

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Bakso Sapi

Definisi dari Standar Nasional Indonesia menyebutkan bahwa bakso daging merupakan makanan berbentuk bulatan atau lain yang diperoleh dari campuran daging ternak (kadar daging tidak kurang dari 50%) dan pati atau serelia dengan atau tanpa penambahan makanan yang diizinkan (BSN, 1995). Adonan bakso dibuat dengan cara: daging dipotong kecil – kecil, kemudian dicincang halus dengan menggunakan blender. Daging tersebut kemudian dicampur dengan es batu atau air es (10-15% berat daging) dan garam serta bumbu lainnya sampai menjadi adonan yang kalis dan plastis sehingga mudah dibentuk sambil ditambahkan tepung kanji sedikit demi sedikit agar adonan lebih mengikat. Penambahan tepung kanji cukup 15-20% berat daging (Sunarlim, 1992).

Pada umumnya bahan baku utama bakso biasanya terbuat dari daging segar yang belum mengalami *rigormortis*. Daging sapi fase *pre-rigormortis* memiliki daya ikat air yang tinggi, dalam arti kemampuan protein daging mengikat dan mempertahankan air tinggi sehingga menghasilkan bakso dengan kekenyalan tinggi. Hal ini didukung oleh perubahan daging sapi fase *pre-rigormortis* ke *rigormortis* selama penggilingan, pencampuran, penghalusan, pencetakan dan perebusan sangat memacu kekenyalan bakso. Pada kondisi perubahan fase ini, disamping daya ikat air-protein tinggi, protein aktin dan miosin belum saling berinteraksi menjadi aktomiosin, pH

cukup tinggi, akumulasi asam laktat cukup rendah dan tekstur tidak lunak (Prastuti, 2010).

Daging merupakan komponen utama karkas yang tersusun dari lemak, jaringan adipose tulang, tulang rawan, jaringan ikat dan tendon. Daging sapi berwarna merah terang atau cerah, mengkilap, dan tidak pucat. Secara fisik daging elastis, sedikit kaku dan tidak lembek. Jika dipegang masih terasa basah dan tidak lengket di tangan dan memiliki aroma daging sapi yang sangat khas (gurih). Kandungan protein daging sapi sebesar 18,8% dengan lemak total 14% (Soeparno, 1998).

Bakso sebagai salah satu produk industri pangan, memiliki standar mutu yang telah ditetapkan. Adapun standar mutu bakso menurut Standar Nasional Indonesia, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Syarat Mutu Bakso

No.	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1.	Keadaan		
1.1	Bentuk,	-	Normal, khas daging
1.2	Bau	-	Gurih
1.3	Rasa	-	Normal
1.4	Warna	-	Kenyal
2.	Air	% b/b	Maks 70,0
3.	Abu	% b/b	Maks 3,0
4.	Protein	% b/b	Min 9,0
5.	Lemak	% b/b	Maks 2,0
6.	Boraks	-	Tidak boleh ada
7.	Bahan Tambahan Makanan		Sesuai dengan SNI
8.	Cemaran logam		
8.1	Timbal	mg/kg	Maks 2,0
8.2	Tembaga	mg/kg	Maks 20,0
8.3	Seng	mg/kg	Maks 40,0
8.4	Timah	mg/kg	Maks 40,0
8.5	Raksa	mg/kg	Maks 0,03
9.	Cemaran Arsen	mg/kg	Maks 1,0
10.	Cemaran Mikroba		
10.1.	Angka Lempeng Total	koloni/g	Maks 1×10^5
10.2.	Bakteri bentuk koli	APM/g	Maks 10
10.3.	<i>E. Coli</i>	APM/g	< 3
10.4.	<i>Enterococci</i>	koloni/g	Maks 1×10^3
10.5.	<i>Clostridium perfringens</i>	koloni/g	Maks 1×10^2
10.6.	<i>Salmonella</i>	-	Negatif
10.7.	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	Maks 1×10^2

Sumber: BSN, 1995

B. Kasus Produk Pangan yang Terkontaminasi Daging Lain di Indonesia

Kasus-kasus pencampuran daging yang tidak seharusnya pada produk pangan mulai dikhawatirkan sejak tahun 1988. Pakar pangan Universitas Brawijaya, Tri Susanto menduga terdapat bahan-bahan (lemak) babi di beberapa produk pangan tertentu. Isu tersebut memanans dengan beredarnya selebaran yang memuat daftar beberapa nama produk yang mengandung bahan babi (Girindra, 2006). Survei yang dilakukan oleh Nurbowo (1995) mengungkapkan bahwa banyak pedagang bakso keliling yang menggunakan daging babi sebagai bahan baku atau campuran dalam pembuatannya.

