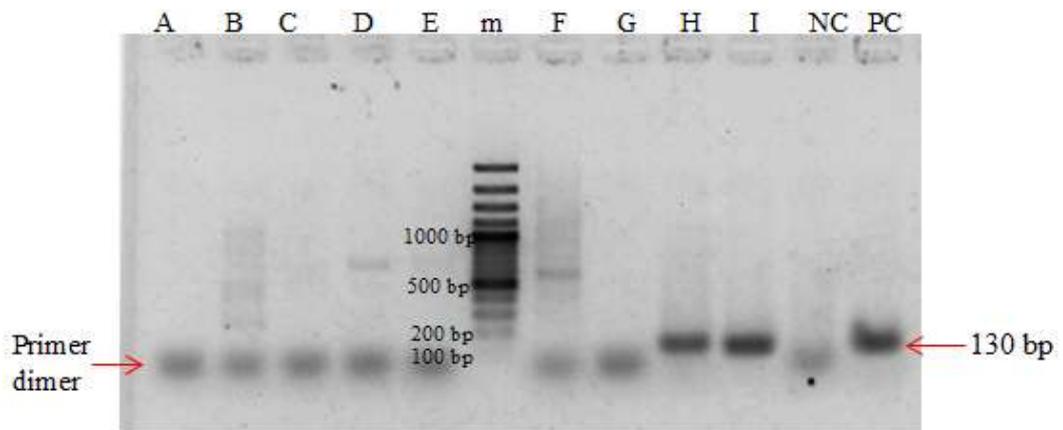
Gambar 5. Hasil visualisasi produk PCR kontrol positif dan sampel dengan primer PPA8

Ket. m : DNA ladder (100bp), A-F : sampel sosis sapi, G : sampel sosis babi matang, H : sosis ayam, I : sosis babi mentah, NC : destilated water

Pada Gambar 5. terlihat bahwa sampel B dan F membentuk *unspecified band*, karena ukuran DNA nya melebihi dari panjang basa yang diharapkan 126 bp, yaitu sekitar 1100 bp. Sampel H dan I berhasil mengamplifikasi DNA sepanjang 126 bp, hal ini menunjukkan bahwa sampel H dan I positif mengandung DNA babi. DNA sampel A, C, D, E, dan G tidak teramplifikasi.

6. Primer *pork*

Menurut Tanabe dkk. (2007), primer *pork* merupakan primer spesifik mengamplifikasi DNA babi pada *cyt b* babi sebagai sekuen target. Ukuran produk PCR yang diharapkan adalah 130 bp. Berdasarkan metode PCR dengan primer PPA6, sampel A sampai I, kontrol negatif, dan kontrol positif diperoleh hasil seperti Gambar 6.



Gambar 6. Hasil visualisasi produk PCR kontrol positif dan sampel dengan primer *pork*
 Ket. m : DNA ladder (100bp), A-F : sampel sosis sapi, G : sampel sosis babi matang, H : sosis ayam, I : sosis babi mentah, NC : *destilated water*

Pada Gambar 6. terlihat bahwa sampel D dan F membentuk *unspecified band*, karena ukuran DNA nya melebihi dari panjang basa yang diinginkan 130 bp, yaitu sekitar 800 bp dan 600 bp. Sampel H dan I berhasil mengamplifikasi DNA sepanjang 130 bp, hal ini menunjukkan bahwa sampel H dan I positif mengandung DNA babi. DNA sampel A, B, C, E, dan G tidak teramplifikasi.

