

**DETEKSI DNA BABI (*Sus scrofa*) PADA SAMPEL BAKSO SAPI
DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)**

SKRIPSI

**Disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
pada Jurusan Kimia**

Oleh

JULITA SUSANTI

NIM. 1217040036



uin

**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
SUNAN GUNUNG DJATI
BANDUNG**

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN GUNUNG DJATI

BANDUNG

2025

ABSTRAK

DETEKSI DNA BABI (*Sus scrofa*) PADA SAMPEL BAKSO SAPI DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

Bakso sapi merupakan salah satu produk olahan daging yang populer di kalangan masyarakat. Namun, tingginya harga daging sapi mendorong sebagian oknum untuk melakukan kecurangan dengan mencampurkan daging babi, yang dapat merugikan konsumen, khususnya umat Islam. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan DNA babi pada beberapa sampel bakso sapi curah yang beredar di Kota Bandung menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Tahapan penelitian meliputi ekstraksi DNA menggunakan reagen GENEzol™, pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer nanodrop, optimasi suhu *annealing* primer *cyt b* babi dan *atp8* sapi, serta analisis hasil amplifikasi dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil kuantifikasi menunjukkan bahwa semua sampel memiliki konsentrasi DNA di atas 500 ng/μL dengan rasio kemurnian 1,79–2,03. Suhu *annealing* optimum untuk kedua primer adalah pada suhu 54°C. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa tidak terdapat pita DNA berukuran 131 bp pada seluruh sampel, yang mengindikasikan tidak adanya kandungan DNA babi pada sampel bakso sapi yang diuji.

Kata Kunci: *atp8*; bakso sapi; *cyt b*; DNA babi; elektroforesis; PCR



ABSTRACT

DETECTION OF PORK DNA (*Sus scrofa*) IN BEEF MEATBALL SAMPLES USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHOD

Beef meatballs are among the most popular processed meat products in society. However, the high cost of beef has led some producers to commit fraud by mixing pork meat, which harms consumers, especially Muslims. This study aimed to identify the presence of pork DNA in several samples of unpackaged beef meatballs circulating in Bandung City using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The research included DNA extraction using GENEzol™ reagent, measurement of DNA concentration and purity with a nanodrop spectrophotometer, annealing temperature optimization of porcine cyt b and bovine atp8 primers, and DNA band analysis using agarose gel electrophoresis. Quantification results showed that all samples had DNA concentrations above 500 ng/μL with purity ratios ranging from 1.79 to 2.03. The optimum annealing temperature for both primers was determined to be 54°C. Electrophoresis results showed no DNA bands at 131 bp in any sample, indicating the absence of pork DNA. This study confirms that PCR is a sensitive and specific screening method to detect pork contamination in processed food products.

Keywords: *atp8, beef meatballs, cyt b, electrophoresis, PCR, pork DNA*



KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Bismillahirrahmanirrahim

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, Tuhan seluruh alam yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi penelitian dengan judul “Deteksi DNA Babi (*Sus scrofa*) pada Sampel Bakso Sapi dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)”. Shalawat dan salam semoga selalu tercurah limpahkan kepada junjungan alam, pembawa kebenaran dari zaman jahiliah hingga sekarang, Nabi Muhammad SAW.

Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat kelulusan tingkat strata 1 (S-1) Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati Bandung. Skripsi ini ditulis dengan sebuah kerja keras serta perjuangan dalam menuntut ilmu yang tidak lepas dari berbagai halangan dan rintangan. Namun, berkat doa, bimbingan, serta motivasi dari berbagai pihak, halangan dan rintangan tersebut pun dapat terlewati, sehingga terbentuk skripsi penelitian ini. Dengan demikian, penulis ucapkan rasa syukur dan terimakasih khususnya kepada kedua orang tua penulis, yaitu Bapak Asep Tedi dan Ibu Cicich yang telah meberikan pengorbanan baik moral maupun material kepada penulis. Tidak lupa juga penulis ucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Tina Dewi Rosahdi, S.Pd., M.Si dan Bapak Yusuf Romatulloh M.Si., selaku Dosen Pembimbing I dan Dosen Pembimbing II yang telah memberikan arahan serta bimbingan kepada penulis selama penyusunan skripsi penelitian ini.
2. Bapak Dr. Dede Suhendar, M.Si selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan arahan serta bimbingan kepada penulis dari semester satu hingga penulis menyelsaikan masa kuliah di Jurusan Kimia UIN Bandung,

3. Bapak Eko Prabowo Hadisantoso, M.PKim., selaku ketua Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati Bandung.
4. Seluruh Dosen dan laboran Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati Bandung yang telah banyak memberikan ilmu yang bermanfaat selama perkuliahan.
5. Diri sendiri yang sudah berjuang dan tidak menyerah dalam menyelesaikan masa studi di jurusan kimia ini, meskipun dengan banyak halangan dan tantangan, ekonomi yang harus diperjuangkan, bergelut dengan dunia pendidikan dan kerja yang berdampingan dan harapan orang-orang yang sangat harus diusahakan. Terimakasih yang sebesar-besarnya untuk diri sendiri yang masih bertahan dan terus berjuang tanpa kenal lelah.
6. Rahman Firmansyah yang senantiasa memberikan arahan dan nasihat serta membersamai dalam proses penulisan skripsi, terimakasih atas segala yang telah diberikan, waktu, materi, kesabaran dan juga lingkungan keluarga yang membuat penulis merasa aman dan nyaman.
7. Teman-teman Kimia-A dan Luminescence 21, selaku teman seperjuangan yang telah mengisi hari-hari penulis selama menempuh pendidikan.
8. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyusun skripsi penelitian ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari dan memohon maaf apabila terdapat banyak kesalahan pada penulisan skripsi penelitian ini. Maka dari itu, kritik dan saran sangat penulis harapkan, sehingga dapat penulis jadikan pembelajaran dan perbaikan di kemudian hari. Penulis berharap, skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis umumnya bagi pembaca proosal ini.

Bandung, 09 Desember 2024

Julita Susanti

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR ISTILAH	ix
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Bakso	6
2.2 Babi	8
2.2.1 Kanker kolorektal	9
2.2.2 Hepatitis E	9
2.2.3 Cacingan	9
2.2.4 <i>Multiple sclerosis</i>	9
2.3 DNA Mitokondria	9
2.3.1 <i>cyt b</i> Sebagai Gen Target Pada Babi (<i>Sus scrofa</i>)	11
2.3.2 <i>atp8</i> Sebagai Gen Target Pada Sapi (<i>Bos indicus</i>)	12
2.4 Isolasi DNA	14
2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)	15
2.5.1 Pemisahan (Denaturasi)	15
2.5.2 Penempelan (<i>Annealing</i>)	15
2.5.3 Pemanjangan (<i>Ekstention</i>)	16
2.6 Elektroforesis Gel Agarosa	17

2.7 Spektrofotometer Nanodrop	19
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.2 Bahan, Alat dan Instrumen	20
3.3 Prosedur	21
3.3.1 Penentuan dan Preparasi Sampel.....	21
3.3.2 Ekstraksi DNA Pada Kontrol dan Sampel.....	22
3.3.3 Analisis Konsentrasi dan Kemurnian Ekstrak DNA	23
3.3.4 Optimasi Suhu <i>Annealing</i> dan Amplifikasi Fragmen DNA	24
3.3.5 Identifikasi Kandungan DNA Babi pada Bakso Sapi Menggunakan Elektroforesi Gel Agarosa.....	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Ekstraksi DNA pada Kontrol dan Sampel	26
4.2 Analisis Konsentrasi dan Kemurnian DNA	29
4.3 Optimasi Suhu <i>Annealing</i> dan Amplifikasi Fragmen DNA	30
4.4 Identifikasi Kandungan DNA Babi pada Bakso Sapi Menggunakan Elektroforesi Gel Agarosa	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	42
5.1 Kesimpulan	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN A	56
LAMPIRAN B	59
LAMPIRAN C	60

DAFTAR TABEL

Tabel II. 1 Syarat Mutu Bakso Daging	7
Tabel III. 1 Tempat Pengambilan Sampel	22
Tabel III. 2 Komposisi Campuran Amplifikasi DNA	24
Tabel III. 3 Waktu dan Suhu Proses PCR	24
Tabel IV.1 Hasil Kuantifikasi Ekstrak DNA Kontrol dan Sampel	29
Tabel IV.2 Spesifikasi Primer <i>Forward</i> dan <i>Reverse</i> Gen <i>cyt b</i> Babi	31
Tabel IV.3 Spesifikasi Primer <i>Forward</i> dan <i>Reverse</i> Gen <i>atp8</i> Sapi	32
Tabel IV.4 Hasil Optimasi Suhu <i>Annealing</i> Primer <i>cyt b</i> Babi dan <i>atp8</i> Sapi	35
Tabel IV.5 Karakteristik Produk PCR pada Kondisi Optimum	40



DAFTAR GAMBAR

Gambar II. 1 Bakso Sapi	6
Gambar II. 2 DNA Mitokondria	8
Gambar II. 3 Peta Melingkar Mitogenom Babi	12
Gambar II. 4 Peta Melingkar Mitogenom Sapi	13
Gambar II. 5 Tahapan Proses PCR	15
Gambar II. 6 Mekanisme Perpindahan DNA pada Elektroforesis Gel Agarosa	18
Gambar III. 1 Bagan Alir Penelitian	21
Gambar IV. 1 Proses Lisis Sel pada Ekstraksi DNA	27
Gambar IV. 2 Tahapan Setelah Lisis pada Ekstraksi DNA: (a) Presipitasi DNA (b) Pencucian DNA	28
Gambar IV. 3 Isolat DNA	28
Gambar IV. 4 Elektroferogram Hasil Optimasi Suhu <i>Annealing</i> Primer Babi dan Primer Sapi	34
Gambar IV. 5 Elektroferogram Produk PCR dengan Primer Spesifik <i>cyt b</i> babi dan <i>atp8</i> Sapi	40



DAFTAR ISTILAH

Istilah	Arti/Maksud
Absorbansi	Ukuran kuantitatif seberapa banyak cahaya diserap oleh suatu material
Amplifikasi	Proses molekuler yang dapat meningkatkan, melakukan perpanjangan/duplikasi jumlah salinan saluran kromosom.
Animalia	hewan organisme eukariotik atau organisme dengan sel kompleks dengan multiseluler
<i>Annealing</i>	Tahap penempelan primer pada daerah DNA target dengan perlakuan panas
<i>Artiodactyla</i>	hewan berkuku genap, yang meliputi babi, peccaries, kudaniil, unta, chevrotain, rusa, jerapah, tanduk bercabang, antelop, domba, kambing, dan ternak
<i>Chordata</i>	hewan yang memiliki tulang belakang, contohnya babi
Denaturasi	Proses penguraian struktur protein tiga dimensi atau empat dimensi menjadi tidak beraturan
Ekstraksi	Pemisahan suatu bahan dari campurannya menggunakan pelarut
Elektroforesis	Proses migrasi ion-ion yang dipengaruhi oleh medan listrik
Enzimatik	Proses biokimia yang dikatalisis oleh enzim
<i>Extension</i>	Perpanjangan untai DNA menggunakan primer
Filum	Tingkatan klasifikasi makhluk hidup di bawah kerajaan dan di atas kelas
<i>Final extension</i>	Perpanjangan untai DNA tahap terakhir menggunakan primer
Genus	Pengelompokan dalam klasifikasi makhluk hidup yang secara hierarki tingkatnya di atas spesies

Istilah	Arti/Maksud
Instrumentasi	Metode yang melibatkan penggunaan alat-alat atau instrumen tertentu untuk mengukur, mengontrol, menganalisis suatu proses tertentu
Isolasi	Isolasi DNA adalah proses pemisahan DNA dari campurannya menggunakan suatu pelarut
Isolat	Isolat mengacu pada kultur DNA murni yang diperoleh dari proses isolasi
Katalis	Suatu zat yang dapat mempercepat laju reaksi kimia tanpa mempengaruhi hasil reaksi
Katalisis	Proses peningkatan laju reaksi kimia dengan penambahan suatu zat yang disebut dengan katalis
Kingdom	Istilah kerajaan (kingdom) yang digunakan dalam Biologi
Kontaminasi	Suatu kondisi terjadinya pencemaran terhadap suatu unsur
<i>Lysis</i>	Penghancuran sel
Optimasi	Dalam hal ini, optimasi merupakan proses penyesuaian suhu untuk mendapatkan suhu yang ideal
Ordo	Klasifikasi makhluk hidup di level berikutnya setelah Class, dan merupakan pengelompokan bagi hewan dan tanaman yang lebih spesifik lagi
Purifikasi	Metode untuk mendapatkan komponen bahan alam murni bebas dari komponen kimia lain yang tidak dibutuhkan
Residu	Segala sesuatu yang tertinggal, tersisa atau berperan sebagai kontaminan dalam suatu proses kimia tertentu.
Sentrifugal	Gaya ketika suatu benda bergerak melingkar dengan arah ke luar menjauhi lintasan lingkaran
Sentrifugasi	Suatu teknik yang digunakan untuk memisahkan suatu zat dari campurannya menggunakan gaya sentrifugal

Istilah	Arti/Maksud
Spesies	Kelompok individu-individu atau organisme-organisme yang memiliki kesamaan tertentu.
Sterilisasi	Proses pembersihan alat agar terhindar dari mikroba dengan proses kimia atau fisika
Subspesies	Kelompok yang lebih kecil dalam suatu spesies
Supernatan	Hasil sentrifugasi yang memiliki massa jenis lebih rendah
Suspensi	Campuran antara dua zat atau lebih yang dapat dibedakan antara pelarut dengan zat terlarutnya, dimana zat padat dapat tersebar ke dalam cairan



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Singkatan/lambang	Keterangan
As	Arsen
ATP	Adenosin Trifosfat
BTP	Bahan Tambahan Pangan
BPOM	Badan Pengawas Obat dan Makanan
Cd	Kadmium
CTAB	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EB	Etidium Bromida
EDTA	<i>Etilendiamin tetraasetat</i>
Hg	Merkuri
MtDNA	<i>Deoxyribonucleic Acid Mithochondria</i>
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NaCl	Natrium klorida
NFW	<i>Nuclease Free Water</i>
Pb	Timbal
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Sn	Timah
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	<i>Reaktive Oxygen Spesies</i>
Rrna	<i>Ribonucleic Acid Ribosomal</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate)</i>
UV	Ultraviolet
TAE	Tris, Asetat dan EDTA
TBE	Tris, Borat dan EDTA
Tm	<i>Melting Temperature</i>
<i>tRNA</i>	<i>Ribonucleic Acid Transfer</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakso adalah salah satu olahan daging tradisional yang sangat terkenal dan disukai oleh semua lapisan masyarakat karena rasanya yang unik, enak, dan kaya akan nutrisi. Bakso terbuat dari daging yang dihaluskan dicampur dengan tepung, bumbu, dan rempah. Daging yang paling umum digunakan untuk pembuatan bakso adalah daging sapi[1]. Berdasarkan laporan Badan Pusat Statistik (BPS), konsumsi daging sapi dan kerbau di Indonesia mencapai 816,79 ribu ton pada tahun 2023, dengan dengan rata-rata konsumsi mencapai 0,010 kilogram per kapita per minggu [2]. Namun, berdasarkan data Pusat Informasi Harga Pangan Strategis Nasional (PIHPS), terjadi kenaikan harga daging sapi per kilogramnya di Provinsi Jawa Barat terkhusus Kota Bandung, yaitu pada tahun 2023 mencapai Rp. 145.300, tahun 2024 Rp. 145.400 dan tahun 2025 mencapai Rp. 146.400 [3].

Tingginya harga daging sapi pada saat ini memicu banyaknya produk olahan daging sapi seperti sosis, bakso dan burger yang diganti dengan daging babi karena harganya yang relatif murah[4]. Hal tersebut dibuktikan oleh penelitian Susilowati (2019) di pasar Surya Kota Surabaya, menyebutkan bahwa 5 dari 30 sampel olahan daging sapi yang positif mengandung DNA babi [5]. Penelitian lain yang dilakukan oleh Risa, dkk (2022), membuktikan bahwa terdapat 1 dari 10 sampel daging sapi mengandung daging babi [6]. Hal tersebut dilakukan hanya untuk keuntungan tanpa mempertimbangkan hak konsumen, terutama orang muslim, terhadap syarat kehalalan pangan.