Isu mengenai pangan yang mengandung daging babi kembali muncul pada pertengahan tahun 2009. Hal ini dimulai sejak BPOM mempublikasikan hasil penelitian dengan metode PCR bahwa pada produk abon dan dendeng berlabel sapi terdapat DNA babi di dalamnya. Pada tanggal 16 April dan 1 Juni 2009 di Bandung dan Malang, BPOM menemukan sembilan dendeng dan abon sapi yang positif mengandung daging babi. (Anonim, 2009).

C. Metode Analisis Kandungan Bahan Pangan

Identifikasi jenis perlu dilakukan terkait kepentingan ekonomi, keagamaan, kesehatan serta manajemen hewan liar (Dove, 1999). Selama ini identifikasi jenis dapat dilakukan dengan menggunakan protein dan metode berbasis DNA. Metode dengan menggunakan protein diantaranya adalah *lauryl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), ELISA dan HPLC (Ghovvati dkk., 2009). ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

merupakan teknik imunologi yang menggunakan enzim untuk mendeteksi adanya antibodi atau antigen dalam sebuah sampel (Asensio dkk., 2007). HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) adalah teknik yang mampu memisahkan makro dan mikro komponen dengan struktur kimia yang sama dalam matriks sehingga sering digunakan untuk berbagai analisis produk makanan (Cserhati dkk., 2005). Kelemahan metode analisis protein adalah protein yang terdenaturasi setelah dimasak, tergantung pada pola ekspresi protein (Rastogi dkk., 2004) serta reaksi silang antara hewan yang berkerabat dekat (Soedjono, 2004).

Kelemahan-kelemahan tersebut menyebabkan perlunya metode yang dapat menghasilkan kesimpulan yang pasti dan dapat digunakan pada sampel yang telah dimasak. Metode dengan menggunakan amplifikasi PCR dari gen spesifik digunakan untuk tujuan ini, karena DNA masih dapat diamplifikasi setelah sampel dimasak (Rastogi dkk., 2004).

Menurut Ghovvati dkk. (2009), beberapa teknik molekuler digunakan dalam identifikasi jenis daging, yaitu hibridisasi DNA, dan metode berbasis PCR seperti analisis SSCP, RAPD-PCR, RFLP dan *species-specific PCR*. Hibridisasi DNA dapat digunakan untuk melihat beragam sampel yang telah dicampur dengan menggunakan berbagai *probe*. Seperti halnya metode lainnya, hibridisasi DNA memiliki kelemahan yaitu sangat tergantung pada kondisi eksperimen dan dibutuhkan *probe* yang spesifik untuk masing – masing spesies (Lenstra dkk., 2001). Penelitian dengan metode hibridisasi

DNA juga relatif tidak praktis, sehingga identifikasi jenis berbasis DNA lebih sering menggunakan metode PCR (Saiki dkk., 1988).

C.1. *Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*

PCR digunakan untuk mengamplifikasi daerah yang sama dari berbagai jenis, seperti bagian dari gen *cyt b*. Produk untai ganda yang dihasilkan kemudian didenaturasi dan DNA untai tunggal mengambil struktur sekunder yang tergantung pada masing – masing sekuens. Elektroforesis gel poliakrilamid, dalam kondisi tertentu, akan menghasilkan pola yang berbeda sesuai pola struktur sekunder masing – masing (Lockley dan Bardsley, 2000).

Metode SSCP telah digunakan untuk mengidentifikasi beragam jenis ikan (Rehbein dkk., 1995; Rehbein dkk., 1997; Rehbein dkk., 1998; Rehbein dkk., 1999 dan Spedes dkk, 1999). Metode ini juga dapat digunakan untuk membedakan daging babi Eropa dengan babi hutan (Rea dkk., 1996).

C.2. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)*

Metode ini memerlukan primer-primer pendek sekitar 10 basa. Primer-primer ini akan mengamplifikasi serangkaian lokus, menghasilkan pola elektroforesis berupa pita yang berbeda ukuran pada tiap jenis. Pola tertentu telah diketahui hanya terdapat pada jenis tertentu pula (Lockley dan Bardsley, 2000).

