

IDENTIFIKASI GEN SITOKROM B BABI PADA OLAHAN DAGING
NUGGET DI DESA SUKABUMI KECAMATAN BUAY BAHUGA
DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)
Identification Of Pork's Cytochrome B Gen In Processed Meat Nuggets
In Sukabumi Village, Buay Bahuga Sub-District Using The Polymerase
Chain Reaction (Pcr) Method

DAH AYU SETIYAWATI¹, MAURITZ PANDAPOTAN MARPAUNG²,
ARIF SETIAWANSYAH³

^{1,2,3}FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS KADER BANGSA
JL. MAYJEN H.M. RYACUDU NO. 88, 7 ULU, PALEMBANG
e-mail: mauritzchem@gmail.com

ABSTRAK

Nugget adalah jenis olahan daging restrukturisasi yang sangat rentan terhadap cemaran daging lainnya sehingga mempengaruhi kehalalan suatu produk makanan. Daging babi merupakan sumber protein hewani yang mudah diperoleh di pasaran yang sering dicampurkan dalam nugget yang dapat mempengaruhi kehalalan produk tersebut. Salah satu parameter status halal suatu produk makanan adalah harus bebas dari kandungan babi pada bahan dasar, tambahan maupun proses pembuatannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi cemaran sitokrom b pada nugget yang beredar di Desa Sukabumi dengan menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Bahan-bahan yang digunakan berupa tiga buah sampel nugget yang diperoleh dari desa Sukabumi pada produsen yang berbeda, kontrol positif berupa daging babi, dan kontrol negatif berupa daging sapi. Tahapan identifikasi gen sitokrom b dimulai dengan tahapan isolasi DNA pada sampel, amplifikasi, dan elektroforesis menggunakan gel agarose 0,75%. Hasil yang diperoleh, divisualisasikan dengan alat documentation system. Hasil penelitian memperlihatkan berupa pita-pita marker (penciri) DNA ladder yang masing-masing berjarak 100 bp. Untuk kontrol positif yang digunakan daging babi dengan marker 130 bp. Hasil penampakan pita DNA seluruh sampel nugget yang muncul tidak sejajar dengan pita DNA kontrol positif (daging babi). Hal ini menunjukkan produk olahan nugget yang beredar di desa Sukabumi masih aman untuk dikonsumsi. Kesimpulan dari penelitian ini adalah seluruh sampel tidak teridentifikasi adanya gen sitokrom b.

Kata kunci: Nugget, sitokrom b, polymerase chain reaction (PCR)

ABSTRACT

Nuggets are a type of restructured processed meat which is susceptible to contamination by other meats that affect the halalness of a food product. Pork is a source of animal protein that is easy to obtain in the market which is often

mixed in nuggets which can affect the halalness of the product. One of the parameter of the halal status of a food product is that if it must be free from pork content in the basic ingredients, additives and the manufacturing process. This study aimed to identify cytochrome b contamination in nuggets circulating in Suakbumi Village using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The materials used were three samples of nuggets obtained from Sukabumi at different producers, a positive control in the form of pork, and a negative control in the form of beef. The identification of cytochrome b gene begins with the isolation of DNA from the samples, amplification, and electrophoresis using 0.75% agarose gel. The results obtained that the ladder DNA marker bands were each 100 bp apart. For the positive control, pork with a marker of 130 bp was used. The results of the appearance of the DNA bands of all nugget samples that appeared were not parallel to the positive control DNA bands (pork). This showed that processed nugget products circulating in Sukabumi village are still safe for consumption. The conclusion of this study is that all samples did not identify the presence of the cytochrome b gene.

Keywords: Nugget, cytochrome b, polymerase chain reaction (PCR)

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara terbesar dengan penduduk mayoritas muslim dengan jumlah penduduk sekitar 273 juta jiwa dan 87% muslim (Badan Pusat Statistik, 2020). Dalam hal ini menjadikan Indonesia menjadi salah satu pasar produk halal terbesar di dunia.

Meningkat pesatnya pasar pangan yang semakin luas bisa membawa pengaruh baik, tetapi masyarakat perlu hati-hati karena Produk pangan dalam kehidupan manusia merupakan hal penting dalam memenuhi kebutuhan nutrisi dan gizi yang diperlukan oleh tubuh. Sebagian besar produk makanan yang diperjual belikan telah diolah dan diawetkan untuk memperpanjang masa simpan. Produk olahan yang dikonsumsi dan dipasarkan secara luas memiliki syarat tidak menyebabkan gangguan kesehatan (Wijaya et al., 2018). Salah satu contoh produk olahan pangan yang sering dikonsumsi oleh masyarakat adalah nugget.