Syariat Islam mengatur berbagai aspek kehidupan umat muslim. Salah satunya adalah hukum haram dan halal. Menurut istilah, haram adalah setiap perbuatan terlarang, dan tercela yang dituntut syar'i untuk ditinggalkan dengan dalil yang tegas dan pasti, serta diikuti dengan acaman hukuman bagi pelakunya dan imbalan bagi orang yang meninggalkannya. Sedangkan halal secara istilah adalah diizinkan dalam melakukan suatu perbuatan sesuai akal dan syariat[7]. Selain itu, Allah juga memberikan penjelasan mengenai makanan yang Allah SWT haramkan, dalam Al-Qur'an Surah Al-Baqarah ayat 173 yang berbunyi:

إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخَنزِيرِ وَمَا أُهْلَ بِهِ لِغَيْرِ اللَّهِ فَمَنْ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَلَا إِثْمَ عَلَيْهِ إِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ

Artinya: “*Sesungguhnya Dia hanya mengharamkan atasmu bangkai, darah, daging babi, dan (daging) hewan yang disembelih dengan (menyebut nama) selain Allah. Tetapi barangsiapa terpaksa (memakannya), bukan karena menginginkannya dan tidak (pula) melampaui batas, maka tidak ada dosa baginya. Sungguh, Allah Maha Pengampun, Maha Penyayang*”.

Dalam ayat tersebut dijelaskan bahwa salah satu makanan yang diharamkan adalah babi, Dwiki (2022) dalam jurnalnya menyebutkan bahwa semua jenis babi baik peliharaan maupun liar, jantan maupun betina, dan semua bagian tubuhnya, termasuk minyaknya itu haram [8]. Selain itu, berdasarkan aspek kesehatan, babi yang diharamkan oleh ajaran islam memiliki beberapa resiko terhadap kesehatan, seperti adanya cemaran mikroba dan parasit *Salmonella sp*, *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii* dan *Trichinella sp* serta resiko kesehatan lainnya [9]. Hal ini dibuktikan oleh penelitian Gusti Agung, dkk (2022) menyebutkan bahwa hasil kultur bakteri menunjukkan adanya bakteri *Salmonella Shigella* pada 68% daging babi, serta hasil uji *Simmons Citrate* menunjukkan adanya bakteri *Salmonella sp*. sebesar 21% pada 38 sampel daging babi yang diteliti dari 12 pasar di Denpasar [10]. Penelitian lain oleh Sri Maiyani, dkk. (2022) menyebutkan bahwa mengkonsumsi daging babi dapat menyebabkan beberapa penyakit, yaitu kanker kolesterol, hepatitis E, cacangan, dan *multiple sclerosis* [11]. Pada penelitian Alvi, dkk. (2019) juga menyebutkan bahwa mengkonsumsi babi dalam bentuk apapun, baik itu *pork chops*, *bacon*, atau *ham* dapat menimbulkan dampak yang berbahaya bagi tubuh [12]. Oleh karena itu, perlu adanya perhatian lebih terhadap kuliner yang berbahan dasar daging sapi seperti bakso sapi, terutama di kota-kota yang memiliki wisata kuliner cukup besar seperti Bandung.

Bandung merupakan kota yang memiliki banyak wisata kuliner, sehingga menjadi salah satu destinasi wisata yang banyak dikunjungi oleh wisatawan lokal maupun mancanegara. Salah satu kawasan kuliner yang sering dikunjungi wisatawan di Kota Bandung adalah Jl. Sudirman. Di Kawasan ini banyak berjejeran *food court modern* dengan bangunan kios dan stand yang beraneka ragam. Banyak sekali minuman dan makanan yang dijual di kawasan ini, baik halal maupun non halal, seperti bakso sapi, mie ayam, bakmie dan lain-lain [13]. Selain itu, terdapat juga kawasan-kawasan lain seperti daerah Arcamanik, Cibiru dan sekitarnya yang

menjual makanan olahan berbahan dasar daging sapi, salah satunya bakso sapi. Berdasarkan hal tersebut, perlu adanya analisis lanjut untuk memastikan ada atau tidaknya kandungan daging babi pada berbagai sampel bakso sapi di kota Bandung.

Terdapat beberapa metode untuk menganalisis kandungan daging babi dalam produk olahan daging seperti bakso sapi, salah satunya menggunakan metode pendekatan berbasis DNA yaitu metode PCR. PCR merupakan teknik analisis amplifikasi DNA secara *in vitro* yang terdiri dari tahapan bersiklus. Pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA target untai ganda [14]. Berdasarkan hal tersebut, terdapat beberapa penelitian pangan menggunakan teknologi PCR, salah satunya yaitu Fajriana, dkk. (2023) melakukan penelitian mengenai “Deteksi Kontaminasi Babi pada Olahan Daging dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)”. Hasil dari penelitian tersebut menyebutkan bahwa bakso kemasan yang berasal dari pasar swalayan dan pedagang kaki lima setelah dilakukan analisis menggunakan metode PCR tidak terkontaminasi dengan DNA babi [15]. Produk hasil amplifikasi PCR diidentifikasi dengan elektroforesis gel agarosa [15]. Dengan elektroforesis gel agarosa, fragmen DNA dapat dipisahkan berdasarkan ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya, DNA sebagai molekul yang bermuatan negatif akan bergerak menuju kutub positif, dan kation (partikel bermuatan positif) akan bergerak menuju kutub negatif [16], sehingga hasil amplifikasi DNA dapat divisualisasikan.

Dalam proses amplifikasi DNA dengan metode PCR diperlukan pasangan primer, yaitu *forward primer* dan *reverse primer*. Primer ini terdiri dari rangkaian basa nukleotida khusus yang dirancang dengan ukuran pendek untuk mengurangi biaya. Panjang primer berkisar antara 18 dan 30 basa, didasarkan pada pertimbangan kombinasi acak yang mungkin ditemukan pada satu urutan genom. Primer dengan panjang lebih dari 30 pasang basa dapat menyebabkan hibridisasi dengan primer lain, sehingga dapat menghambat polimerasi. Sebaliknya, primer dengan panjang yang terlalu pendek dapat berpengaruh pada spesifitas primer, dan dapat menempel pada suhu yang tidak diinginkan [17]. Selain itu, agar tidak terjadi penurunan pada proses amplifikasi, T_m primer juga perlu diperhatikan. Primer yang baik memiliki selisih T_m sekitar 5°C, yaitu 50-65°C [18]. Suhu *annealing* PCR

dipastikan cocok untuk kedua primer, karena primer bekerja berpasangan (*forward primer* dan *reverse primer*) dengan perbedaan suhu maksimum 3°C [19].

Pada penelitian ini digunakan primer *cyt b* babi dan *atp8* sapi. Urutan basa primer *cyt b* babi yang digunakan yaitu *forward*: 5'-CTT GCA AAT CCT AAC AGG CCT G-3' dan *reverse*: 5'-CGT TTG CAT GTA GAT AGC GAA TAA C-3'. Pemilihan sepasang primer *cyt b* ini karena primer *forward* dan *reverse* sesuai dengan kriteria primer yang baik, yaitu mempunyai panjang 20 bp, serta mempunyai rentang Tm 50-65°C [20]. Selain itu, digunakannya primer ini, merujuk pada penelitian yang telah dilakukan Tanabe, dkk. (2007). Sedangkan, urutan basa primer *atp8* sapi yang digunakan yaitu *forward*: 5'-GCC ATA TAC TCT CCT TGG TGA CA-3' dan *reverse*: 5'-GTA GGC TTG GGA ATA GTA CGA-3'. digunakannya primer ini, merujuk pada penelitian yang telah dilakukan Prasetyowati (2024).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan di atas, pada penelitian ini dapat dirumuskan beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

1. Berapa konsentrasi dan kemurnian isolat DNA pada sampel bakso sapi yang beredar di beberapa tempat di Kota Bandung?
2. Berapa suhu *annealing* optimum primer *cyt b* babi dan primer *atp8* sapi?
3. Bagaimana hasil amplifikasi pita gen *cyt b* babi dan *atp 8* sapi pada sampel bakso sapi yang beredar di beberapa tempat di Kota Bandung?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah di atas, pada penelitian ini dapat dibatasi pada beberapa batasan masalah sebagai berikut:

1. Sampel yang dianalisis adalah bakso sapi yang beredar di beberapa tempat di Kota Bandung.
2. Kontrol positif yang digunakan adalah daging babi, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah daging sapi.
3. Optimasi suhu *annealing* kontrol positif dan kontrol negatif dilakukan pada suhu 54, 55, 57, 59, dan 60°C.

1.4 Tujuan Penelitian

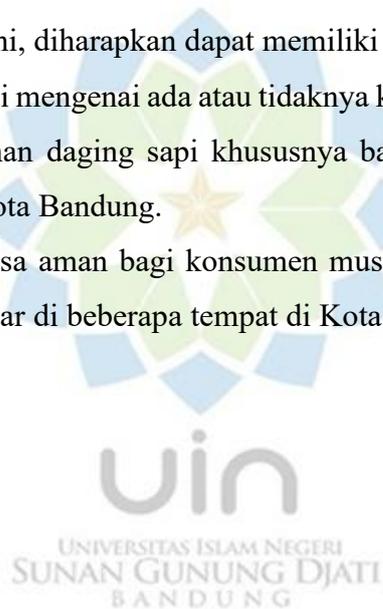
Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah di atas, tujuan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Menentukan konsentrasi dan kemurnian isolat DNA pada kontrol positif dan negatif, serta sampel bakso sapi yang beredar di beberapa tempat di Kota Bandung menggunakan spektrofotometer nanodrop.
2. Menentukan suhu *annealing* optimum primer *cyt b* babi dan primer *atp8* sapi?
3. Mengidentifikasi hasil amplifikasi pita gen *cyt b* babi dan *atp 8* sapi pada sampel bakso sapi yang beredar di beberapa tempat di Kota Bandung.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini, diharapkan dapat memiliki manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan informasi mengenai ada atau tidaknya kandungan DNA babi pada beberapa sampel olahan daging sapi khususnya bakso sapi yang beredar di beberapa tempat di Kota Bandung.
2. Dapat memberikan rasa aman bagi konsumen muslim dalam mengonsumsi bakso sapi yang beredar di beberapa tempat di Kota Bandung.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakso

Bakso adalah produk makanan berbentuk bulatan yang dibuat dari campuran daging (kadar daging tidak kurang dari 50% dari total adonan) melalui proses pencampuran daging, pembuatan adonan, pembuatan bakso, dan pencetakan bakso [22]. Menurut Desri dkk. (2022), bakso adalah produk olahan daging yang dihaluskan, dicampur dengan bumbu dan tepung, lalu dibentuk menjadi bola-bola kecil dan direbus dalam air panas[23]. Definisi Bakso daging menurut Badan Standarisasi Nasional (2014) yaitu produk olahan berbahan daging hewan ternak yang dicampur dengan tepung pati dan bumbu, serta ditambahkan dengan atau tanpa Bahan Tambahan Pangan (BTP) yang diizinkan, dengan bentuk bulat atau bentuk lainnya dan dimatangkan[24]. Bakso sapi dapat dilihat pada **Gambar II.1**.



Gambar II. 1 Bakso Sapi[25]

Bakso sebagai sumber protein, lemak, mineral dan karbohidrat yang berasal dari daging sebagai bahan baku utama pembuatannya yang memiliki komponen utama seperti rasa, kekenyalan, aroma, warna serta kekerasan bakso. Faktor yang dapat mempengaruhi kualitas bakso, antara lain adalah komposisi bakso, proses pembuatan, dan lama pemanasannya. Tekstur bakso yang lebih keras diduga disebabkan oleh kandungan daging yang lebih banyak. Pemanasan menyebabkan tekstur bakso menjadi empuk sehingga semakin lama dipanaskan, bakso menjadi semakin empuk[26]. Tekstur kenyal pada bakso ditentukan oleh daging yang digunakan sebagai bahan utama dalam pembuatan bakso. Kandungan kolagen pada daging yang digunakan inilah yang mempengaruhi tingkat kekenyalan bakso yang dihasilkan sehingga sangat mempengaruhi kualitas pada bakso[27].

Bahan baku utama dalam pembuatan bakso yaitu daging sapi dan bahan tambahan lainnya seperti, garam, es, bumbu penyedap dan bahan pengisi berupa

tepung yang digunakan sebagai pengikat air adonan [28]. Menurut Nita (2023) dalam Aritonang (2007) tepung yang biasa digunakan adalah tepung tapioka yang memiliki tingkat elastisitas dan kandungan pati yang tinggi [29]. Jenis daging yang sering digunakan antara lain daging penutup, pendasar gandik, lamusir, paha depan dan iga. Komponen daging yang terpenting dalam pembuatan bakso adalah protein dan zat besi. Protein daging berperan dalam pengikatan hancuran daging selama pemasakan dan pengemulsi lemak sehingga produk menjadi empuk, kompak dan kenyal. Berbagai bahan tambahan yang digunakan pada pembuatan bakso bertujuan untuk meningkatkan kualitas dan cita rasa [27]. Pembuatan bakso daging sapi terdiri atas empat tahap yaitu: penghancuran daging, pembuatan adonan, pencetakan bakso dan pemasakan[30].

Bakso sapi merupakan produk pangan yang populer dan digemari semua lapisan masyarakat yang akan nutrisi, Hetharia (2021) dalam Nordiansyah dkk. (2015) menyatakan bahwa bakso mempunyai kandungan protein, mineral serta vitamin yang tinggi [31]. Dalam penelitian Pratiwi dkk. (2020) menyebutkan diperoleh hasil kandungan gizi bakso sapi yaitu kadar air 59,87%, kadar abu 5,77%, kadar lemak 9,374 dan kadar protein 8,513% [32].

Bakso sapi merupakan salah satu produk industri pangan yang memiliki standar mutu berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI 01-3818-2014) yang dapat dilihat pada **Tabel II.1**

Tabel II. 1 Syarat Mutu Bakso Daging [24]

No	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan	
			Bakso daging	Bakso daging
1	Keadaan			
1.1	Bau	-	Normal	Normal
1.2	Rasa	-	Normal	Normal
1.3	Warna	-	Normal	Normal
1.4	Tekstur	-	Kenyal	Kenyal
2	Kadar Air	% b/b	Maks. 70,0	Maks. 70,0
3	Kadar Abu	% b/b	Maks. 3,0	Maks. 3,0
4	Kadar Protein (N×6,25)	% b/b	Min. 11,0	Min. 8,0
5	Kadar Lemak	% b/b	Maks. 10	Maks. 10
6	Cemaran logam			
6.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	Maks. 0,3	Maks. 0,3
6.2	Timbal (Pb)	mg/kg	Maks. 1,0	Maks. 1,0
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40,0	Maks. 40,0
6.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	Maks. 0,03	Maks. 0,03
7	Cemaran arsen (As)	mg/kg	Maks. 0,5	Maks. 0,5

No	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan	
			Bakso daging	Bakso daging
8	Cemaran mikroba			
8.1	Angka lempeng total	Koloni/g	Maks. 1×10^5	Maks. 1×10^5
8.2	Koliform	APM/g	Maks. 10	Maks. 10
8.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3	< 3
8.4	<i>Salmonella sp.</i>	-	Negatif/25 g	Negatif/25 g
8.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	Koloni/g	Maks. 1×10^2	Maks. 1×10^2
8.6	<i>Clostridium perfringens</i>	Koloni/g	Maks. 1×10^2	Maks. 1×10^2

2.2 Babi

Babi merupakan salah satu spesies hewan ternak omnivora yang dikembangkan. Babi jenis *Landrace*, *Duroc*, *Large Black*, *Hamphire*, dan babi hasil persilangan lainnya mulai berkembang di bagian Timur dan Barat Indonesia [33]. Berdasarkan golongannya, babi dibedakan menjadi tiga golongan, yaitu babi tipe lemak (*lard type*), tipe daging (*meat type*) dan dwiguna. Tiga golongan babi tersebut dikenal sebagai penghasil daging yang unggul karena memiliki tingkat pertumbuhan yang tinggi dan cepat berkembang biak [34]. Klasifikasi zoologis babi dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
 Filum : Chordata
 Kelas : Mammalia
 Ordo : *Artiodactyla*
 Famili : *Suidae*
 Genus : *Sus*
 Spesies : *Sus scrofa*
 Subspesies : *Sus scrofa domesticus* [35].

Babi memiliki karakteristik daging yang berbeda dengan daging hewan ternak lainnya. Daging babi memiliki bau yang unik, lemak berwarna putih yang sangat basah dan sulit dipisahkan dari dagingnya, tekstur yang lebih tebal, warna agak pucat, dan serat yang lebih halus serta harganya yang relatif murah dibandingkan daging sapi [36]. Selain itu, menurut Maiyena (2022) dalam Maulida (2020) daging babi sulit dicerna oleh sistem pencernaan. Sistem pencernaan akan mengolah setiap potongan daging babi selama enam jam [11]. Artinya, mengkonsumsi daging babi dapat memperlambat proses pencernaan dalam tubuh. Mengonsumsi daging babi dapat menyebabkan beberapa penyakit, antara lain:

1) Kanker kolorektal

Berdasarkan Organisasi Kesehatan Dunia atau WHO, mengonsumsi olahan daging babi yang telah diproses akan memicu timbulnya penyakit kanker. Beberapa contoh olahan daging babi ini seperti bakso, ham, bacon, dan sosis. Jenis kanker yang ditimbulkan yaitu kanker kolorektal. Kanker kolorektal terdapat pada usus besar (kolon) atau rectum. Gejala yang dapat diamati dari penderita yang mengidap penyakit ini yaitu diare, sembelit, sakit perut setelah buang air besar, keluar darah dari anus, tinja berwarna gelap, kram perut dan penurunan berat badan secara signifikan [37].