Metode RAPD telah digunakan dalam beberapa penelitian. Koh dkk. (1998) menggunakan metode ini untuk menciptakan pola sidik jari

sepuluh jenis hewan (babi hutan, babi, kuda, kerbau, sapi, rusa, anjing, kucing, kelinci dan kangguru). RAPD yang digunakan untuk mengetahui jenis daging pada proses pembuatan produk makanan juga membentuk pola sidik jari. Jenis dan produk yang digunakan berasal dari daging sapi, kuda, keledai, rusa, babi, domba, kangguru dan burung unta (Martinez dan Man, 1998)

C.3. Species-specific PCR primers

Informasi detail mengenai sekuens berbagai jenis telah tersedia sehingga memungkinkan primer khusus tiap jenis didesign. Primer tersebut akan memperbanyak produk DNA yang hanya dimiliki jenis tertentu. Informasi lengkap dari sekuens memungkinkan perkiraan ukuran dari produk PCR, sehingga identifikasi dilakukan dengan membandingkan ukuran produk hasil amplifikasi dalam gel agarose (Lockley dan Bardsley, 2000).

Calvo dkk. (2001) mengembangkan dan mengevaluasi prosedur PCR untuk mendeteksi daging babi dalam sosis dan makanan kaleng menggunakan DNA spesifik babi. Kemampuan species spesifik PCR mengidentifikasi kontaminan mencapai 0,005% babi dalam daging sapi. Metode ini juga dapat menentukan kuantitas cemaran daging pada produk makanan mentah maupun yang telah dimasak dengan memperkirakan densitas bagian DNA tertentu dan sensitif yang berulang.

C.4. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Pascoal dkk. (2004) membuktikan bahwa PCR-RFLP merupakan metode yang cepat, murah dan mudah dilakukan untuk mengidentifikasi satu atau lebih jenis pada produk makanan mentah maupun yang telah dimasak. PCR-RFLP dari mitokondria DNA juga dapat digunakan untuk mendeteksi sampel yang telah dicampur dengan bahan lain. Kelemahan metode ini adalah pada sampel yang telah banyak terfragmentasi, primer universal tidak dapat digunakan karena ukuran DNA amplifikasi memiliki ukuran yang kecil.

Lenstra dkk. (2001) melakukan RFLP menggunakan enam enzim restriksi (*AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MboI*, *RsaI*, *TaqI*) pada sembilan jenis (ayam, kalkun, babi, sapi, kerbau, domba, kambing, kuda dan manusia). Ong dkk. (2007) dan Soedjono (2004) mendeteksi kandungan bahan makanan menggunakan *AluI*, *BsaI* dan *RsaI* dan berhasil membedakan antara DNA babi, sapi dan ayam dari sampel yang mengandung sedikitnya 0,25 mg daging atau hingga konsentrasi 0,01%.

D. Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi analisis DNA. Untuk mengekstrak DNA diperlukan langkah-langkah laboratorium untuk memecahkan dinding sel dan membran inti, dan dilanjutkan dengan pemisahan DNA dari berbagai komponen sel yang lain. Pada saat melakukannya harus dijaga agar DNA tidak rusak dan didapatkan DNA dalam bentuk rantai yang panjang (Fatchiyah, 2006).

Ekstraksi dengan menggunakan *phenol* adalah teknik yang umum digunakan untuk purifikasi sampel DNA. Biasanya, volume yang sama dari *phenol*-TE pekat ditambahkan dalam sampel DNA pada tube mikrosentrifus. Campuran ini divortex, dan disentrifus untuk menciptakan fase pemisahan. Bagian atas secara hati-hati dipisahkan ke dalam tabung yang baru, tanpa mengenai permukaan *phenol* kemudian dilakukan dua kali ekstraksi menggunakan eter untuk menghilangkan sisa *phenol*. Eter pekat dengan konsentrasi yang sama ditambahkan ke dalam tube, kemudian campuran divortex, dan disentrifus untuk menciptakan fase pemisahan. Bagian atas yang mengandung eter dan *phenol* dibuang. Setelah itu, ekstraksi DNA diulang dan DNA dipekatkan dengan presipitasi etanol (Anonim, 2003)

E. Visualisasi DNA

Menurut Sudjadi (2008) elektroforesis merupakan teknik pemisahan suatu molekul dalam campuran di bawah pengaruh medan listrik. Molekul terlarut dalam medan listrik bergerak atau migrasi dengan kecepatan yang ditentukan oleh rasio muatan dan massa. Sebagai contoh, jika dua molekul mempunyai massa dan bentuk yang sama, molekul dengan muatan lebih besar akan bergerak lebih cepat ke elektrode.