Nugget merupakan produk makanan yang diperoleh dari campuran daging halus, tepung dengan penambahan bumbu. Olahan tersebut menggunakan daging sapi karena memiliki nilai gizi yang tinggi baik dikonsumsi oleh berbagai kalangan. Namun dikarenakan daging sapi memiliki harga yang mahal, olahan tersebut diganti dengan daging lama yang seperti daging babi sehingga mengakibatkan produk tersebut tercemar dari aspek kehalalan. Kasus nugget yang dijual dipasaran tradisional dan modern di Yogyakarta ada yang terbuat dari pencampuran daging sapi dan daging babi, maka perlu dilakukan identifikasi dan analisis sitokrom b, kasus tersebut merupakan Isu dari hasil keresahan warga (khusus umat islam) berkaitan dengan keamanan serta kehalalan suatu pangan (Mustaqimah et al., 2020).

Sitokrom B merupakan Gen yang digunakan selaku indikator jenis hewan dalam bentuk produk daging yaitu merupakan gen sitokrom b. Gen

sitokrom b mempunyai kekhasan tertentu, ialah ada wilayah dengan alterasi sekuen yang khusus pada setiap spesies hewan, tetapi ada pula wilayah yang nyaris sama untuk seluruh jenis hewan. Kedua wilayah tersebut terletak didalam gen tunggal. Kekhasan pada gen sitocrom b menimbulkan gen relatif menjadi akurat bila digunakan untuk membedakan sebagian jenis hewan dalam produk daging (Fitrilia et al., 2017b). Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini untuk menganalisis cemaran sitokrom b (babi) dalam daging olahan nugget sehingga diketahui kehalalan dari olahan daging tersebut.

2. METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, Real Time PCR (Bio-Rad), timbangan analitik (Bel), cawan porselen (krus), mikrotip (Bio-Rad), mikrotube (Bio-Rad), vortex, waterbath (memmert), kertas parafilm (whatman), elektroforesis (Bio-Rad), mikropipet (Bio-Rad), UV Transiluminator (Bio-Rad), centrifuge (Benchmark), sarung tangan (sensi), aluminium foil (lacy's).

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian yakni, 2x Taq Plus PCR Mix (With dye), TAE Buffer, DNA ladder, gel red, agarose 1,5%, daging babi (+), daging sapi (-), primer forward (5'-CTT GCA AAT CCT AAC AGG CCT-3'), primer reverse (5'-CGT TTG CAT GTA GAT AGC GAA TAA C-3'), satu set TIANamp Genomic Kit (Tiangen), ddH₂O, nucleas free water (NFW), dan etanol.

Isolasi DNA pada sampel

Pada proses isolasi DNA menerapkan protokol TIANamp Genomic DNA Kit. Dengan menggunakan tip, 25mg daging nugget

dihaluskan. Lalu ditambahkan 200µl Buffer GA dan dimasukkan ke dalam mikrotube dan ditambahkan 20µl proteinase K. Lalu divortex 10 detik. Setelah itu diinkubasi pada suhu 56°C selama 1 sampai 3 jam. Kemudian ditambahkan 200µl Buffer GB lalu divortex kembali maka hasilnya akan berbusa. Kemudian disentrifugasi selama empat detik. Kemudian air dipanaskan lalu diinkubasi selama 10 menit dengan suhu 70°C. Kemudian divortex 10 detik. Lalu ditambahkan 200µl etanol ke dalam sampel. Lalu di mix kembali selama 15 detik. Dan diambil campuran sampel ke dalam sprin column CB3 dan disentrifuge pada 12.000 rpm selama 30 detik. Lalu cairan supernatannya dibuang. Kemudian ditambahkan 500µl Buffer GD ke spin column CB3 dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik dan dibuang cairan supernatan. Kemudian ditambahkan 600µl Buffer PW ke spin column CB3 lalu disentrifugasi 12.000 rpm selama 30 detik dan dibuang kembali cairan supernatannya. Setelah itu diulangi kembali pada tahap buffer PW dan supernatan dibuang kembali. Kemudian ditempatkan spin column CB3 ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml yang baru dan bersih. Lalu dipipet 55µl Buffer TE dan dimasukkan langsung ke tengah membran kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 2 menit. Lalu disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 2 menit (Tiangen, 2022).