2) Hepatitis E

Selain kanker kolorektal, mengonsumsi daging babi dapat menyebabkan penyakit hati. Karena jika daging babi dimasak pada suhu tinggi yang menyebabkan pembentukan senyawa N-nitroso. [38].

3) Cacingan

Daging babi dapat terkontaminasi oleh larva cacing *trichinella*. Daging yang terkontaminasi larva cacing ini jika dikonsumsi dapat menyebabkan penyakit *trikinososis*. Walaupun telah melalui proses pemasakan namun larva cacing ini sulit mati [11].

4) Multiple sclerosis

Hasil penelitian Sri Maiyena, dkk. (2022) menyebutkan bahwa korelasi antara mengonsumsi daging babi dan penyakit *multiple sclerosis* lebih tinggi dibandingkan korelasi antara konsumsi daging sapi dengan penyakit *multiple sclerosis* [11]. Sehingga mengonsumsi daging babi dapat memicu peningkatan penyakit *multiple sclerosis* pada manusia yang sangat signifikan.

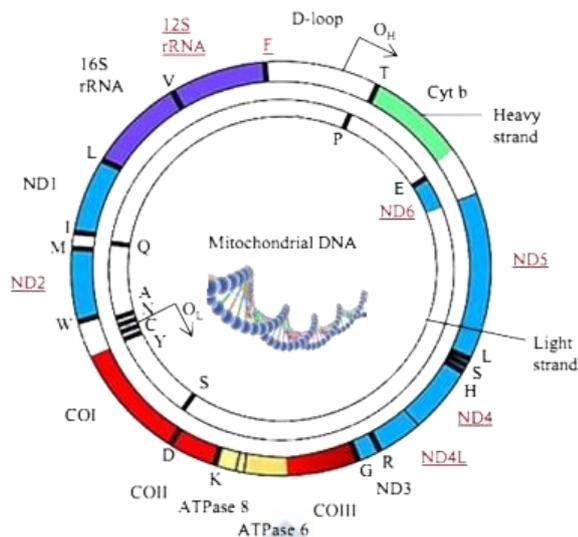
2.3 DNA Mitokondria

Mitokondria merupakan organel sel yang berperan dalam siklus asam trikarboksilat, transpor elektron dan metabolisme energi di dalam sel. Fungsi utama dari mitokondria adalah sebagai penghasil energi melalui proses fosforilasi oksidatif yang menghasilkan produk samping radikal yaitu *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) Mitokondria memiliki suatu material genetik tersendiri yang disebut *mtDNA* [39].

DNA mitokondria (mtDNA) terletak di dalam matriks semi cair dan tersusun atas 16.569 pb (pasang basa), yakni basa adenin, timin, guanin dan sitosin. DNA mitokondria memiliki karakteristik khas yang berbeda dengan DNA inti. DNA mitokondria merupakan DNA utas ganda yang memiliki bentuk sirkuler. DNA mitokondria juga memiliki sifat genetik khas yang membedakannya dengan DNA inti [39]. DNA mitokondria diturunkan secara maternal tanpa rekombinasi dengan laju mutasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan DNA inti. Rata-rata laju mutasi mtDNA diestimasi $0,017 \times 10^{-6}$ substitusi/site/tahun, dan bahkan pada HV1 dan HV2 region mempunyai laju lebih tinggi [40]. DNA mitokondria (mtDNA) memiliki *copy* setiap sel lebih banyak dibandingkan dengan *copy* DNA inti, yaitu sekitar 1.000-10.000. Selain itu, mtDNA juga tidak memiliki protein histon serta tidak memiliki enzim untuk perbaikan kesalahan replikasi atau kerusakan DNA, sehingga mudah untuk mutasi. Laju mutasi yang tinggi menyebabkan mtDNA mampu mengakumulasi polimorfisme 5-10 kali lebih cepat dari DNA inti, sehingga menunjukkan variasi yang tinggi dalam berbagai level, baik antar individu maupun populasi [41].

DNA mitokondria memiliki genom tersendiri yang berbeda dengan genom pada inti sel. DNA mitokondria (mtDNA) terbagi menjadi daerah pengkode (*coding*) dan daerah non-pengkode (*noncoding*). Daerah *coding* terdiri dari 37 gen *coding* untuk rRNA, 22 tRNA, dan 13 polipeptida yang merupakan subunit kompleks enzim yang terlibat dalam fosforilasi oksidatif [42]. Daerah protein pengkode pada mtDNA terdiri atas tiga subunit sitokrom oksidase (sitokrom oksidase I-III), tujuh subunit NADH-dehidrogenase, dua subunit *ATPase* dan *cyt b*. protein-protein tersebut terlibat dalam transport elektron dan reaksi fosforilasi oksidatif [43].

Gen-gen mtDNA tersebut umumnya lebih banyak tersebar pada untai berat, yang dapat dilihat pada gambar **Gambar II.2** yang menunjukkan mtDNA beruntai ganda melingkar. Lingkaran luar menunjukkan untai berat, sedangkan lingkaran dalam menunjukkan untai ringan. Dalam **Gambar II.2** juga menunjukkan gen subunit protein kompleks I-V, RNA ribosom, RNA transfer (tRNA) dan wilayah non-pengkode (*D-loop*) yang diberi warna pada masing-masing subunit untuk membedakannya.

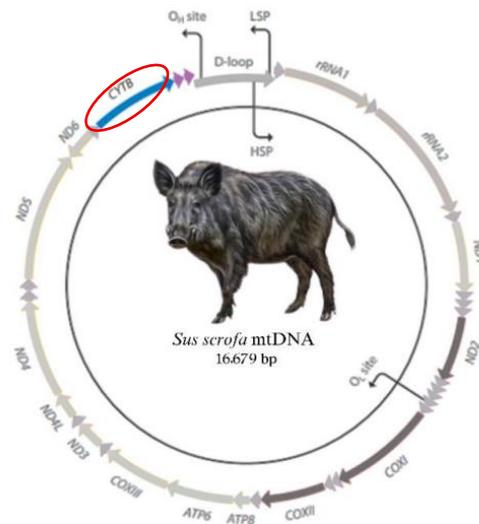


Gambar II. 2 DNA Mitokondria [43]

2.3.1 Gen *cyt b* Sebagai Gen Target Pada Babi (*Sus scrofa*)

Gen *cyt b* pada mtDNA merupakan protein trans membran berperan penting dalam rantai respirasi seluler organisme, salah satunya pada *Sus scrofa*. Genom mitokondria babi I memiliki 16.731 pasangan basa (bp) yang berperan dalam proses transport elektron dalam mitokondria, salah satunya yaitu gen *cyt b*. Gen *cyt b* mengandung 8 buah transmembran heliks, masing-masing transmembran heliks pada gen *cyt b* tersebut dihubungkan oleh domain ekstra membran atau intramembran.

Gen *cyt b* memiliki tingkat evolusi yang sedang, sehingga cukup stabil untuk mempertahankan hubungan antar spesies serta cukup bervariasi dalam membedakan satu spesies dengan spesies lain. Gen *cyt b* terletak dalam DNA mitokondria yang berada di bagian akhir DNA mitokondria yang diwariskan secara maternal, sehingga minim terjadi rekombinasi. Struktur gen *cyt b* relatif stabil, sehingga mudah disejajarkan antar spesies, serta dapat memberikan hasil yang akurat dalam analisis filogenetik [44]. Gen *cyt b* memiliki bagian yang bersifat spesifik dalam pengelompokan pada setiap jenis hewan. Sehingga pengukuran yang dilakukan akan lebih akurat [45]. Letak gen *cyt b* dapat dilihat pada **Gambar II.3**.



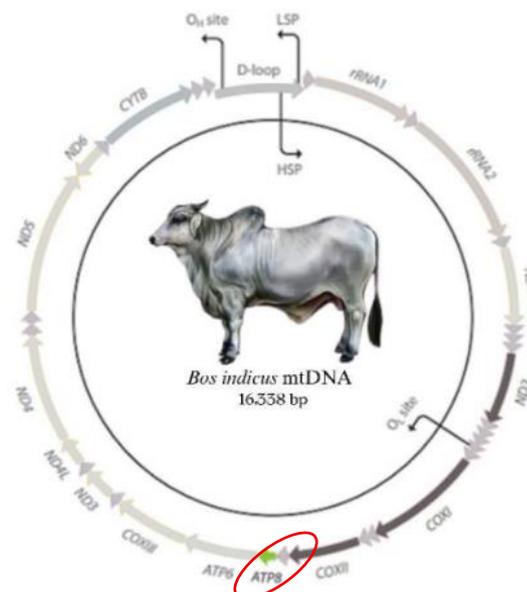
Gambar II.3 Peta Melingkar Mitogenom Babi [44]

Berdasarkan peta genom yang dapat dilihat pada **Gambar II.3** menunjukkan letak gen *cyt b* yang terletak di antara gen *nd6* dan *tRNA1*, berada pada salah satu segmen bagian luar dari sirkuit mitokondria, yaitu pada kompleks III yang berperan penting dalam pemindahan elektron dari ubiquinol (QH₂) ke *cyt c*. Penanda warna biru dalam gambar memperjelas lokasi gen *cyt b*, yang posisinya relatif dekat dengan area *noncoding*, D-loop dan LSP (*Light Strand Promoter*). Letak strategis ini menunjukkan bahwa gen *cyt b* merupakan bagian dari rantai transkripsi mitokondria yang penting dalam proses respirasi seluler. Lokasi yang stabil dan konservatif ini memungkinkan perancangan primer PCR yang spesifik terhadap gen *cyt b* untuk identifikasi spesies, termasuk deteksi keberadaan DNA babi dalam sampel olahan pangan [45].

Keberadaan gen *cyt b* dalam mitokondria juga menjadikannya target yang ideal untuk deteksi molekuler karena jumlah salinan mtDNA yang tinggi dalam setiap sel. Gen *cyt b* terdiri dari delapan transmembran heliks yang terhubung dengan domain ekstramembran. Adanya variasi urutan pada *cytb* menyebabkan gen ini banyak digunakan sebagai penanda untuk pengelompokan jenis hewan [44].

2.3.2 Gen *atp8* Sebagai Gen Target Pada Sapi (*Bos indicus*)

Gen *atp8* merupakan salah satu gen yang terdapat di dalam DNA mitokondria yang mengkodekan bagian dari subunit kecil dari enzim ATP synthase, yaitu enzim yang berperan penting dalam menghasilkan ATP pada sel melalui proses fosforilasi oksidatif [46]. Gen *atp8* terletak dalam DNA mitokondria diantara tRNA *lysin* dan *atp6* pada kompleks IV, yang dapat dilihat pada **Gambar II.4**. Ukuran gen *atp8* tergolong kecil, hanya sekitar 207 pasangan basa (bp) pada manusia, dan 201 pb pada DNA yang ditargetkan [47].



Gambar II.3 Peta Melingkar Mitogenom Sapi [47]

Gen *atp8* sering digunakan dalam perbandingan spesies dalam satu famili karena memiliki beberapa keunggulan, yaitu memiliki tingkat variasi genetik yang cukup tinggi dibandingkan gen mitokondria lain yang lebih konservatif. Hal ini membuat *atp8* sangat berguna untuk membedakan spesies yang masih berkerabat dekat, seperti dalam satu famili atau genus. Selain itu, gen *atp8* juga merupakan bagian dari DNA mitokondria yang bersifat maternal (hanya dari induk betina) dan tidak mengalami banyak rekombinasi, sehingga polanya lebih jelas untuk studi kekerabatan, serta karena ukurannya yang kecil, gen *atp8* mudah diamplifikasi dengan PCR dan cepat disekuensing [47].

2.4 Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah langkah awal dalam melakukan analisis genetika dan molekular. Isolasi DNA merupakan suatu metode ekstraksi untuk mendapatkan DNA murni yang tidak terdapat protein dan RNA dari suatu jaringan [48]. Isolasi DNA berdasarkan prinsipnya didasarkan pada pemecahan jaringan dengan 5 tahapan yaitu isolasi atau pemanenan sel, penghancuran sel (*lysis*), penghilangan protein dan RNA (ekstraksi), pemurnian (purifikasi) DNA serta pengendapan (presipitasi) sehingga terbentuk sel-sel jaringan yang DNA yang murni [49]. Terdapat tahapan penting dalam isolasi DNA yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Sentrifugasi merupakan pemisahan substansi berdasarkan berat jenis suatu molekul dengan menggunakan gaya sentrifugal sebagai driving force [50].

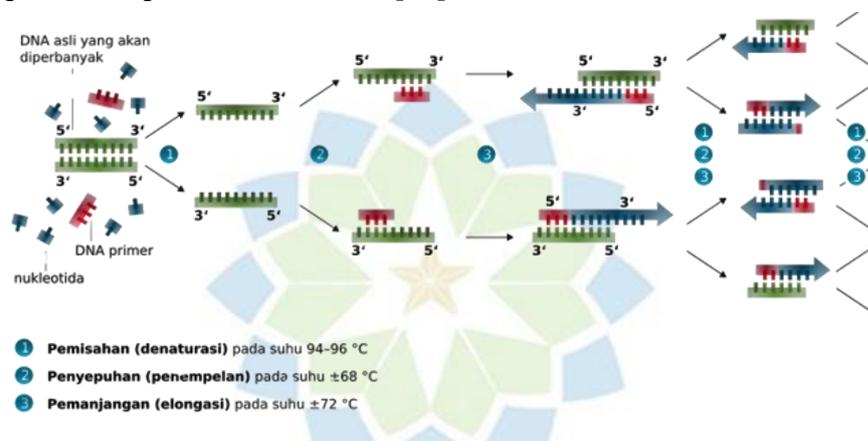
Tahapan pertama dalam isolasi DNA adalah proses penghancuran membran dan dinding sel (*lysis*). Secara kimiawi penghancuran dilakukan dengan memanfaatkan senyawa kimia seperti lisozim yang dikombinasikan dengan EDTA (*Etilendiamin tetraasetat*), SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) sarkosil dan CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) [51].

Untuk menghancurkan sel atau jaringan, ada beberapa metode yang dapat digunakan. Salah satunya adalah secara fisik dengan menggerus sampel menggunakan alu dan mortar dengan nitrogen cair atau dengan menggunakan teknik *freezing-thawing* dan iridasi [52]. Selain itu, penghancuran sel atau jaringan (*lysis*) juga dapat dilakukan secara enzimatis menggunakan proteinase-K untuk melisis membran pada sel darah serta mendegradasi protein globular maupun polipeptida dalam komponen sel [51].

Tahapan kedua pada isolasi DNA yaitu pemisahan DNA dalam protein dengan cara penambahan fenol untuk mengikat protein dan sebagian kecil RNA, kloroform untuk membersihkan protein dan polisakarida dari larutan, serta penambahan RNase [53]. Tahapan selanjutnya yaitu proses purifikasi yang sebelumnya dilakukan proses presipitasi DNA dengan penambahan garam (NaCl) dengan konsentrasi tinggi, sehingga dapat mengendapkan protein karena adanya proses *salting out* [54].

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* yang dapat mengamplifikasi segmen DNA hingga jutaan kali dalam waktu yang singkat dengan melibatkan beberapa tahapan yang berulang (siklus). Pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified* DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal yang kemudian didinginkan hingga mencapai suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Tahapan proses PCR dapat dilihat pada **Gambar II.5** [55].



Gambar II. 5 Tahapan Proses PCR[55]

Pada **Gambar II.5** di atas menunjukkan tahapan-tahapan pada PCR sebagai berikut:

2.5.1 Pemisahan (Denaturasi)

Tahap denaturasi adalah tahap pemisahan untai ganda DNA menjadi untai DNA tunggal. Untai DNA tunggal inilah yang menjadi cetakan bagi DNA baru yang akan didapatkan. Denaturasi pada gambar tersebut dilakukan pada suhu sekitar 94-96°C selama 60 detik [56].