Elektroforesis melalui gel agarosa atau poliakrilamid merupakan metode standar untuk pemisahan, identifikasi, dan pemurnian fragmen DNA. Selain itu elektroforesis gel poliakrilamid dapat juga digunakan untuk pemisahan, identifikasi, dan pemurnian protein. Teknik ini merupakan teknik sederhana, cepat dan dapat memisahkan molekul yang diinginkan dari

matriksnya yang tidak dapat dilakukan oleh prosedur yang lainnya seperti centrifugasi gradien (Sudjadi, 2008).

Agarosa yang disari dari ganggang laut, merupakan polimer dengan dasar struktur D-galaktosa dan 3,6 anhidro L-galaktosa. Gel agarosa mempunyai daya pemisahan lebih rendah dibandingkan dengan gel poliakrilamid, tetapi mempunyai rentan pemisahan lebih besar. DNA dari 200 basa-50 k basa dapat dipisahkan dengan gel agarosa dengan berbagai konsentrasi agarosa. Gel agarosa biasanya dilakukan dalam konfigurasi horizontal dalam kekuatan medan listrik dan arah tetap (Sudjadi, 2008).

Gel agarosa dibuat dengan melelehkan agarosa dalam buffer dan kemudian dituangkan pada cetakan dan didiamkan sampai dingin. Setelah mengeras, agarosa membentuk matriks dengan kerapatan yang ditentukan oleh konsentrasi agarosa (Sudjadi, 2008).

F. *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)*

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Metode PCR sangat sensitif. Sensitivitas tersebut membuatnya dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA (Yuwono, 2006).

Kelebihan lain metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, misalnya DNA cetakan yang diperlukan hanya sekitar 5 µg, oligonukleotida yang diperlukan

hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini biasanya dilakukan dalam volume 50 – 100 µl. Empat komponen utama pada proses PCR adalah (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15 – 25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4) enzim DNA polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi rantai DNA. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa buffer (Yuwono, 2006).

Akhir-akhir ini metode PCR menjadi penting dan sering digunakan. Dalam prinsipnya, dua metode dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis: penggunaan *species-specific* primer atau penggunaan primer yang mengikat daerah konservatif suatu gen tertentu yang dimiliki semua jenis yang akan diidentifikasi dan identifikasi dilakukan dengan menggunakan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) (Greiner dan Konietzny, 2007).

RFLP adalah sebuah sisi dalam suatu genome dimana jarak antara dua sisi pemotongan bervariasi pada tiap individu yang berbeda. Sisi ini dikenali dan dipotong oleh enzim restriksi; misalnya enzim restriksi yang sering digunakan, *EcoRI*, mengenali 5'-GAATTC-3' (Brooker, 2009).

Saat membandingkan dua individu berbeda, pemotongan kromosom DNA oleh enzim restriksi akan menghasilkan beberapa fragmen berdasarkan panjangnya, walaupun beberapa fragmen ditemukan pada lokasi kromosomal yang sama pada dua individu. Para ahli genetika akan mengatakan bahwa terdapat keanekaragaman di dalam populasi yang dibedakan berdasarkan

panjang dari sebuah fragment DNA. Variasi ini dapat disebabkan oleh genetik dapat berubah dikarenakan adanya delesi dan duplikasi menyebabkan pengurangan atau penambahan bagi sebagian kromosom (Brooker, 2009).

G. Gen *cytochrome b*

DNA mitokondria (mtDNA) pada hewan adalah molekul sirkuler kecil (15-20kb), mengandung kurang lebih 37 *coding gene* untuk 22 tRNA dan 13 mRNA, yang mengkode protein untuk transport elektron dan fosforilasi oksidasi pada mitokondria (Teletchea dkk., 2005).