Amplifikasi

Setelah melakukan isolasi DNA pada sampel, kemudian dilakukan amplifikasi DNA. Amplifikasi merupakan suatu tahapan yang dapat menggandakan (replikasi) suatu DNA dengan menggunakan PCR. Tabel 1 menunjukkan komposisi-komposisi dalam proses amplifikasi dengan menggunakan PCR.

Tabel 1. PCR Mix

Komposisi	Volume 1 reaksi	Volume 6 reaksi
2x taq plus master mix	10 µl	60 µl
Primer forward	0,8 µl	4,8 µl
Primer reverse	0,8 µl	4,8 µl
Nuclease free water (NFW)	7,4 µl	44,4 µl
Sampel	1 µl	6 µl
Total	20 µl	120 µl

Proses amplifikasi DNA terdapat beberapa tahap yaitu denaturasi (pemisahan), annealing (penempelan), dan ekstensi (elongasi). Proses ini dikerjakan pada DNA yang sudah diisolasi. Untuk Primer yang akan digunakan dalam proses PCR yakni menggunakan primer forward dan primer reverse. Proses amplifikasi dengan teknik Polymerase Chain Reaction dilakukan variasi komposisi reagen dan kondisi reaksi PCR yang telah dimodifikasi oleh masing-masing kelompok memiliki 5 sampel DNA dan 1 nucleus free water. Selanjutnya dibuat kumpulan reagen master mix untuk 5 kali reaksi dan 1 kali reaksi kesalahan pipetasi jadi total semua 6 reaksi. Kemudian keluarkan enzim 2x Taq Plus Master Mix, primer, air (NFW), dan sampel dari freezer dan dicairkan. Setelah mencair kemudian seluruh reagen divortexing beberapa detik kemudian dispin down selama 5 detik. Pembuatan kumpulan reagen (Master Mix) mengikuti pada aturan Tabel 1 (Tiangen, 2022).

Elektroforesis

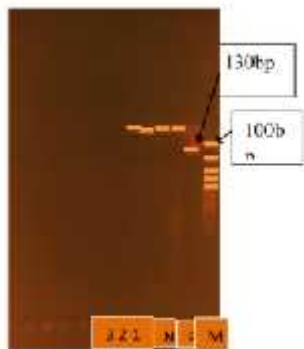
Gel agarose 1,5% dibuat dengan melarutkan 0,75g dalam 50 ml akuades dan 1 ml TAE Buffer dalam erlenmeyer dan dirotasi. Kemudian dipanaskan dipanaskan sampai mendidih dan larut. Setelah agarose larut. Lalu diinkubasi

selama 5 menit yang telah ditutup dengan aluminium foil. Lalu aluminium foil dibuka dan masukkan 5µl gel red sambil digojok dengan perlahan-lahan. Kemudian gel dituangkan ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir pembentukan sumur. Lalu diinkubasi selama 20-30 menit hingga gel mengeras. Selanjutnya gel agarose dipindahkan ke tangki elektroforesis. Setelah itu 1x TAE dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis hingga merendam gel agarose. Kemudian sisir bisa dibuka secara perlahan-lahan.

Selanjutnya tray diletakkan pada tanki elektroforesis dan dimasukkan 100 bp DNA ladder sebanyak 3µl. Kemudian kontrol positif DNA berupa daging babi yang telah tercampur loading dye dimasukkan sebanyak 5µl pada sumuran berikutnya. Untuk sampel PCR yang juga telah tercampur loading dye dimasukkan sebanyak 5µl pada sumuran berikutnya dan NCT yang sudah tercampur loading dye juga dimasukkan sebanyak 5µl pada sumuran berikutnya. Kemudian tangki elektroforesis ditutup lalu dipasangkan dengan elektroda sesuai dengan warnanya hitam untuk negatif dan merah untuk positif. Selanjutnya kabel tangki ditancapkan pada power supply dengan warna yang sesuai. Kemudian elektroforesis dilakukan dengan voltase 110 volt dengan waktu 40 menit. Jika telah selesai gel agarose dibawa ke atas LED Transilluminator. Kemudian gambar gel didokumentasikan (Fibriana et al., 2012).