2.5.2 Penempelan (*Annealing*)

Tahap *annealing* merupakan tahap penempelan primer pada daerah DNA target. Enzim Taq polimerase dapat melakukan pembentukan suatu untai DNA baru jika terdapat seuntai DNA berukuran pendek yang menempel pada untai DNA target yang telah terpisah. DNA yang pendek tersebut disebut primer [57]. Agar suatu primer dapat menempel pada DNA target dengan tepat, dibutuhkan suhu yang rendah sekitar 68°C selama 30-60 detik [56].

2.5.3 Pemanjangan (*Ekstension*)

Tahap pemanjangan umumnya terjadi pada suhu 72°C selama 60 detik [56]. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3' dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan template oleh DNA polimerase [55].

Keberhasilan pada proses PCR sangat bergantung pada primer yang digunakan. Pada proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi, serta menyediakan gugus hidroksi (OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses perpanjangan DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui maupun pada urutan protein yang dituju [58].

Kriteria-kriteria yang harus dipenuhi dalam melakukan perancangan primer adalah sebagai berikut:

1. Panjang primer

Panjang primer umumnya berkisar antara 10-40 pasang basa dan merupakan komplementer dari DNA. Primer merupakan kunci keberhasilan PCR, karena primer akan mengawali proses polimerasi untai DNA [57].

2. Komposisi primer

Dalam merancang suatu primer perlu diperhatikan komposisinya, dimana rangkaian nukleotida yang sama perlu dihindari karena dapat menurunkan spesifisitas primer, sehingga memungkinkan terjadinya *mispriming* di tempat lain. Kandungan ((G+C) (% jumlah G dan C)) sebaiknya sama atau lebih besar dari kandungan (G+C) DNA target. Hal tersebut karena primer dengan % (G+C) rendah diperkirakan tidak akan mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada DNA target. Sehingga dapat menurunkan efisiensi proses PCR [58].

3. *Melting Temperature* (T_m)

Melting Temperature (T_m) adalah temperatur dimana 50% untai ganda DNA terpisah. Pemilihan T_m suatu primer sangat berpengaruh terhadap pemilihan suhu *annealing* pada proses PCR. T_m berkaitan dengan komposisi primer dan panjang primer. T_m primer yang baik berkisar antara 50-65°C [59].

4. Interaksi primer-primer

Interaksi primer-primer seperti *self-homology* dan *cross-homology* harus dihindari. Demikian juga dengan terjadinya *mispriming* pada daerah lain yang tidak

diinginkan. Karena hal tersebut dapat mengakibatkan spesifisitas primer menjadi rendah. Selain itu, konsentrasi primer yang digunakan juga menjadi berkurang selama proses, akibat terjadinya *mispriming*. Kondisi ini akan berpengaruh pada efisiensi proses PCR [59].

2.6 Elektroforesis Gel Agarosa

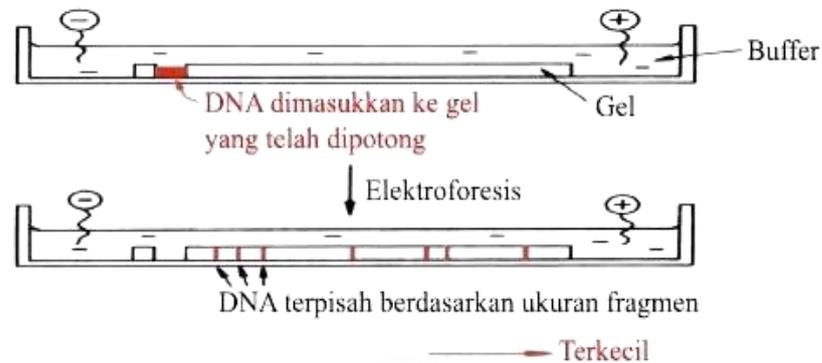
Gel *agarosa* digunakan sebagai teknik standar untuk identifikasi serta memurnikan fragmen-fragmen DNA dan RNA. Pada gel elektroforesis terdapat dua material dasar yang disebut fase diam dan fase gerak (eluen). Fase diam berfungsi menyaring objek yang akan dipisah, sementara fase gerak berfungsi membawa objek yang akan dipisah. Pada fase gerak ditambahkan larutan penyangga untuk menjaga kestabilan objek gel elektroforesis. Hasil ekstraksi DNA akan dimuat pada kolom-kolom (*well* atau sumur) gel elektroforesis [60].

Elektroforesis merupakan teknik untuk memisahkan fragmen DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk mengetahui keberadaan dan membedakan jenis asam nukleat yang diperoleh dari hasil ekstraksi. Prinsip elektroforesis adalah berdasarkan laju perpindahan suatu molekul oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel [61].

Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekulnya, semakin kecil ukuran suatu molekul maka akan semakin cepat laju suatu molekul tersebut, begitupun sebaliknya. Sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur pada gel agarosa yang berada di dalam larutan penyangga, yang dialirkan listrik pada tegangan tertentu. Pada **Gambar II.6** menunjukkan moleku-molekul sampel yang bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai muatannya. Arah pergerakan untuk DNA adalah menuju elektroda positif, karena adanya Arah pergerakan untuk DNA adalah menuju elektroda positif, karena adanya

Larutan DNA yang bermuatan negatif dimasukkan ke dalam sumur-sumur yang terdapat pada gel agarosa dan diletakan pada kutub negatif. Apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan buffer yang sesuai maka DNA akan bergerak ke arah kutub positif. Laju migrasi DNA dalam medan listrik berbanding terbalik dengan massa DNA. Migrasi DNA ditentukan oleh ukuran panjang dan ukuran DNA sebagaimana yang ditunjukkan pada **Gambar II.6**. Untuk visualisasi

DNA, ditambahkan larutan etidium bromida yang akan masuk di antara ikatan hidrogen pada DNA, sehingga pita fragmen DNA akan terlihat di bawah sinar lampu UV [62].



Gambar II. 5 Mekanisme Perpindahan DNA pada Elektroforesis Gel Agarosa [62]

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi elektroforesis adalah sebagai berikut:

1. Ukuran Fragmen DNA

Fragmen DNA yang memiliki ukuran lebih besar akan bergerak lebih lambat dibandingkan fragmen DNA yang berukuran lebih kecil. Sehingga ukuran panjang DNA dapat dipisahkan [63].

2. Konsentrasi Gel Agarosa

Semakin besar konsentrasi gel agarosa yang digunakan maka akan semakin pori-pori gel, begitupun sebaliknya [64].

3. Voltase yang digunakan

Semakin tinggi voltase yang digunakan, maka pemisahan molekul DNA akan menurun dikarenakan mobilitas pada molekul DNA akan meningkat secara tajam [63].

4. Penggunaan *Gel Red*

Gel red digunakan untuk visualisasi, dimana *gel red* akan masuk diantara ikatan hidrogen yang terletak pada DNA. Sehingga akan menghasilkan pita fragmen DNA yang terlihat di bawah sinar UV. [63].

5. Larutan Buffer

Buffer yang digunakan harus memiliki kekuatan ion yang tinggi, sehingga dapat memaksimalkan kinerja aliran listrik dan migrasi DNA [63]. Pada elektroforesis terdapat dua jenis larutan buffer yang baik untuk digunakan yaitu

larutan buffer TAE (*Tris Acetic EDTA*) dan larutan buffer TBE (*Tris Boric EDTA*) [60].

2.7 Spektrofotometer Nanodrop

Nanodrop merupakan salah satu alat spektrofotometer yang digunakan untuk menghitung kuantitas asam nukleat, konsentrasi dan kemurnian DNA. Spektrofotometer Nanodrop adalah alat yang memiliki prinsip kerja berdasarkan *Hukum Lambert Beer*, yaitu menghitung perbedaan penyerapan cahaya UV dimana pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm sedangkan kontaminan berupa protein dan fenol akan menyerap cahaya dengan panjang gelombang 280 nm. Kemurnian DNA dapat diukur dengan rasio absorbansi terhadap panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, kemurnian DNA yang baik adalah 1,8-2,0 [65].

Rasio 260/280 yang merupakan parameter paling banyak digunakan dalam menentukan kemurnian pengukuran asam nukleat. Rasio ini paling umum digunakan untuk menentukan keberadaan protein dan atau fenol dalam sampel asam nukleat atau DNA yang diisolasi [66].



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

Dalam penelitian ini dilakukan identifikasi DNA babi pada beberapa sampel bakso sapi dengan metode *Polymerase Chain Reactin* (PCR) yang kemudian dianalisis lebih lanjut dengan elektroforesis gel. Dalam bab ini, dijelaskan metode, jenis dan sumber data yang meliputi tempat dan waktu penelitian, bahan, alat dan instrumentasi, serta prosedur.

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai dengan Juni 2025 di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran

3.2 Bahan, Alat dan Instrumen

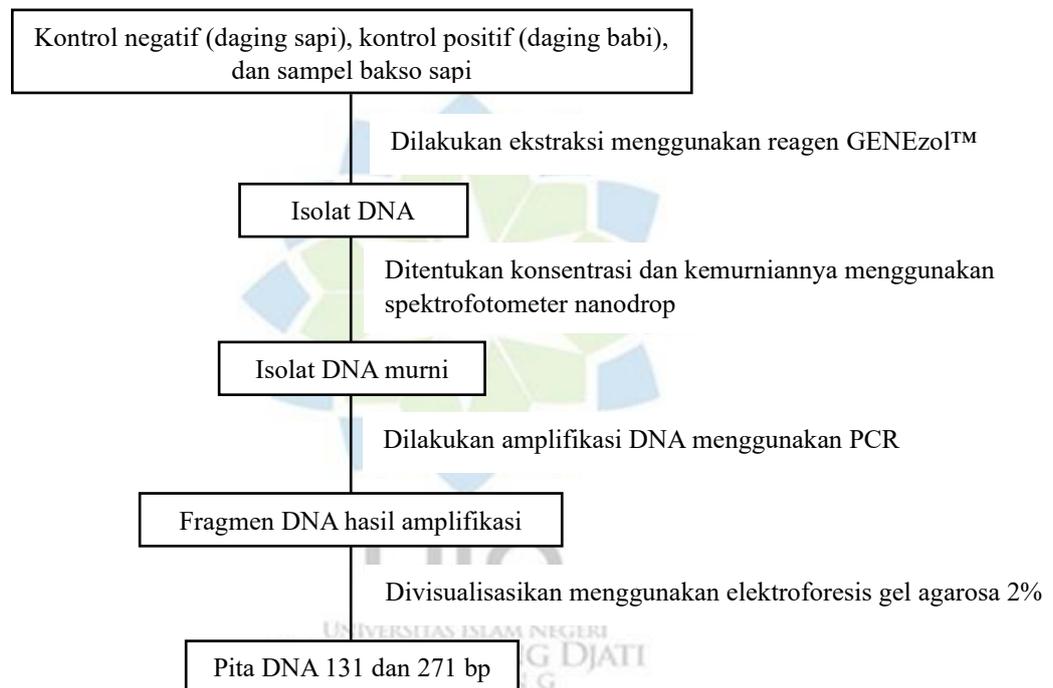
Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu primer spesifik gen *cyt b* babi *h forward*: 5'-CTT GCA AAT CCT AAC AGG CCT G-3' dan *reverse*: 5'-CGT TTG CAT GTA GAT AGC GAA TAA C-3', *atp8* sapi *forward*: 5'-GCC ATA TAC TCT CCT TGG TGA CA-3' dan *reverse*: 5'-GTA GGC TTG GGA ATA GTA CGA-3', *microtube* (Genfollower), *microtips* (onemed), parafilm, sarung tangan steril, daging babi, daging sapi, sampel bakso sapi curah A, sampel bakso sapi curah B, sampel bakso sapi curah C, sampel bakso sapi curah D, parafilm, Reagen GENEzol™, kloroform, etanol murni 100%, etanol 70%, 0,1 M natrium sitrat dalam 10% etanol (pH 8,5), buffer TE 1X (pH 8,5), kit PCR yang terdiri atas Dream Taq DNA *Polymerase*, Dream Taq buffer 2×, MgCl₂, dan *Nuclease Free Water*, bubuk agarosa (servicebio), buffer TAE 1x, SYBR *Safe gel red* (invitrogen), Marker DNA 1000 bp (generuller), *loading dye* (vivantis), dan akuades.

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu autoklaf, gunting iris, gelas kimia 500 mL, gelas kimia 50 mL, termometer, mikropipet 1- 10 µL (*Thermo Fisher*), mikropipet 100 - 1000 µL (*Thermo Fisher*), *microcentrifuge* (*Hettich*), kaca arloji, spatula, *waterbath*, statif, klem, termometer, neraca analitik, vortex (*Thermo Scientific*). Instrumen yang akan digunakan adalah Spektrofotometer nanodrop (Infinite M200 Pro) untuk kuantifikasi DNA dan *Polymerase Chain Reaction* (*SensoQuest Lab Cycler*) untuk amplifikasi DNA

elektroforesis gel (Mupid-EXu) untuk identifikasi hasil PCR dan UV transimulator (*Bio-rad*) untuk visualisasi hasil elektroforesis.

3.3 Prosedur

Secara umum, prosedur yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri dari ekstraksi DNA sampel dan kontrol, analisis konsentrasi dan kemurnian ekstrak DNA, optimasi suhu *annealing* dan amplifikasi DNA, dan identifikasi kandungan DNA babi pada sampel bakso sapi menggunakan elektroforesis gel agarosa, yang dapat dilihat pada **Gambar III.1**.



Gambar III.1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Penentuan dan Preparasi Sampel

Penelitian ini dilakukan dengan metode analisis kuantitatif, yaitu peneliti mendeskripsikan, meneliti, menjelaskan dan menarik kesimpulan dari suatu penelitian yang dapat diamati menggunakan angka-angka yang dapat diukur, dihitung dan dibandingkan pada skala numerik. Adapun pengambilan sampel dilakukan dengan teknik sampling *nonprobability*, dengan jenis *purposive* sampling, yaitu dengan cara menetapkan ciri-ciri khusus yang sesuai dengan tujuan penelitian, sehingga diharapkan dapat menjawab permasalahan penelitian. Berdasarkan kriteria yang tertera pada tujuan penelitian dan batasan masalah penelitian, maka penulis membuat kriteria sampel bakso yang digunakan yaitu

berupa olahan daging sapi yang dijual di Kota Bandung, yang dapat dilihat pada **Tabel III.1.**

Tabel III. 1 Tempat Pengambilan Sampel

No	Sampel	Merek	Lokasi
1	Daging babi	Civo Meat	Kota Bandung
2	Daging sapi	Ells' Beef	Kota Bandung
3	Bakso sapi A	Tidak bermerek (membuat sendiri)	Kecamatan W, Kota Bandung
4	Bakso sapi B	Tidak bermerek (membuat sendiri)	Kecamatan X, Kota Bandung
5	Bakso sapi C	Tidak bermerek (membuat sendiri)	Kecamatan Y, Kota Bandung
6	Bakso sapi D	Tidak bermerek (membuat sendiri)	Kecamatan Z, Kota Bandung

Kontrol positif berupa daging babi, kontrol negatif berupa daging sapi, sampel bakso sapi curah A, B, C dan D masing-masing ditimbang 0,2 gram, dimasukkan ke dalam mikrotube dan dihaluskan menggunakan gunting *chopper* yang selanjutnya akan dilakukan ekstraksi.

3.3.2 Ekstraksi DNA Pada Kontrol dan Sampel

Langkah pertama, kontrol positif (daging babi), kontrol negatif (daging sapi), dan masing-masing sampel bakso curah A, B, C dan D yang telah dihaluskan dalam mikrotube 1,5 mL ditambahkan 200 μ L GENEzol™ dan dihomogenkan menggunakan homogenizer, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Setelah itu, ditambahkan 40 μ L kloroform dan divortex hingga homogen, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 3 menit kemudian di sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 11.200 RPM pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan dari proses sebelumnya dibuang, lalu ditambahkan 100% etanol murni sebanyak 60 μ L ke dalam endapan, dicampurkan dengan mikropipet, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang dan sesekali di homogenkan secara inverting. Selanjutnya, campuran disentrifugasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 2000 xg pada suhu 4°C, lalu buang supernatan yang dihasilkan.

Langkah selanjutnya yaitu pencucian, dimana endapan yang diperoleh dari proses sebelumnya ditambahkan natrium sitrat 0,1 M di dalam etanol 10% (pH 8,5) sebanyak 200 μ L, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruan g sambil sesekali di homogenkan memakai teknik inverting, dan disentrifugasi dengan kecepatan

2000 xg selama 5 menit pada suhu 4°C. Pellet yang telah didapat kemudian didinginkan selama 5-10 menit pada suhu ruang. Lakukan langkah tersebut sebanyak 2 kali. Setelah itu, pellet DNA yang didapat kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 133 µL, kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang sambil di inverting sesekali, lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2000 xg selama 5 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya, dibuang supernatan yang diperoleh dan diangin anginkan pellet DNA yang diperoleh pada suhu ruang selama 5-10 menit.