Sebagai penanda molekul, mtDNA memiliki beberapa keuntungan daripada DNA nukleus untuk digunakan dalam penelitian mengenai produk makanan (Lockley dkk., 2000). mtDNA memiliki 1.000 kopi lebih banyak daripada DNA nukleus pada tiap sel. Selain itu, genome sirkuler ini menunjukkan pewarisan gen haploid pada tiap jenis dan tidak mengalami rekombinasi. mtDNA juga berevolusi lebih cepat dibandingkan DNA nukleus sehingga memungkinkan jenis yang hubungan kekerabatannya dekat dapat dibedakan dan diidentifikasi (Teletchea dkk., 2005).

Salah satu gen pada mtDNA adalah gen *cyt b* yang merupakan komponen penyusun reaksi pernafasan kompleks III. Gen ini adalah gen yang paling banyak digunakan dalam penelitian filogenetik (Meyer, 1994) dan gen mitokondria yang produk proteinnya paling diketahui struktur dan fungsinya (Meyer, 2001).

Lokus *cyt b* telah digunakan untuk mengkarakterisasi berbagai vertebrata (Ong dkk., 2007). Menurut Minarovic dkk. (2010) dan Teletchea

dkk. (2005) panjang gen *cyt b* adalah 1.140bp dan memiliki bagian dengan variasi antar jenis yang tinggi sehingga studi evolusi antar jenis mudah dilakukan, serta bagian konservasi yang memungkinkan adanya primer universal yang dipublikasikan oleh Kocher dkk. (1989).

Primer universal *cyt b1* dan *cyt b2* secara terus menerus dapat mengamplifikasi fragmen yang terdiri dari 359 bp dari gen *cyt b*. Keuntungan dari menggunakan primer universal adalah sebagai kontrol yang digunakan untuk melihat keberhasilan amplifikasi DNA. Selain itu, karena setiap sel mengandung hingga 1.000 kopi dari lokus *cyt b* sehingga berguna untuk analisis PCR yang harus meningkatkan sensitifitas untuk membandingkan satu atau kopi DNA target yang rendah (Ong dkk., 2007).

H. Enzim Restriksi

Menurut Brooker (2009), enzim restriksi dibuat secara alami dari alam oleh berbagai jenis bakteri untuk melindungi sel bakteri dari invasi DNA asing. Peneliti kemudian melakukan isolasi dan pemurnian enzim-enzim restriksi dari berbagai jenis untuk tujuan kloning dan molekuler.

AluI merupakan enzim restriksi yang memotong substratnya menjadi produk dengan ujung tumpul. Enzim ini mengkatalisis pemotongan ikatan phosphodiester pada sekuens pengenalan AG/CT (Li dkk., 2008).

BamHI adalah enzim restriksi yang diperoleh dari *Bacillus amyloliquefaciens*. Sisi pengenalan yang dimiliki yaitu G'GATCC (Gambar 1.) dan hasil pemotongannya adalah *sticky end* (Lourenço dkk., 2003).

Gambar 1. Sisi pengenalan *Bam*HI (Brown, 2002)

Endonuklease restriksi *Rsa*I diperoleh dari *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Rsa*I mengenali sekuens GT/AC dan menghasilkan potongan dengan ujung tumpul (Bodnar dkk., 1983). Beberapa potongan gen *cyt b* dengan menggunakan enzim-enzim restriksi pada beberapa jenis tercantum dalam Tabel 2.

Tabel 2. Prediksi ukuran fragment *cyt b* pada beberapa jenis hewan setelah analisis PCR-RFLP

Jenis	Ukuran fragmen DNA setelah dipotong dengan enzim restriksi (bp)				
	<i>Hae</i> III	<i>Hin</i> fI	<i>Rsa</i> I	<i>A</i> luI	<i>Taq</i> I
Sapi	74	44	359	19	
	285	198		160	
		117		180	
Burung unta	227	233	205		
	132	126	149		
Ayam	159	188	210	359	359
	126	161	149		
	74	10			
Kalkun	126	196	149	359	359
	103	161	109		
	74		101		
	55				
Babi	153	359	359	244	218
	132			115	141
	74				
Domba	159	198	359	359	359
	126	181			
	74				
Kambing	230	198	359	359	218
	74	161			141
	55				
Banteng	285	359		190	191
	74			169	

Sumber: Maede, 2006

I. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah bakso sapi yang dijual di pasar Yogyakarta ada yang terkontaminasi oleh jenis daging lain.