3. HASIL

Pada Gambar 1 memperlihatkan hasil dari proses elektroforesis isolasi DNA tiga sampel nugget melalui PCR.



Gambar 1. Hasil Gel Agarose Elektroforesis DNA (M: DNA Ladder, P: Produk PCR kontrol positif daging babi, N: Produk PCR kontrol Negatif Daging sapi, 1-3: Produk PCR sampel Nugget)

Hasil dari penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil yaitu isolasi DNA menunjukkan bahwa semua DNA sampel nugget di Desa Sukabumi Kecamatan Buay Bahuga berhasil terisolasi. Kemudian hasil dari amplifikasi DNA, dan elektroforesis diidentifikasi keseluruhan sampel nugget sebanyak 3 sampel tidak mengandung sitokrom b dari daging babi. Hal tersebut tidak terlihat adanya pita pada DNA sampel nugget sedangkan pada isolat DNA daging babi terdapat pita DNA pada 130 bp (Gambar 1).

4. PEMBAHASAN

Isolasi DNA menggunakan protocol TIANamp Genomic DNA Kit, karena dapat memberikan tingkat kemurnian dengan hasil yang lebih baik dari pada menggunakan metode yang

lain (Anang et al., 2019). Tujuan isolasi DNA yaitu untuk mendapatkan hasil DNA yang murni dengan cara memisahkan DNA dari komponen lain seperti lemak, karbohidrat, dan protein. Hasil isolasi DNA dapat dilihat melalui Template DNA (Gambar 1).

Pada proses isolasi DNA digunakan larutan buffer yang berfungsi sebagai penyangga pH. Selain itu, buffer tersebut memiliki fungsi lain seperti buffer GA dan Proteinase K berfungsi sebagai memisahkan protein-protein yang mengikat pada benang-benang DNA dan mengaktifasi enzim DNase. Buffer GB sebagai deterjen yang bertujuan merusak membran sel dan pecahnya kromosom. Adapun bahan lain yang digunakan yaitu Etanol absolut untuk mencuci endapan DNA pada bagian bawah tabung, buffer GD dan buffer PW berfungsi untuk membersihkan dari sisa etanol (Anang et al., 2019) dan senyawa lainnya. Larutan tersebut divortex dan disentrifugasi. Prinsip utama sentrifugasi yaitu sebagai pemisahan antara substansi berdasarkan berat jernih suatu molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang berat akan berada di dasar sedangkan substansi yang ringan terletak di atas. Pemberian Buffer TE bertujuan untuk melarutkan kembali DNA untuk dipreserpasi (Faati, 2009).

Pada Proses amplifikasi DNA terdiri dari tiga tahap yang selalu berulang dalam 30-50 siklus. Tahap Pertama yaitu denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik untuk memutus ikatan hidrogen DNA dari ganda menjadi tunggal. Selanjutnya proses annealing dengan sistem gradien suhu 55°C selama 30 detik. Ini merupakan proses penempelan primer pada DNA template. Proses extension dengan suhu 72°C selama selama 1 menit. Dimana pada proses ini terjadi pemanjangan atau penambahan basa nukleotida, pada proses ini suhu tergantung dengan jenis

DNA polymerase yang digunakan. Apabila suhu tersebut tidak sesuai maka akan menyebabkan terjadinya kegagalan, atau primer akan menempel ke sembarangan tempat. Siklus pengulangan sampai mendapatkan kopi DNA yang diinginkan yaitu kopi DNA yang sudah didapatkan sesuai PCR mix. Proses ini terjadi sebanyak 50 siklus pengulangan sesuai dengan protokol kit yang digunakan (Dorado et al., 2019). Pada proses amplifikasi menggunakan kontrol positif daging babi. Gen ini digunakan sebagai penanda adanya gen babi (Fitrilia et al., 2017a). Primer memiliki fungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang diamplifikasi. Setiap satu fragmen target memerlukan sepasang primer yang harus disesuaikan dengan DNA. Gen sitocrom b menghasilkan fragmen 130 bp (Gambar 1). Pada proses amplifikasi primer yang digunakan yaitu Pasangan primer yang untuk mendeteksi gen cytochrome b pada semua sampel adalah primer Forward (5'-CTT GCA AAT CCT AAC AGG CCT-3'), primer reverse (5'-CGT TTG CAT GTA GAT AGC GAA TAA C-3'), yang menghasilkan amplicon sebesar 130 bp (Tanabe et al., 2007).