Langkah terakhir yaitu resuspensi, pada tahap ini, DNA yang telah diangin anginkan sebelumnya, ditambahkan buffer TE 1X pH 8,5 sebanyak 60 µL. Campuran kemudian diinkubasi selama 10 menit menggunakan *instrumen heat block* pada suhu 60°C. Setelah inkubasi selesai campuran di sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 16,000 xg lalu supernatannya dipindahkan kedalam mikrotube yang baru, sehingga diperoleh isolat DNA yang sudah terisolasi.

3.3.3 Analisis Konsentrasi dan Kemurnian Ekstrak DNA

Analisis konsentrasi dan kemurnian ekstrak DNA dilakukan dengan metode kuantitatif menggunakan spektrofotometer nanodrop. Masing-masing isolat DNA sampel dan kontrol diambil sebanyak 2,5 µL, kemudian diteteskan pada plat khusus dalam spektrofotometer nanodrop, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Selanjutnya, ditentukan konsentrasi DNA menggunakan **Persamaan 3.1** dan ditentukan kemurnian DNA menggunakan **Persamaan 3.2** sebagai berikut:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\text{mL}) = A_{260} \times \text{fp} \times 50 \mu\text{g}/\text{mL}$$

$$\text{Indeks Kemurnian DNA} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Keterangan:

[DNA] = Konsentrasi DNA

Fp = Faktor pengencer

A₂₆₀ = Absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

A₂₈₀ = Absorbansi pada panjang gelombang 280 nm

3.3.4 Optimasi Suhu *Annealing* dan Amplifikasi Fragmen DNA

Optimasi suhu *annealing* primer *cyt b* babi dan primer *atp 8* sapi dilakukan pada suhu 54, 55, 57, 59 dan 60,°C, Suhu-suhu tersebut dipilih dengan menyesuaikan nilai T_m pada primer *forward* dan primer *reverse*, masing-masing primer.

Pada tahapan optimasi suhu *annealing* ini, disiapkan *microtube* 0,2 mL yang telah disterilkan sebanyak 7 buah, kemudian dicampurkan Dream Taq PCR Master Mix (2x), primer *forward*, primer *reverse*, DNA *template* dan *Nuclease Free Water* (NFW) dengan komposisi seperti pada **Tabel III.2**.

Tabel III. 2 Komposisi Campuran Amplifikasi DNA

Reagen	Jumlah (μL)
PCR Master Mix	7,5
Primer <i>forward</i> (10 μM)	0,6
Primer <i>reverse</i> (10 μM)	0,6
DNA <i>Template</i> (100 ng/ μL)	1,5
<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	4,8

Kemudian dilakukan *setting* pada pada instrumen PCR sebanyak 35 siklus yang dapat dilihat pada **Tabel III.3**. Setelah itu, dilakukan amplifikasi dan fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan PCR disimpan dalam lemari es pada suhu -20°C.

Tabel III. 3 Waktu dan Suhu Proses PCR

Reaksi	Suhu (°C)	Waktu (detik)
Pra denaturasi	95	60
Denaturasi	95	30
<i>Annealing</i>	54	30
<i>Extension</i>	72	1
<i>Final extension</i>	72	10

3.3.5 Identifikasi Kandungan DNA Babi pada Bakso Sapi Menggunakan Elektroforesi Gel Agarosa

Pada tahap ini dilakukan dua perlakuan, yaitu pembuatan gel agarosa 2% dan elektroforesis DNA sampel. Pembuatan gel agarosa dilakukan dengan pelarutan 0,9 gram bubuk agarosa LE *analysis grade* ke dalam 45 mL buffer TAE 1x, kemudian diaduk dan dipanaskan hingga larut. Setelah agarosa larut sempurna, dидiamkan hingga sedikit dingin, lalu ditambahkan 3,5 μL *fluorescence dye*, dihomogenkan, dan dituangkan ke dalam cetakan agarosa yang telah diletakan sisir terlebih dahulu

untuk membentuk sumuran dan dibiarkan hingga mengeras. Selanjutnya, gel agarosa yang terbentuk dipindahkan pada chamber elektroforesis, dan dituangkan buffer TAE 1x pada sumuran hingga gel terendam.

Tahap selanjutnya yaitu elektroforesis DNA sampel dengan cara mencampurkan 3 μL DNA ladder 100 bp dengan 1 μL *loading dye* yang kemudian dimasukkan ke dalam line 1 pada sumuran agarosa. Selanjutnya disiapkan masing-masing 5 μL hasil amplifikasi DNA yang telah ditambahkan 1 μL *loading dye*. Setelah itu, campuran tersebut disuspensi dan dimasukkan ke dalam line 2-7 pada sumuran agarosa. Kemudian, diatur tegangan pada 100 volt dan waktu elektroforesis selama 30 menit. Lalu, gel agarosan diamati di bawah sinar UV transilluminator.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

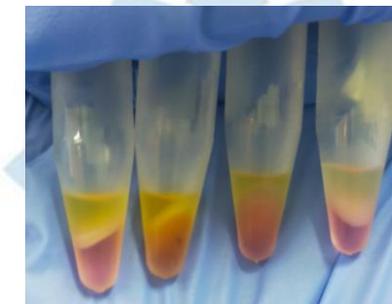
Bab ini menjelaskan hasil analisis pada beberapa sampel bakso sapi untuk menentukan status kehalalan sampel bakso sapi di beberapa tempat di Kota Bandung, dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Identifikasi kehalalan tersebut dilakukan dengan cara menentukan ada atau tidaknya kandungan DNA babi pada sampel. Keberadaan DNA babi akan dibuktikan dengan munculnya pita DNA berukuran 131 bp melalui hasil elektroforesis gel agarosa. Selain itu, keamanan pangan sampel juga akan diuji dengan metode yang sama, dengan target pita DNA berukuran 271 bp, untuk memastikan bahwa bakso yang dianalisis terbuat dari daging sapi.

4.1 Ekstraksi DNA pada Kontrol dan Sampel

Ekstraksi DNA pada kontrol daging babi sebagai kontrol positif, daging sapi sebagai kontrol negatif, dan sampel bakso sapi dilakukan dengan menggunakan reagen GENEzol™ dengan metode fenol-kloroform termodifikasi. Metode fenol-kloroform termodifikasi adalah metode ekstraksi DNA yang efektif untuk memisahkan DNA dari protein dan kontaminan lain dalam sampel. Proses ekstraksi melibatkan lisis sel yang diikuti oleh penambahan campuran fenol dan kloroform pemisahan fase [67].

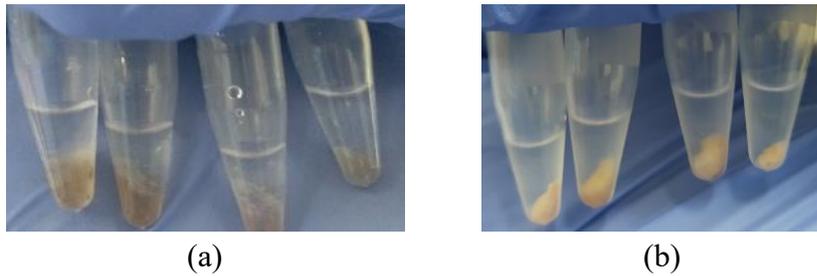
Reagen yang digunakan untuk ekstraksi DNA dalam penelitian ini adalah reagen GENEzol™ dari geneaid. Reagen ini terdiri dari guanidin isotiosianat, fenol, dan kloroform yang memiliki kemampuan untuk mengekstrak DNA dari berbagai jenis sampel, seperti darah, serum, sel kultur, dan jaringan. Guanidin isotiosianat dalam GENEzol™ berperan sebagai agen *chaotropic* yang menghancurkan struktur seluler, sehingga protein akan terdenaturasi, terjadi inaktivasi enzim seperti RNase, dan menjaga integritas asam nukleat selama proses ekstraksi. Asam nukleat termasuk DNA akan dilepaskan dan diperoleh isolat DNA dengan tingkat kemurnian yang cukup tinggi [68]. Fenol yang terkandung dalam reagen GENEzol™ berfungsi sebagai agen pengikat makromolekul seperti protein, lipid dan karbohidrat, sehingga dapat terpisah dari DNA ketika dilakukan sentrifugasi. Sedangkan kloroform berfungsi meningkatkan densitas fase organik dalam campuran fenol-kloroform, sehingga memungkinkan pemisahan yang lebih

efektif antara fase air (atas) yang mengandung RNA, protein, lipid dan karbohidrat dan fase organik (bawah) yang mengandung DNA setelah sentrifugasi. Selain itu, kloroform juga berfungsi dalam proses denaturasi protein, sehingga protein akan terpresipitasi dan terlokalisasi di fase organik atau pada antarmuka antara fase air dan organik, yang membantu dalam pemurnian asam nukleat dengan menghilangkan kontaminan protein [69]. Kloroform berlebih yang ditambahkan setelah sentrifugasi juga berfungsi untuk menghilangkan sisa-sisa fenol yang mungkin terbawa dalam fasa air setelah proses ekstraksi. Fenol dapat mengganggu reaksi enzimatik sehingga akan mempengaruhi analisis DNA lebih lanjut [68]. Pada proses ekstraksi DNA menggunakan reagen GENEzol™ ini, akan terjadi proses lisis sel, yang dapat dilihat pada **Gambar IV.1**.



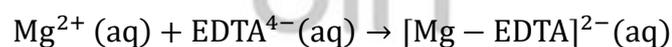
Gambar IV. 1 Proses Lisis Sel pada Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi dilanjutkan dengan presipitasi DNA menggunakan campuran etanol murni yang berfungsi untuk menurunkan kelarutan asam nukleat dalam air, sehingga DNA akan terpresipitasi ketika disentrifugasi dan mengendap di bawah tabung, yang selanjutnya akan dilakukan pencucian menggunakan campuran natrium sitrat 0,1 M di dalam etanol 10% (pH 8,5). Campuran natrium sitrat dan etanol akan mengkelat ion kalsium dan magnesium, sehingga akan terjadi nonaktivasi DNase ketika dilakukan pencucian DNA [70]. Selain itu natrium sitrat juga merupakan garam yang dapat meningkatkan kelarutan senyawa polisakarida, seperti karbohidrat dalam tepung pada sampel, sehingga tidak akan ikut mengendap bersama DNA saat melalui proses sentrifugasi [71]. Proses pencucian DNA ini diulang satu kali lagi untuk memastikan seluruh DNA yang diinginkan tidak terkontaminasi oleh zat yang tidak diinginkan. Proses presipitasi dan pencucian DNA dapat dilihat pada **Gambar IV.2**.



Gambar IV.2 Tahapan Setelah Lisis pada Ekstraksi DNA: (a) Presipitasi DNA (b) Pencucian DNA

DNA yang telah diperoleh kemudian diangin-anginkan untuk menghilangkan sisa etanol, dan dilanjutkan dengan resuspensi DNA dengan buffer TE (pH 8,5) sambil diinkubasi dalam suhu 60°C. Resuspensi DNA berfungsi untuk melarutkan kembali DNA yang dihasilkan dan menjaga DNA dalam keadaan yang optimal. Suhu 60°C digunakan untuk membantu melarutkan DNA dan memastikan bahwa DNA terdispersi secara merata dalam larutan sehingga siap digunakan dalam analisis lebih lanjut. Buffer TE atau tris EDTA berperan sebagai agen pengkelat yang akan mengikat ion magnesium [71]. Ion magnesium merupakan suatu kofaktor yang diperlukan untuk aktivitas enzim nuklease [72]. Reaksi pengkelatan yang terjadi pada ion magnesium oleh larutan tris EDTA adalah sebagai berikut.



Berdasarkan proses tersebut, diperoleh DNA yang tersuspensi yang selanjutnya dipindahkan ke dalam *microtube* baru sebagai isolat dan disimpan pada suhu -20°C, untuk menjaga stabilitas dan integritas DNA. Isolat DNA sampel dan kontrol hasil ekstraksi dapat dilihat pada **Gambar IV. 3**.



Gambar IV. 3 Isolat DNA

4.2 Analisis Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Pengukuran konsentrasi DNA terisolasi dilakukan secara kuantitatif melalui perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260/280 nm menggunakan spektrofotometer nanodrop [73]. Rasio absorbansi pada panjang gelombang 260/280 nm yang baik berada pada rentang 1,8–2,0. Konsentrasi pada rentang tersebut menunjukkan bahwa DNA yang diisolasi memiliki kualitas kemurnian yang baik. Sedangkan rasio di bawah rentang tersebut, menandakan adanya kontaminasi protein atau polisakarida, dan rasio di atas rentang tersebut menunjukkan adanya kontaminasi RNA yang signifikan pada isolat DNA [74]. Hasil analisis konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer nanodrop dapat dilihat pada **Tabel IV.1**.

Tabel IV.1 Hasil Kuantifikasi Ekstrak DNA Kontrol dan Sampel

Kode Sampel	Absorbansi 260 nm	Absorbansi 280 nm	Konsentrasi (ng/ μ L)	Rasio
DS	1,2946	0,6981	1294,6	1,85
DB	0,9634	0,5218	963,4	1,85
A1	0,5443	0,3039	544,3	1,79
A2	1,8439	0,9077	1843,9	2,03
A3	2,3501	1,253	2350,1	1,88
A4	2,0863	1,116	2086,3	1,87

Keterangan:

DS = Daging sapi

DB = Daging babi

A1 = Bakso sapi 1

A2 = Bakso sapi 2

A3 = Bakso sapi 3

A4 = Bakso sapi 4

Berdasarkan **Tabel IV.1**, hasil analisis konsentrasi dan kemurnian DNA diperoleh isolat DNA yang memiliki tingkat kemurnian yang baik yaitu pada sampel daging sapi (DS), daging babi (DB), sampel bakso sapi 3 (A3) dan sampel bakso sapi 4 (A4). Masing-masing sampel tersebut memiliki tingkat kemurnian yang baik karena memiliki rentang rasio 1,8-2,0. Sedangkan sampel bakso 1 dan sampel bakso 2 memiliki tingkat kemurnian yang kurang murni. Dimana sampel bakso 1 (A1) memiliki rentang rasio di bawah 1,8-2,0 yaitu 1,79, yang menunjukkan adanya kontaminasi protein atau polisakarida. Hal tersebut terjadi

karena sampel bakso sapi 1 dimungkinkan memiliki perbandingan tepung yang lebih tinggi dibandingkan daging jika dilihat secara visual. Tepung dapat mengandung senyawa seperti polisakarida, protein atau fenol yang memiliki daya serap sinar UV yang tinggi pada 280 nm, sehingga jika banyak protein tersisa dalam sampel, nilai A280 akan tinggi dan rasio A260/A280 menjadi rendah [75].

Berbanding terbalik dengan sampel A1, sampel A2 memiliki rentang rasio di atas 1,8-2,0 yaitu 2,03, yang menunjukkan adanya kontaminasi RNA, yang dimungkinkan karena daging sapi pada sampel bakso tersebut mengandung sel-sel aktif metabolisme tinggi. Sel-sel tersebut memiliki ribosom, mRNA, tRNA, dan rRNA dalam jumlah besar sehingga ketika proses lisis RNA tersebut masih tersisa, sehingga menyerap sinar UV pada A260 nm yang cukup tinggi dibandingkan A280 dan rasio menjadi lebih dari 2,0 [76]. Selain itu, hal tersebut juga dapat terjadi karena kompleksitas matriks makanan dan perlakuan termal yang dapat mempengaruhi kualitas DNA yang diekstraksi [77].

Proses kuantifikasi DNA menggunakan spektrofotometer nandrop merupakan langkah yang penting sebelum proses amplifikasi DNA, dimana diperlukan konsentrasi DNA yang mencukupi pada proses amplifikasi sehingga diperoleh produk PCR yang diinginkan. Menurut Kapa Biosystem (2014) dalam penelitian milik Nugroho, dkk. (2017) disebutkan bahwa konsentrasi isolat DNA yang efisien untuk amplifikasi dengan PCR konvensional berada pada rentang 10 – 100 ng/ μ L [78]. Berdasarkan hasil kuantifikasi isolat DNA pada **Tabel IV.1** konsentrasi isolat DNA kontrol dan sampel memenuhi konsentrasi DNA yang diperlukan.