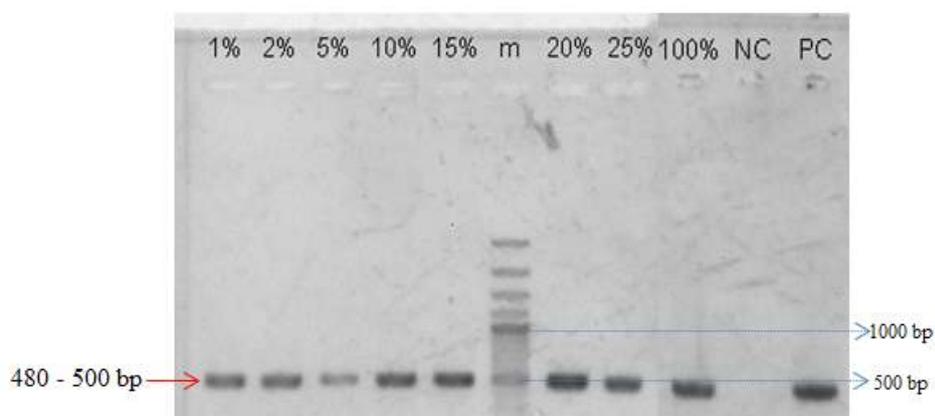
Primer dimer dapat terbentuk karena konsentrasi primer yang terlalu tinggi. Konsentrasi primer tinggi ini dapat meningkatkan *mispriming*, akumulasi produk amplifikasi tidak spesifik, dan meningkatkan kemungkinan terjadinya reaksi amplifikasi antar primer yang akan menghasilkan produk dimer (Innes dan Gelfand, 1990).

Berdasarkan hasil visualisasi produk PCR sampel sosis dengan masing-masing primer di atas dapat disimpulkan bahwa primer yang paling spesifik dan sensitif untuk mendeteksi DNA babi pada sosis sapi adalah primer P14. Hal ini dapat dibuktikan dengan terbentuknya pita yang jelas dari produk PCR, pita yang terbentuk juga berukuran sesuai dengan referensi Fibriana yaitu 481 bp, tidak terbentuk pita yang ukurannya tidak spesifik, dan tidak menunjukkan kontaminasi pada kontrol negatif.

Primer spesifik babi seperti PPA6, PPA8, dan *pork* tidak cocok untuk mendeteksi DNA babi pada sosis sapi. Hal ini disebabkan karena hasil visualisasi amplifikasi dari ketiga primer tersebut terdapat pita yang ukurannya tidak spesifik pada beberapa sampel sosis sapi. Pita dengan ukuran yang tidak spesifik tersebut menandakan bahwa primer PPA6, PPA8, dan *pork* dapat mengamplifikasi DNA pada daerah selain daerah target, sehingga kespesifikan primer mengamplifikasi DNA target tersebut rendah.

B. Uji Sensitifitas Primer P14

Variasi konsentrasi sampel positif kontaminasi DNA babi dibuat menjadi 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, dan 100%. Variasi konsentrasi dibuat untuk mengetahui kemampuan primer P14 dalam mengamplifikasi DNA babi dari kuantitas DNA babi paling sedikit hingga kuantitas paling banyak. Hasil elektroforesis untuk uji spesifisitas primer P14 memperlihatkan bahwa primer P14 masih dapat mengamplifikasi DNA babi hingga konsentrasi 1% dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil visualisasi produk PCR sampel positif DNA babi dengan variasi konsentrasi.

Ketebalan pita yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi terlihat berbeda. Pita pada konsentrasi 5% terlihat tipis, hal ini disebabkan karena kesalahan teknis. Volum cetakan DNA konsentrasi 5% yang digunakan lebih sedikit dari volum cetakan DNA konsentrasi yang lain, sehingga pita yang terbentuk lebih tipis. Pita pada konsentrasi 20% terlihat lebih tebal dibanding pita pada konsentrasi 25% dan 100%. Padahal

konsentrasi DNA yang tinggi dapat membentuk pita yang tebal. Hal ini dapat disimpulkan bahwa konsentrasi cetakan DNA yang optimum dalam mengidentifikasi DNA babi pada sosis sapi adalah 20%, sehingga komponen master mix yang lain (seperti primer, enzim polimerase, dan dNTP) dapat bekerja optimal.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian deteksi molekuler cemaran daging babi pada produk sosis sapi di Kota Yogyakarta dengan metode PCR, diperoleh kesimpulan bahwa