Elektrogram produk PCR daging babi, daging sapi, dimana sampel nugget menggunakan primer spesifik fork (porcine DNA). Gambar 1 menunjukkan tidak adanya pita spesifik yang terbentuk pada sampel nugget 1, 2 dan 3 dan daging sapi. Prinsip kerja pada sinar UV yang dipancarkan akan memendarkan staining gel yang menempel di DNA. Sehingga visualisasi DNA bisa terlihat lewat pancaran yang berwarna jingga. Apabila proses pemisahan DNA berhasil maka akan ditandai dengan adanya pita yang akan berpendar pada masing-masing sumur. Jika sampel positif (+) mengandung daging babi, maka pita DNA template akan berjajar dengan pita kontrol positif. Apabila pita DNA tidak sejajar

maka produk olahan makanan ini masih aman dikonsumsi di Desa Sukabumi Kecamatan Buay Bahuga.

Akibat apabila ada produk makanan mengandung sitokrom b maka memiliki resiko terkontaminasi bakteri *Yersinia enterocolitica* yang berbahaya. Apabila bakteri masuk dalam tubuh manusia maka akan menyebabkan demam dan penyakit pada saluran pencernaan seperti diare, muntah dan kram pada perut (Syarfaini et al., 2020).

Karena jaminan pada produk halal dilakukan sesuai pada asas perlindungan, kepastian, keadilan, akuntabilitas dan transparansi, efektifitas dan efisiensi, serta profesionalitas. Jaminan tersebut bertujuan untuk memberikan kenyamanan, keamanan, keselamatan, dan kepastian ketersediaan produk halal bagi masyarakat dalam mengkonsumsi dan menggunakan produk halal (Syafrida, 2016).

5. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa tiga sampel berupa produk olahan daging nugget yang beredar di desa Sukabumi Kecamatan Buay Bahuga tidak teridentifikasi adanya gen sitokrom b berupa daging babi.

DAFTAR PUSTAKA

- Anang, R., Hanifah, R., & Diah, permanasari etin. (2019). validasi metode polymerase chain reaction (PCR) untuk analisis DNA cemaran babi dari produk sosis. 10.
- Badan Pusat Statistik. (2020). Catalog : 1101001. Statistik Indonesia 2020, 1101001, 790.
- Davis, L., M., Kuehl, & J. Battey. (n.d.). basic methods: molecular biology 2nd ed. Appleton &

- Lange, Norwola, 200–202.
- Dorado, G., Besnard, G., Unver, T., & Hernández, P. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 1–3 (6), 473–492.
- Faati, M. (2009). isolasi dan digesti DNA kromosom. *Penelitian sains & Teknologi*, 10(1), 61–67.
- Fibriana, F., Widiarti, T., Retnoningsih, A., & Susanti. (2012). Deteksi Daging Babi Pada Produk Bakso di Pusat Kota Salatiga Menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction. *Biosaintifika; Journal Of Biology & Biology Education*, 4(2), 106–112.
- Fitrilia, B., Deswinar, D., & Raihana, N. (2017a). Deteksi Kandungan Gen Sitokrom B (cyt b) Babi Pada Bakso Yang Beredar di Kota Jambi Menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction. *Scientia Jurnal*, 6(01), 21–25.
- Fitrilia, B., Deswinar, D., & Raihana, N. (2017b). Deteksi kandungan gen sitokrom B (Cyt b) babi pada bakso yang beredar di Kota Jambi menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction. *Scientia Jurnal*, 6(01), 21–25.
- Mustaqimah, Nurul, D., Septiani, Triayu, & Roswiem. (2020). Deteksi DNA Babi Pada Produk Sosis Menggunakan Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Indonesia Jurnal Of Halal*, 3(02), 106–111.
- syafriada. (2016). sertifikat halal pada produk makanan dan minuman memberi perlindungan dan kepastian hukum hak-hak konsumen muslim. *Jurnal Hukum*, 7(2).
- Syarfaini, S., & Aeni, S. (2020). konsep pola makan islam.
- Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., & Akiyama, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(12), 3131–3135.
- Tiagen. (2022). TIANamp genomic DNA kit.
- Wijaya, H., Darmawati, S., & Kartika, A. I. (2018). Deteksi Daging Babi pada Tiga Merek Kornet Sapi Berdasarkan Gen Cytochrome b dengan Metode PCR. *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus*, 1, 157–162.