4.3 Optimasi Suhu *Annealing* dan Amplifikasi Fragmen DNA

Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk memperoleh hasil PCR yang optimal dan spesifik. Tahap *annealing* merupakan proses primer menempel pada untai DNA target. Penentuan suhu *annealing* yang optimal perlu dilakukan terlebih dahulu dengan menggunakan gradien suhu pada mesin PCR. Teknik gradien suhu ini memungkinkan identifikasi suhu paling tepat melalui beberapa variasi suhu yang telah ditentukan sebelumnya. Pemilihan suhu *annealing* yang tidak sesuai dapat menyebabkan *misspriming*, yaitu kondisi di mana primer menempel pada lokasi yang tidak spesifik, sehingga mengakibatkan amplifikasi segmen DNA yang

bukan target [79]. Primer berfungsi sebagai cetakan yang spesifik, dan proses pemanjangan untai DNA dimulai dari bagian primer ini. Oleh karena itu, penentuan suhu *annealing* menjadi faktor yang sangat penting dalam proses amplifikasi DNA. Umumnya, suhu *annealing* yang digunakan berada dalam kisaran 50–60°C [80].

Dalam penelitian ini, digunakan sepasang primer yang dirancang secara spesifik berdasarkan *sekuens* gen mitokondria penyandi protein gen *cyt b* dari spesies babi (*Sus scrofa*), yang terdiri atas primer *forward* dan primer *reverse*. Primer *forward* berikatan pada sisi hulu (*upstream*) daerah target DNA pada orientasi 5', sedangkan primer *reverse* berikatan pada sisi hilir (*downstream*) pada orientasi 3' dari untai komplementer, sehingga memungkinkan amplifikasi segmen DNA di antara keduanya melalui proses PCR. Menurut Agustinin, dkk. (2019), panjang daerah target yang diamplifikasi oleh kedua primer ini dapat bervariasi dari puluhan hingga ribuan pasangan basa, tergantung desain primer dan tujuan analisis. Seluruh komponen primer yang digunakan, termasuk primer forward, daerah target, dan primer reverse, berada pada wilayah gen *cyt b* dalam genom mitokondria (*mtDNA*) *Sus scrofa*, yang dikenal bersifat konservatif dan spesifik untuk identifikasi molekuler [81].

Desain primer mempertimbangkan parameter penting seperti suhu *annealing*, kandungan GC, panjang oligonukleotida, serta potensi pembentukan struktur sekunder, dengan tujuan untuk memastikan efisiensi dan spesifisitas dalam proses amplifikasi [82]. Nilai %GC yang ideal untuk primer PCR umumnya berada dalam kisaran 40% hingga 60%. Kandungan GC yang seimbang diperlukan untuk memastikan kestabilan ikatan antara primer dan template DNA, mengingat pasangan basa G≡C memiliki tiga ikatan hidrogen yang lebih kuat dibandingkan pasangan A=T yang hanya memiliki dua. Nilai GC yang terlalu rendah dapat menyebabkan ikatan primer menjadi kurang stabil, sedangkan nilai yang terlalu tinggi dapat meningkatkan risiko terbentuknya struktur sekunder seperti hairpin atau dimer primer, yang dapat mengganggu efisiensi amplifikasi. Penempelan primer serta panjang *amplicon* dapat dilihat pada **Tabel IV. 2**.

Tabel IV.2 Spesifikasi Primer *Forward* dan *Reverse* Gen *cyt b* Babi

	<i>Sekuens (5'>3')</i>	Basa	Tm (°C)	%GC
Primer Forward	5'-CTTGCAAATCCTAACAGGCCTG-3'	22	59,83	50,00
DNA Template	15467.....15488			
Primer Reverse	3'-CGTTTGCATGTAGATAGCGAATAAC-5'	25	58,93	40,00
DNA Template	15597.....15573			
Panjang produk PCR	131 bp			

Primer spesifik yang digunakan untuk deteksi DNA babi dalam penelitian ini sebelumnya telah digunakan oleh Baifin (2023) dan Prasetyowati (2024), dengan urutan primer *forward*: 5'-CTT GCA AAT CCT AAC AGG CCT G-3' dan primer *reverse*: 5'-CGT TTG CAT GTA GAT AGC GAA TAA C-3' [83]. Berdasarkan data pada **Tabel IV.2**, primer *forward* menempel pada posisi 15467-15488 bp, sedangkan primer *reverse* menempel secara antiparalel pada posisi 15597-15573 bp dari urutan DNA mitokondria. Segmen DNA yang menjadi target amplifikasi berada pada rentang posisi 15489-15572, sehingga menghasilkan produk amplifikasi berukuran 131 bp [84]. Amplifikasi dilakukan menggunakan metode PCR konvensional, dan hasilnya divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa 2%, yang menunjukkan pita DNA tunggal pada posisi yang sesuai dengan ukuran produk target. Gen *cyt b* dipilih karena sifatnya yang konservatif dalam suatu spesies namun memiliki perbedaan sekuen yang khas antarspesies, sehingga memungkinkan penggunaan primer yang spesifik untuk identifikasi DNA babi (*Sus scrofa*) dalam sampel pangan. Hal ini menjadikan gen *cyt b* sebagai marker molekuler yang baik dalam deteksi autentikasi produk makanan yang mengandung unsur babi [85].

Penentuan gradien suhu *annealing* untuk primer gen *cyt b* spesifik babi pada penelitian ini dilakukan pada rentang suhu 54, 55, 57, 59, dan 60°C. Pemilihan rentang ini didasarkan pada hasil penelitian terdahulu. Baifin (2023), dan Almira (2023), mendapatkan suhu *annealing* yang optimal untuk primer *cyt b* spesifik babi pada suhu 60°C [83][86]. Sedangkan Prasetyowati dalam penelitiannya mendapatkan suhu *annealing* yang optimal pada suhu 58°C [87]. Berdasarkan

variasi suhu optimum yang didapatkan oleh berbagai studi tersebut serta hasil estimasi suhu teoritis berdasarkan komposisi basa dan kandungan GC primer, maka ditetapkan rentang suhu gradien 54-60°C untuk mengidentifikasi suhu *annealing* yang paling efisien dan spesifik pada kondisi PCR yang digunakan dalam penelitian ini. Gradien suhu pada mesin PCR bekerja dengan cara membagi blok termal menjadi beberapa zona suhu berbeda dalam satu siklus reaksi, sehingga memungkinkan evaluasi stimulan terhadap hasil amplifikasi pada berbagai suhu. Penentuan suhu *annealing* yang tepat sangat krusial karena suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan misspriming atau non-spesifik binding, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menghambat penempelan primer dan menurunkan efisiensi amplifikasi [80]. Oleh karena itu, penggunaan gradien suhu merupakan strategi penting untuk mengoptimalkan kondisi PCR dan memastikan bahwa primer bekerja secara spesifik terhadap DNA target.

Selain digunakan primer *cyt b*, pada penelitian ini juga digunakan primer *atp8* sapi yang terdapat dalam mitokondria sapi (*Bos indicus*), untuk memastikan bahwa sampel bakso sapi yang dianalisis terbuat dari daging sapi. Spesifikasi primer *atp8* sapi yang digunakan dalam penelitian ini, dapat dilihat pada **Tabel IV.3**.

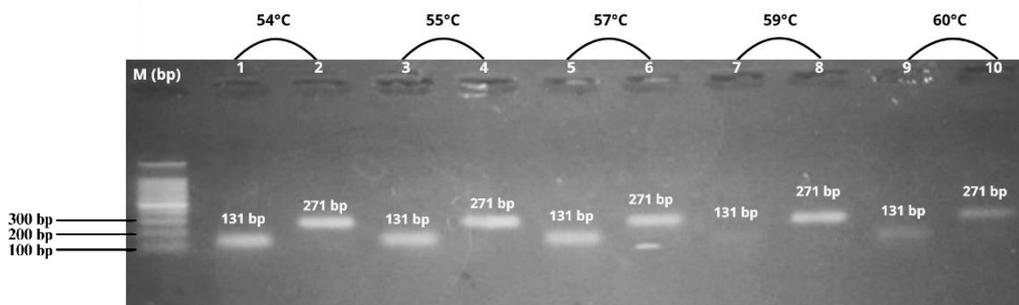
Tabel IV.3 Spesifikasi Primer *Forward* dan *Reverse* Gen *atp8* Sapi

	<i>Sekuens (5'>3')</i>	Basa	Tm (°C)	%GC
Primer Forward	5'-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3'	23	59,61	47,78
DNA Template	8108.....8130			
Primer Reverse	3'-GTAGGCTTGGAATAGTACGA-5'	21	56,63	47,52
DNA Template	8378.....8358			
Panjang produk PCR	271 bp			

Primer spesifik untuk sapi pada **Tabel IV.3** sebelumnya juga telah digunakan oleh Prasetyowati (2024), dalam penelitiannya untuk menganalisis cemaran daging babi pada produk kornet. Primer tersebut terdiri atas primer forward dengan urutan 5'-GCC ATA TAC TCT CCT TGG TGA CA-3' dan primer reverse dengan urutan 3'-GTA GGC TTG GGA ATA GTA CGA-5' [87]. Berdasarkan hasil analisis

menggunakan fitur *Primer-Blast* pada situs web NCBI, diketahui bahwa primer forward menempel pada posisi basa 8108 hingga 8130 dalam gen tRNA lys, sedangkan primer reverse menempel pada posisi 8378 hingga 8358 dalam gen *atp8*. Fragmen genetik yang diamplifikasi terletak antara posisi basa 8131 hingga 8357 dengan panjang 271 pasangan basa [84]. Gen *atp8* dipilih sebagai target amplifikasi dalam metode PCR untuk identifikasi kehalalan produk pangan dan deteksi keberadaan DNA sapi, karena gen ini memiliki urutan spesifik dalam mitokondria sapi (*Bos indicus*). Selain itu, pada beberapa penelitian, primer ini juga dapat digunakan secara spesifik untuk mendeteksi mutasi genetik yang berkaitan dengan penyakit tertentu [88].

Pemilihan rentang suhu gradien untuk PCR dengan primer *atp8* pada sampel daging sapi didasarkan pada perhitungan suhu *annealing* yang merujuk pada nilai *melting temperature* (T_m) dari primer, serta mempertimbangkan referensi dari penelitian terdahulu. Umumnya, suhu *annealing* ditetapkan dalam kisaran $\pm 5^\circ\text{C}$ dari suhu T_m primer [88]. Prasetyowati (2024) telah melakukan optimasi suhu *annealing* PCR pada berbagai jenis daging dan primer, termasuk gen *atp8* untuk spesies *bovine* (sapi), dengan hasil optimasi pada suhu 58°C [87]. Sementara itu, Setyawati (2021) dalam penelitiannya menggunakan primer *atp8*, menjelaskan bahwa hasil optimasi *annealing* pada primer *atp8* tersebut berada pada suhu 58°C [89]. Untuk memperluas kemungkinan suhu *annealing* yang sesuai dengan kondisi penyimpanan primer yang sudah cukup lama, maka variasi dalam rentang gradien optimasi suhu *annealing* untuk primer *atp8* dilakukan pada suhu 54, 55, 57, 59, 60°C . Hasil amplifikasi kedua primer dapat dilihat pada **Gambar IV. 4**.



Gambar IV. 4 Elektroferogram Hasil Optimasi Suhu *Annealing* Primer Babi dan Primer Sapi

Keterangan:

DNA babi = Sumur 1,3,5,7, dan 9

DNA sapi = Sumur 2,4,6,8, dan 10

Berdasarkan hasil optimasi suhu *annealing* primer babi dan primer sapi pada **Gambar IV.4** diperoleh hasil optimasi suhu *annealing* berada pada suhu 54°C, yang ditandai dengan terbentuknya pita tebal dengan ukuran 131 bp pada primer babi dan 271 bp pada primer sapi dengan suhu 54°C. Hasil optimasi pada **Gambar IV.4** dapat dilihat pada **Tabel IV.4**.

Tabel IV.4 Hasil Optimasi Suhu *Annealing* Primer *cyt b* Babi dan *atp8* Sapi

Kode Sampel	Suhu (°C)	Teramplifikasi	Ukuran Pita DNA (bp)	Ketebalan Pita
1	54	√	131	Tebal
2	54	√	271	Tebal
3	55	√	131	Tebal
4	55	√	271	Tebal
5	57	√	131	Tebal
6	57	√	271	Tebal
7	59	√	131	Sangat tipis
8	59	√	271	Tebal
9	60	√	131	Tipis
10	60	√	271	Tipis

Berdasarkan **Tabel IV.4**, dapat dilihat bahwa peningkatan suhu optimasi menyebabkan pita yang dihasilkan semakin tipis, baik pada primer babi maupun primer sapi. Hal tersebut menandakan bahwa suhu yang terlalu tinggi kurang sesuai untuk kedua primer tersebut, karena dapat menghambat proses amplifikasi akibat menurunnya spesifisitas primer pada DNA *template* [90].

Proses optimasi suhu *annealing* serta amplifikasi DNA pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode PCR, yang terdiri atas tiga tahapan utama, yaitu denaturasi, *annealing*, dan ekstensi yang dilakukan pada suhu tertentu. Pemilihan suhu dalam proses PCR sangat krusial karena mempengaruhi aktivitas enzim DNA polimerase selama tahap pemanjangan. Suhu yang terlalu tinggi, terutama pada fase denaturasi dan ekstensi, dapat menurunkan aktivitas enzim DNA polimerase atau bahkan menonaktifkannya, sehingga menyebabkan kegagalan amplifikasi atau hasil yang tidak optimal [91].

Tahap denaturasi berfungsi untuk memisahkan untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal melalui pemutusan ikatan hidrogen antar basa nitrogen. Sebelum

tahap denaturasi, dilakukan tahap pra-denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit untuk pemisahan untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal. Selanjutnya, tahap denaturasi dilakukan pada suhu 95°C selama 30 detik untuk memastikan pemisahan seluruh untai ganda DNA menjadi untai tunggal, serta mempertahankan kondisi untai tunggal selama siklus PCR berlangsung. Tahap pra denaturasi membutuhkan waktu yang lebih lama karena DNA tersusun atas banyaknya ikatan hidrogen [92]. Tahap amplifikasi kemudian dilanjutkan dengan proses *annealing* pada suhu optimal primer, yaitu 54°C selama 30 detik. Waktu *annealing* yang digunakan umumnya berada dalam rentang 30-45 detik. Namun, penentuan waktu *annealing* juga disesuaikan dengan karakteristik primer yang digunakan, terutama panjang dan komposisi nukleotidnya, agar perlekatan primer terhadap DNA *template* dapat menempel dengan baik [93]. Tahap terakhir pada amplifikasi DNA yaitu *exstension* yang dibantu oleh enzim *Taq polymerase* yang akan memperpanjang untai DNA dari ujung 3'. Tahapan ekstensi pada penelitian ini dilakukan pada suhu 72°C, karena suhu tersebut merupakan suhu optimum enzim *Taq polymerase* yang digunakan dalam proses amplifikasi, sedangkan waktu ekstensi yang digunakan dalam penelitian ini selama 1 menit yang dilanjutkan dengan *final exstension* selama 10 menit pada suhu 72°C untuk memastikan semua produk PCR terbentuk untai ganda [94]. Secara umum, waktu yang diperlukan setiap satu kilo basa DNA untu amplifikasi berada pada kisaran 30-60 detik [91]. Proses amplifikasi pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 35 siklus PCR, sehingga dihasilkan molekul-molekul DNA rantai ganda baru dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA *template* yang digunakan.

Jumlah siklus ini berperan penting dalam menentukan spesifisitas produk amplifikasi yang dihasilkan. Fairbanks dan Andersen (1999) dalam kutipan oleh Ismaun, dkk. (2021) menyatakan bahwa jumlah siklus dalam reaksi PCR mempengaruhi tingkat spesifisitas hasil amplifikasi, dengan rentang optimal berada antara 25-45 siklus. Penggunaan siklus yang melebihi batas optimal dapat menurunkan efisiensi kerja primer, dNTP, serta enzim *Taq polimerase*, yang pada akhirnya berpotensi menghasilkan amplifikasi yang tidak spesifik [95].

Dalam penelitian ini, digunakan kit PCR dari *Thermo Fisher Scientific*, yaitu DreamTaq PCR Master Mix (2X) yang mengandung beberapa komponen utama,

antara lain DreamTaq DNA Polymerase, DreamTaq buffer 2X, dNTPs, 4 mM MgCl₂, serta *nuclease-free water*. DreamTaq DNA Polymerase merupakan enzim polimerase yang bersifat thermostabil, diisolasi dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Enzim ini berperan dalam mengkatalisis sintesis DNA dari arah 5' ke 3', sehingga memungkinkan reaksi amplifikasi berlangsung secara efisien serta mampu menjaga stabilitas DNA terhadap perubahan suhu selama proses PCR.