1. Terdapat cemaran daging babi pada sosis sapi bermerk yang dijual di Pasar Kranggan, Pasar Bringharjo, Pasar Pathuk, pedagang asongan, dan sosis tidak bermerk dari supermarket.
2. Sampel terdeteksi positif tercemar DNA babi dengan primer spesifik babi P14, PPA6, PPA8 dan *pork* masing-masing sebesar 88,89%, 22,22%, 22,22%, dan 22,22%. Primer PPA6, PPA8, dan *pork* mengamplifikasi DNA tidak spesifik.
3. Primer yang paling baik untuk mendeteksi adanya cemaran babi pada sosis sapi adalah primer P14 yang dapat mendeteksi DNA babi hingga kontaminasi 1%.

Berdasarkan penelitian ini sebaiknya ada hal yang harus diperbaiki untuk penelitian berikutnya, yaitu

1. Jumlah sosis yang digunakan dan pengulangan percobaan diperbanyak. Jumlah sosis yang digunakan minimal 15 sampel dan pengulangan dilakukan minimal 2 kali, agar mendapat hasil yang presisi dan akurat.
2. Uji sensitifitas pada primer tertentu dapat dilakukan lebih bervariasi, variasi konsentrasi sampel dapat diperbanyak atau lebih baik dibuat konsentrasi lebih kecil dari 1%.
3. Optimasi komposisi master mix dan siklus PCR (khususnya suhu *annealing*) yang digunakan pada primer PPA6, PPA8, dan *pork*, untuk mengetahui tingkat sensitifitas primer tersebut dalam mendeteksi DNA babi pada sampel pangan

DAFTAR PUSTAKA

- Fibriana, F., Widiyanti, T., Retnoningsih, A., dan Susanti. 2012. Deteksi Daging Babi pada Produk Bakso di Pusat Kota Salatiga Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Biosantifika* 4(2): 106-112.
- Innis, M. A., dan Gelfand, D. H. 1990. *PCR Protocol : A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc, New York.
- Margawati, E. T., dan Ridwan, M. 2010. *Pengujian Penemuan Daging Babi pada Beberapa Produk Bakso dengan teknologi PCR: Pencarian Sistem Pengujian Efektif*. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Bogor.
- Muangkram, Y., Wajjwalku, W., Amano, A., dan Sukmak, M. 2016. *The Novel Primers For Mammal Species Identification-based Mitochondrial Cytochrome b Sequence : Implication for Reserved Wild Animals in Thailand and Endangered Mammal Species in Southeast Asia*. Research Article of Mitochondrial DNA Part A, United Kingdom.
- Safitri K. N., dan Wardani, A. K. 2015. Deteksi Cemarkan Babi pada Produk Sosis Sapi di Kota Malang dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3(3): 1006-1014.
- Soedjono, R.D. 2004. Detection of Porcine Meat in Meat Products by using Polymerase Chain Reaction Technique. *Jurnal Veteriner* 5 (3): 116-126.
- Sulandari, S., Muladno, T. Harumi, S. Yanai, Y. Wada, and H. Yasue, 1997. Localization of Swine Pre-1 Homologues in 13 Loci of *Phacochoerus Aethiopicus* and *Tayasu Tajacu* Genomes and Their Sequence Divergence. *Anim. Genetics* 28:210-215.
- Tanabe, S., Miyauchi, E., Muneshige, A., Mio K., Sato, C., dan Sato, M. 2007. PCR Method of Detecting Pork in Foods for Verifying Allergen Labeling and for Identifying Hidden Pork Ingredients in Processed Foods. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 71(7): 1663-1667.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., dan Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assesment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques* 22: 474-481.
- Yoshida T., Nomura, T., Shinoda, N., Kusama, T., Kadowaki, K. Dan Sugiura, K. 2009. Development of PCR Primers for the Detection of Porcine DNA in Feed Using mtATP6 as the Target Sequence. *Journal Food Hyg. Soc. Japan* 50(2): 89-92.