Komponen DreamTaq buffer 2X dan ion Mg²⁺ (MgCl₂) berfungsi untuk menciptakan kondisi kimiawi yang optimal untuk aktivitas enzim DNA polimerase. Konsentrasi MgCl₂ perlu dikontrol dengan baik, karena kadar yang terlalu rendah dapat menyebabkan efisiensi amplifikasi menurun, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menghambat proses penempelan primer ke DNA template, sehingga menurunkan spesifisitas hasil PCR. Sedangkan komponen dNTPs terdiri dari campuran dATP, dTTP, dCTP, dGTP, yang masing-masing berfungsi sebagai bahan baku untuk sintesis rantai DNA baru selama reaksi berlangsung. Sementara itu, *nuclease-free water* digunakan sebagai pelarut bebas kontaminasi enzim nuklease, yang berguna untuk mengencerkan reagen PCR serta menjaga kemurnian reaksi [96].

Pada penelitian ini digunakan kontrol positif dan kontrol negatif berupa sampel daging babi dan sapi. Penggunaan kontrol positif bertujuan untuk memastikan bahwa sistem amplifikasi PCR bekerja secara optimal dan dapat mendeteksi DNA target dengan tepat, serta membantu mengidentifikasi kemungkinan gangguan seperti keberadaan inhibitor. Sementara itu, kontrol negatif digunakan untuk memverifikasi bahwa tidak terjadi kontaminasi silang selama proses preparasi atau amplifikasi, sehingga dapat mencegah munculnya hasil positif palsu yang dapat menurunkan validitas data.

4.4 Identifikasi Kandungan DNA Babi pada Bakso Sapi Menggunakan Elektroforesis Gel Agarosa

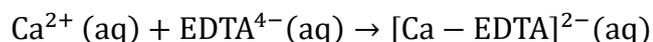
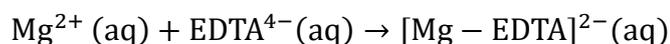
Analisis produk PCR dapat dilakukan menggunakan teknik elektroforesis menggunakan gel agarosa, yang kemudian divisualisasikan di bawah sinar ultraviolet (UV). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Baifin (2023) dan Prasetyowati (2024), amplifikasi gen target *cyt b* dari DNA babi menghasilkan pita

DNA berukuran sekitar 131 bp, sedangkan amplifikasi gen target *atp8* dari DNA sapi menghasilkan produk PCR dengan ukuran sekitar 271 [83], [87].

Prinsip dasar elektroforesis gel agarosa didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan listrik melalui medium semisolid (gel) di bawah pengaruh medan listrik. Dalam hal ini, molekul DNA yang bermuatan negatif akibat keberadaan gugus fosfat, yang akan bergerak menuju elektroda bermuatan positif. Ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dapat diestimasi dengan membandingkan jarak migrasi pita DNA terhadap DNA marker (penanda molekuler) dengan ukuran yang telah diketahui sebelumnya. Selain gel agarosa, gel poliakrilamida juga dapat digunakan sebagai medium pemisahan, terutama untuk resolusi tinggi pada fragmen DNA berukuran kecil. Namun demikian, gel agarosa lebih umum digunakan untuk memisahkan DNA dengan rentang ukuran dari puluhan hingga jutaan pasangan basa [97].

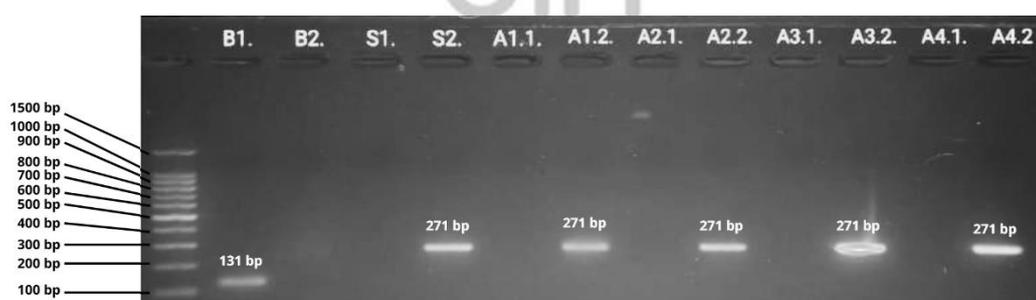
Dalam penelitian ini digunakan gel agarosa dengan konsentrasi 2% yang dilarutkan dalam buffer TAE (Tris-asetat-EDTA) 1X. Pemilihan konsentrasi gel agarosa 2% karena konsentrasi tersebut efektif dalam pemisahan fragmen DNA dalam rentang ukuran 100-2000 bp. Hal tersebut sesuai dengan DNA target, dimana DNA babi memiliki ukuran 131 bp dan DNA sapi memiliki ukuran 271 pb. Pemilihan konsentrasi gel agarosa sangat penting, karena dapat mempengaruhi hasil akhir elektroforesis, konsentrasi gel agarosa yang terlalu tinggi memiliki pori-pori yang lebih kecil, sedangkan konsentrasi gel agarosa yang terlalu rendah akan mudah sobek, sehingga hasil elektroforesis tidak efektif [64]. Adapun larutan elektrolit yang digunakan dalam penelitian ini adalah buffer TAE 1X. Buffer TAE merupakan larutan penyangga yang memiliki fungsi utama dalam menjaga kestabilan pH selama proses elektroforesis, sekaligus berperan sebagai medium penghantar arus listrik yang diperlukan untuk memfasilitasi migrasi molekul DNA di dalam gel agarosa. Komponen EDTA dalam buffer ini berfungsi sebagai agen pengkelat yang mampu mengikat ion divalen seperti Mg^{2+} dan Ca^{2+} , yang dikenal sebagai kofaktor penting bagi aktivitas enzim deoksiribonuklease (DNase). Dengan demikian, keberadaan EDTA dalam sistem reaksi dapat mencegah degradasi DNA oleh enzim tersebut, menjaga integritas molekul DNA selama proses berlangsung

[98]. Reaksi pengkelatan yang terjadi pada ion Mg^{2+} dan Ca^{2+} adalah sebagai berikut.



Sebelum gel di cetak, ditambahkan *flourosence dye* SYBR *safe* yang berfungsi sebagai molekul interkalator. *Flourosence dye* SYBR *safe* bekerja dengan cara menyisipkan diri di antara pasangan basa nitrogen DNA, sehingga memungkinkan visualisasi pita DNA secara efektif ketika gel disinari menggunakan sinar ultraviolet (UV) [99].

Sebelum sampel DNA dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa untuk proses elektroforesis, terlebih dahulu ditambahkan loading buffer (*loading dye*). Penambahan *loading dye* bertujuan untuk meningkatkan densitas larutan DNA, sehingga sampel dapat dengan mudah tenggelam dan tetap berada di dasar sumur selama proses elektroforesis berlangsung. Selain itu, *loading dye* juga berfungsi sebagai pewarna yang dapat memdahkan DNA untuk masuk ke dalam sumuran gel agarosa, serta karena adanya kandungan *bromophenol blue* dan juga *xylene cyanol*, maka *loading dye* dapat digunakan sebagai penanda migrasi DNA [100]. Hasil visualisasi produk PCR menggunakan elektroforesis gel agarosa dalam penelitian ini dapat dilihat pada **Gambar IV.5**.



Gambar IV. 5 Elektroferogram Produk PCR dengan Primer Spesifik *cyt b* babi dan *atp8* Sapi

Hasil identifikasi kandungan DNA babi pada keempat sampel bakso sapi dengan primer *cyt b* babi dan primer *atp8* sapi menggunakan metode PCR berdasarkan **Gambar IV.5** di atas diperoleh hasil negatif pada keempat sampel bakso sapi. Dimana hasil visualisasi elektroforesis menggunakan sinar UV menunjukkan bahwa pada pola pita yang diperoleh tidak ditemukan keberadaan pita

dengan ukuran 131 bp pada kontrol negatif maupun pada sampel bakso yang diuji. Hasil identifikasi kandungan DNA babi pada sampel bakso sapi berdasarkan **Gambar IV.5** dapat dilihat pada **Tabel IV.5**.

Tabel IV.5 Karakteristik Produk PCR pada Kondisi Optimum

Kode Sampel	Teramplifikasi	Ukuran Pita DNA (bp)	Ketebalan Pita
B1	√	131	Tebal
B2	-	-	-
S1	-	-	-
S2	√	271	Tebal
A1.1	-	-	-
A1.2	√	271	Tebal
A2.1	-	-	-
A2.2	√	271	Tebal
A3.1	-	-	-
A3.2	√	271	Tebal
A4.1	-	-	-
A4.2	√	271	Tebal

Keterangan:

B = Daging Babi

S = Daging sapi

A1 = Sampel Bakso 1

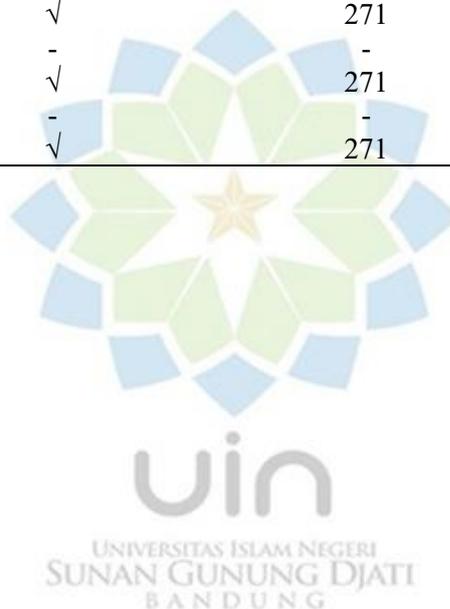
A2 = Sampel Bakso 2

A3 = Sampel Bakso 3

A4 = Sampel Bakso 4

1 = Primer babi

2 = Primer sapi



Berdasarkan **Tabel IV.5** dapat dilihat bahwa tidak terdeteksi keberadaan DNA babi dalam sampel keempat sampel bakso. Selain itu, berdasarkan **Tabel IV.5** diperoleh pola pita berukuran 271 bp pada kontrol negatif berupa daging sapi (S2) serta keempat sampel bakso sapi yaitu (A1.2, A2.2, A3.2, dan A4.2), yang mengindikasikan bahwa kontrol negatif dan keempat sampel bakso sapi tersebut memiliki kandungan daging sapi. Hal tersebut menunjukkan bahwa keempat sampel bakso sapi aman untuk dikonsumsi oleh masyarakat, baik muslim maupun non-muslim. Namun, berdasarkan hasil visualisasi pada **Gambar IV.5** tersebut hasil pita DNA pada sampel A1.2 diperoleh pita yang lebih tipis jika dibandingkan dengan

A.2.2, A3.2 dan A4.2. Hal tersebut terjadi karena adanya sedikit kontaminasi protein atau polisakarida pada sampel A1.2 tersebut [74]. Terjadinya kontaminasi tersebut dimungkinkan berasal dari kandungan sampel bakso A1 yang mengandung banyak protein dari daging sapi yang digunakan, serta mengandung banyak tepung yang memiliki kandungan polisakarida tinggi.



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dengan judul “Deteksi Kandungan DNA Babi (*Sus scrofa*) pada Sampel Bakso Sapi menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)” dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi dari seluruh sampel berada dalam rentang 548,1-895,6 ng/ μ L, dengan rasio kemurnian antara 1,79-2,03 yang menunjukkan bahwa isolat DNA berada pada tingkat kemurnian yang baik dan layak untuk dianalisis lebih lanjut dengan PCR.
2. Suhu *annealing* optimum primer *cyt b* babi dan primer *atp8* sapi berada pada suhu 54°C.
3. Berdasarkan hasil amplifikasi amplifikasi pita gen *cyt b*, sampel bakso sapi yang beredar di beberapa tempat di Kota Bandung, yaitu sampel bakso sapi A1, A2, A3, dan A4 tidak mengandung daging babi dan dapat dipastikan mengandung daging sapi, yang dibuktikan dengan tidak munculnya pita berukuran 131 bp pada sampel bakso, dan hanya muncul pita 271 bp pada setiap sampel yang divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa.

5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya, disarankan untuk dilakukan identifikasi kandungan DNA babi pada olahan daging sapi selain bakso sapi dengan primer selain *cyt b* babi dan *atp8* sapi, seperti pada daerah *cyt c* atau *atp6* dan menggunakan metode ekstraksi yang berbeda dengan reagen selain GENEzol™. Selain itu, disarankan pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan identifikasi kandungan DNA lain seperti tikus pada sampel bakso sapi dengan primer yang cocok untuk DNA target.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Z. Zilhadia, C. Adhiyanto, A. Gustida, dan N. Khairunnisa, “Analisis Cemaran Daging Babi pada Bakso Sapi yang Dijual di Tanjung Priok menggunakan Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR),” *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, vol. 7, no. 1, hlm. 83, Mei 2020, doi: 10.25077/jsfk.7.1.83-91.2020.
- [2] B. P. Statistik, “Peternakan Dalam Angka,” *BPS*, vol. 9, 2023.
- [3] PIHPS Nasional, “Tabel Harga Berdasarkan Komoditas Pusat Informasi Harga Pangan Strategis Nasional Accessed.”
- [4] A. Juningtyas, D. Prasetyo, dan H. Niza, “Identifikasi Gen Porcine Pada Sosis di Pulau Rimau Dengan Menggunakan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR),” 2022.
- [5] T. Susilowati, “Deteksi Kontaminan DNA Babi Pada Sampel Penggilingan Daging di Pasar Surya Kota Surabaya Menggunakan Real-Time Polymerase Chain Reaction Skripsi,” 2019.
- [6] R. Ummami, D. Ramandani, C. M. Airin, A. Husni, dan P. Astuti, “Uji Kualitas dan Uji Cemaran Daging Babi Pada Daging Sapi di Beberapa Pasar Tradisional di Yogyakarta,” *Jurnal Ilmu Peternakan dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*, vol. 12, no. 2, Jul 2022, doi: 10.46549/jipvet.v12i2.277.
- [7] Zulham, “Justifikasi Interferensi Negara Atas Kelembagaan Sertifikasi Halal Terhadap Massive and Credential Products,” 2018. [Daring]. Tersedia pada: <https://scholarhub.ui.ac.id/jils> Available at: <https://scholarhub.ui.ac.id/jils/vol1/iss1/7>
- [8] Agung D.R.S, “Persepsi Peternakan Muslim dan Analisis Saddu Az-Zari`ah Tentang Keharaman Membantu Orang Mengonsumsi Babi” *Jurnal Al-Hakim*, vol. 4, no. 2, 2022, doi: <http://dx.doi.org/10.22515/jurnalalhakim.v4i2.5606>

- [9] R. Anugrah, U. Jenderal, dan A. Yani, "Pengawasan Kehalalan Daging Sapi dan Produk Olahannya, di Sektor Usaha Kecil dan Mikro," 2014. [Daring] diakses pada November 2024 pukul 14.15. Tersedia pada: <https://www.researchgate.net/publication/282249912>
- [10] I. G. A. I. G. Elsyaningrat, K. J. P. Pinatih, N. N. D. Fatmawati, dan A. E. Darwinata, "Prevalensi cemaran patogen Salmonella pada daging babi yang dijual di Pasar Tradisional di Kota Denpasar," *Intisari Sains Medis*, vol. 13, no. 2, hlm. 328–334, Jan 2022, doi: 10.15562/ism.v13i2.1381.
- [11] Maiyena Sri dan Elvy Rahmi Mawarnis, "Kajian Analisis Konsumsi Daging Sapi dan Daging Babi Ditinjau dari Kesehatan," *Jurnal Pendidikan Tambusai*, 2022.
- [12] A. Jauharotus Syukriya dan H. D. Faridah, "Kajian Ilmiah dan Teknologi Sebab Larangan Suatu Makanan Dalam Syariat Islam," 2019.
- [13] R. Akbar dkk., "Analisis Potensi Daya Tarik Kota Wisata Kuliner Sudirman Street Bandung," vol. 2, no. 1, 2023.
- [14] S. N. Hibaturrahman, F. Kusnandar, N. D. Yuliana, dan H. Heryani, "Sensitivitas Real-Time Polymerase Chain Reaction dengan Primer Tanabe dalam Mendeteksi Gelatin Babi pada Confectionery," *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, vol. 34, no. 1, hlm. 119–128, Jun 2023, doi: 10.6066/jtip.2023.34.1.119.
- [15] F. S. Nurruyda dkk., "Deteksi Kontaminasi Babi pada Olahan Daging dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)."
- [16] I. Hilir, F. Nugraha, D. Indriyani Roslim, Y. Putri Ardilla, dan D. Mei, "Analisis Sebagian Sekuen Gen Ferritin2 pada Padi (*Oryza sativa* L.) Analysis of Partial Gene Sequence Ferritin2 on Rice Plants (*Oryza sativa* L.) Indragiri Hilir, Riau," 2014, doi: 10.15294/biosaintifika.v6i2.3102.
- [17] D. K. Eling Sasmito, R. Kurniawan, dan I. Muhimmah, "Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review," 2014.

- [18] H. Saraswati, F. Dwi Wahyuni, P. Bioteknologi, F. Ilmu-ilmu Kesehatan, dan U. Esa Unggul, “Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Gen cryIII dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal,” 2019. [Daring]. Tersedia pada: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt>
- [19] Adhiyanto Chris, Laifa Hendarmin, dan Rini Puspitaningrum, “Pengenalan Dasar Teknik Bio-Molekuler,” 2020.
- [20] S. Adi Subrata dkk., “PCR Primer Spesifik Berdasarkan Gen Cytochrome b untuk Deteksi Garangan (*Herpestes javanicus*) secara Molekuler,” 2020. [Daring]. Diakses pada 15 November pukul 08.20. Tersedia pada: <https://jurnal.ugm.ac.id/jikfkt>
- [21] S. Tanabe, M. Hase, T. Yano, M. Sato, T. Fujimura, dan H. Akiyama, “A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton, and Horseflesh in Foods,” *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 71, no. 12, hlm. 3131–3135, 2007, doi: 10.1271/bbb.70683.
- [22] I. Aprita, C. Anwar, R. Salima, J. Bandara Sultan Iskandar Muda Km, dan K. Aceh Besar, “Diversifikasi Pembuatan Bakso Daging Ayam dengan penambahan Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L),” 2020.
- [23] Desri Husain, Ellen J. Saleh, dan Agus Bahar Rachman, “Sifat Kimiawi dan Tekstur Bakso Ayam Dengan Bahan Pengisi *Deoscorea Hispida* Denst,” *Gorontalo Journal of Equatorial Animals*, 2022.
- [24] Badan Standardisasi Nasional, “Standar Nasional Indonesia (SNI 01-3818-2014) Bakso daging,” 2014, [Daring]. Diakses pada 15 November 2025 pukul 9.10. Tersedia pada: www.bsn.go.id
- [25] M. Ermanja, “7 Cara Membuat Bakso Sapi yang Kenyal dan Lezat,” *Global Solusi Ingredia*.
- [26] G. Pramuditya dkk., “Penentuan Atribut Mutu Tekstur Bakso Sebagai Syarat Tambahan Dalam SNI dan Pengaruh Lama Pemanasan Terhadap Tekstur Bakso,” 2014.

- [27] Anjalani, Ria, Andreano Simangunsong, dan Jose, “Kualitas Fisik-Kimia Bakso Dading Sapi dengan Penambahan Tepung Pisang,” vol. 48, hlm. 338–344, 2023.
- [28] F. K. Renwarin, N. C. Tiven, dan I. J. Liur, “Organoleptic Quality of Beef Meatballs Substituted with Tuna Fish Meat (Thunnus Sp),” 2022.
- [29] E. Nita, F. Karunia, dan A. Fauziyyah, “Pengaruh Substitusi Kulit Kentang (*Solanum tuberosum* L.) dalam Pembuatan Bakso Ayam Terhadap Mutu Kimia, Kandungan Zat Besi, dan Mutu Organoleptik,” *Jurnal Teknologi Teknologi Industri Pertanian*, vol. 17, no. 4, hlm. 951–963, 2023, doi: 10.21107/agrointek.v17i4.17060.
- [30] A. Hadi Prayitno dan G. Setyo Wibisono, “Physical Quality of Culled Duck Meatball Substituted with Edamame Flour Filler,” *JITRO (Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis)*, hlm. 1–2, 2020, doi: 10.33772/jitro.v9i2.21053.
- [31] C. Hetharia, Y. Loppies, dan H. Handu, “Sifat Organoleptik Bakso Pada Berbagai Rasio Perbandingan Daging Sapi Dan Babi,” 2021.
- [32] A. D. Pratiwi, L. Widajanti, dan A. Nugraheni, “Penerapan Sistem Jaminan Halal dan Kandungan Gizi Bakso Sapi Produksi Usaha Mikro di Pasar Rasamala Banyumanik Semarang Tahun 2019,” vol. 8, no. 1, 2020, [Daring]. Tersedia pada: <http://ejournal3.undip.ac.id/index.php/jkm>
- [33] A. Dhae, U. R. Lole, dan S. S. Niron, “Analaisis Kelayakan Finansial Usaha Ternak Babi di Kabupaten Nagekeo,” *Jurnal Nukleus Peternakan* , vol. 4, no. 2, hlm. 147–154, 2017.
- [34] Sriyani N. L. P dan A. A Oka, “Studi Kualitas Organoleptik Kulit Babi Guling dari Bahan Baku Babi Bali dan Bbai Landrace,” 2018.
- [35] Sri Rachma Aprilita Bugiwati, *Pengantar Ilmu Peternakan: “Domba, Kambing, Babi.”* Yogyakarta: Deepublish, 2017.
- [36] I. G. A. M. Sosiawan, K. K. Agustina, dan I. K. Suada, “Kualitas Daging Babi yang Diistirahatkan Sebelum Disembelih Lebih Baik dalam

- Konsistensi, Warna, pH, Daya Ikat Air dan Kadar Air,” *Indonesia Medicus Veterinus*, vol. 10, no. 4, hlm. 589–598, Jul 2021, doi: 10.19087/imv.2021.10.4.589.
- [37] F. N. Kurniasari, L. B. Harti, A. D. Ariestiningsih, S. O. Wardhani, dan S. Nugroho, *Buku Ajar Gizi dan Kanker*, Cetakan Pertam. Malang: Universitas Brawijaya Press, 2017.
- [38] A. F. Pulungan, *Dampak Pengawet Nitrit pada Daging Olahan Sosis Terhadap Kesehatan Manusia*, Pertama. Yogyakarta: Deepublish, 2019.
- [39] M. Muthiadin, I. R. Aziz, dan A. Z. Darajat, “DNA Mitokondria Untuk Identifikasi Ikan yang Kaya Spesies,” *Prosiding Seminar Nasional Megabiodiversitas Indonesia*, Feb 2018.
- [40] H. Martini dan J. F. Passos, “Cellular senescence: all roads lead to mitochondria,” 1 Maret 2023, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1111/febs.16361.
- [41] I. Nyoman Arsana, D. Ni, K. Ayu, dan A. Juliasih, “Karakteristik DNA Mitokondria,” vol. 14, no. 02, 2023.
- [42] A. J. Roger, S. A. Muñoz-Gómez, dan R. Kamikawa, “The Origin and Diversification of Mitochondria,” 6 November 2017, *Cell Press*. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.015.
- [43] C. Sylvester, M. S. Krishna, J. S. Rao, dan A. Chandrasekar, “Allele frequencies of mitochondrial DNA HVR III 514–524 (CA)_n dinucleotide repeats in the Urali Kuruman tribal population of South India,” *Egypt J Forensic Sci*, vol. 8, no. 1, Des 2018, doi: 10.1186/s41935-018-0083-5.
- [44] M. Munir dkk., “Detection of Pig DNA Fragments in Halal Unlabeled Lipstick Samples Using Conventional PCR,” *JURNAL BIOSAINS*, vol. 7, no. 1, hlm. 35, Mar 2021, doi: 10.24114/jbio.v7i1.23707.
- [45] D. Devi Astari, S. Gustiani Dewi, S. Setyaningrum, dan B. Lidya, “Perancangan Primer untuk Deteksi Kandungan Gen Cytochrome b Babi dengan Metode Polymerase Chain Reaction dan Aplikasinya pada Berbagai

- Produk Industri,” *Fullerene Journ. Of Chem*, vol. 6, no. 2, hlm. 110–117, 2021, doi: 10.37033/fjc.v6i2.329.
- [46] M. Usmany dan P. Kakisina, “Molecular Study of Cuscus (Family of Phalangeridae) in Lumoli Rural District Breeding Farm, Seram, Maluku Based by Gene Sequence of ATP 8,” *Jurnal Kajian Veteriner*, vol. 1, hlm. 12–46, 2019.
- [47] C. Panja, K. Niedzwiecka, E. Baranowska, J. Poznanski, dan R. Kucharczyk, “Analysis of MT-ATP8 gene variants reported in patients by modeling in silico and in yeast model organism,” *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, Des 2023, doi: 10.1038/s41598-023-36637-9.
- [48] S. Octa Handayani dan D. Hilda Putri, “Perbandingan Metode Fenol-Kloroform dan Mini-Prep CTAB Untuk Isolasi DNA Tanaman Cabai (*Capsicum annum L.*),” 2021.
- [49] T. Mayang Pratiwi Lio dan Sugireng, “Deteksi Gen Glukokinase pada Remaja di Pesisir Kota Kendari Sulawesi Tenggara,” ON LINE, 2019.
- [50] R. Sebayang, Y. Idawati, dan H. Sinaga, “Analisis Lactat Dehydrogenase dalam Serum Darah Menggunakan Sentrifugasi,” *Jurnal Keperawatan Silampari*, vol. 4, no. 1, hlm. 274–280, Des 2020, doi: 10.31539/jks.v4i1.1450.
- [51] S. Hariyadi, E. Narulita, dan A. Rais, “Perbandingan Metode Lisis Jaringan Hewan dalam Proses Isolasi DNA Genom pada Organ Liver Tikus Putih (*Rattus norvegicus*),” 2018.
- [52] W. Ruchi, D. Hilda Putri, A. Anhar, S. Alicia Farma, dan J. Biologi FMIPA Universitas Negeri Padang Jl Hamka Air Tawar Barat, “Comparison of Three Different DNA Isolation Methods To Degradate The Trichoderma Fungi Cell Wall,” *Bioscience*, vol. 2, no. 1, hlm. 50–59, 2018, [Daring]. Diakses pada 15 November 2025 pukul 13.10. Tersedia pada: <http://ejournal.unp.ac.id/index.php/bioscience>

- [53] J. Biologi dkk., “Isolasi DNA Tumbuhan Hasil Eksplorasi di Nusakambangan dengan Metode Kit di Laboratorium Treub, Kebun Raya Bogor,” 2021. [Daring]. Tersedia pada: <http://journal.uin-alauddin.ac.id/index.php/psb>
- [54] A. Syalwa Iskandar, D. Safitri, B. Lidya, dan S. Setyaningrum, “Penentuan Sensitivitas dan Spesifisitas Kit PRIME-CYTO untuk Deteksi Kandungan Babi dengan Metode Polymerase Chain Reaction,” 2023.
- [55] P. Desy Yustinadewi, P. S. Yustiantara, dan I. Narayani, “Variant Primer Design Techniques in Pediatric Patient Buffy Coat Samples With LLA,” no. 1, hlm. 105–111, 2018, [Daring]. Tersedia pada: <http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>
- [56] Herman, Nainggolan M, dan Roslim D.I, “Optimizing Temperature *Annealing* for Four Primary RAPD in Mungbean (*Vigna radiata* L.),” 2018.
- [57] R. N. Pranawaty dkk., “Aplikasi Polymerase Chain Reaction (PCR) Konvensional dan Real Time PCR Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus pada Kepiting,” *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, vol. 3, no. 4, hlm. 61–74, 2012.
- [58] F. Merdekawati dan B. Nurhayati, “Desain Primer Gen Pengkode RNA Dependent RNA Polimerase (RdRp) Untuk Deteksi Sars COV2 dengan Menggunakan Real Time Polymerase Chain Reaction,” *Riset Kesehatan Poltek Depkes Bandung*, vol. 15, no. 1, hlm. 30–36, Apr 2023, doi: 10.34011/juriskesbdg.v15i1.2179.
- [59] D. Bunga Purwakasih dan A. Achyar, “Primer Design and in Silico PCR for Detection Shigella Sp. on Refilled Water Samples Desain Primer dan PCR In Silico untuk Deteksi Shigella Sp. pada Sampel Air Minum Isi Ulang,” 2021. [Daring]. Tersedia pada: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [60] F. Yelli, I. Damayanti, dan M. V. Rini, “Optimasi Volume Buffer Ekstraksi Dalam Mengisolasi DNA Spesies Mikoriza Arbuskular Untuk Identifikasi Secara Molekular,” *Jurnal Agrotek Tropika*, vol. 10, no. 3, hlm. 381, Jul 2022, doi: 10.23960/jat.v10i3.4955.

- [61] K. Anam, W. Cahyadi, I. Azmi, K. Senjarini, dan R. Oktarianti, “Analisis Hasil Elektroforesis DNA dengan Image Processing Menggunakan Metode Gaussian Filter,” *IJEIS (Indonesian Journal of Electronics and Instrumentation Systems)*, vol. 11, no. 1, hlm. 37, Apr 2021, doi: 10.22146/ijeis.58268.
- [62] E. Badriyya dan A. Achyar, “Polymerase chain reaction (PCR) primer design to identify SNP rs7901695 transcription factor 7 like 2 (TCF7L2),” *Bioscience*, vol. 7, no. 1, hlm. 01, Mar 2023, doi: 10.24036/0202371122575-0-00.
- [63] Fahlevi M.R, Bakti D, dan Sitepu S.F, “Karakterisasi Molekuler *Elaeidobius kamerunicus* Faust. (Coleoptera: Curculionidae) Asal Sumatera Utara Menggunakan Metode Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP),” *Jurnal Agroekoteknologi FP USU*, vol. 5, no. 4, 2017.
- [64] P. Y. Lee, J. Costumbrado, C. Y. Hsu, dan Y. H. Kim, “Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 62, Apr 2012, doi: 10.3791/3923.
- [65] P. A. Dewanata dan M. Mushlih, “Differences in DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients,” *Indonesian Journal of Innovation Studies*, vol. 15, Jul 2021, doi: 10.21070/ijins.v15i.553.
- [66] A. Sophian dan Y. Yustina, “Analisis Nilai Kemurnian DNA Menggunakan Nano Fotometer pada Rasio 260/230 yang Diisolasi dari Produk Nugget,” *Muhammadiyah Journal of Nutrition and Food Science (MJNF)*, vol. 3, no. 2, hlm. 82, Jan 2023, doi: 10.24853/mjnf.3.2.82-86.
- [67] H. Ali, S. Jafar, dan Q.-A. Qurat-ul-Ain, “Optimized genomic DNA extraction by a modified organic phenol- chloroform method without using PCR for best results,” *Int J Res Med Sci*, hlm. 100–104, 2016, doi: 10.18203/2320-6012.ijrms20160012.

- [68] M. J. Honeywood dkk., “Use of guanidine thiocyanate-based nucleic acid extraction buffers to inactivate poliovirus in potentially infectious materials,” *J Virol Methods*, vol. 297, Nov 2021, doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114262.
- [69] S. Octa Handayani dan D. Hilda Putri, “Comparison of Fenol-Kloroform Method and Mini-Prep CTAB Method for Chili (*Capsicum annum* L.) Plant DNA Isolation Perbandingan Metode Fenol-Kloroform dan Mini-Prep CTAB Untuk Isolasi DNA Tanaman Cabai (*Capsicum annum* L.),” 2021.
- [70] A. Jain, R. Jain, dan S. Jain, “Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology Principles and Techniques.” [Daring]. Tersedia pada: <http://www.springer.com/series/8623>
- [71] K. Nugroho, R. T. Terryana, dan P. Lestari, “Metode Ekstraksi DNA Cabai (*Capsicum annum* L.) Menggunakan Modifikasi Buffer CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide) Tanpa Nitrogen Cair,” *Scripta Biologica*, vol. 4, no. 2, hlm. 91, Jun 2017, doi: 10.20884/1.sb.2017.4.2.423.
- [72] N. Triani, “Isolasi DNA Tanaman Jeruk Dengan Menggunakan Metode CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide),” *Jurnal Pemakalah Paralel*, vol. 3, no. 2, 2020.
- [73] A. Mollah, Muh. A. Ashan, dan A. H. Khatimah, “Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Porang (*Amorphophallus Muelleri* Blume) pada Beberapa Kawasan di Sulawesi Selatan,” *Jurnal Agritechno*, hlm. 1–7, Apr 2022, doi: 10.20956/at.v15i1.688.
- [74] E. Lisnaina, “Identification of Microbial Communities and Evaluation of the Effectiveness of Sanitary Materials on Crab Products in the Processing Industry,” 2024.
- [75] G. Koetsier, E. Cantor, dan E. Biolabs, “A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers,” 2021.

- [76] P. Dabrowski, M. Rasmus, A. Jundzill, T. Drewa, dan M. Pokrywczynska, "A comparison of five methods to maximize RNA and DNA isolation yield from adipose tissue," *PeerJ*, vol. 12, 2024, doi: 10.7717/peerj.17071.
- [77] Z. Piskata, E. Servusova, V. Babak, M. Nesvadbova, dan G. Borilova, "The quality of DNA isolated from processed food and feed via different extraction procedures," *Molecules*, vol. 24, no. 6, 2019, doi: 10.3390/molecules24061188.
- [78] K. Nugroho, R. T. Terryana, dan P. Lestari, "Metode Ekstraksi DNA Cabai (*Capsicum annuum* L.) Menggunakan Modifikasi Buffer CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide) Tanpa Nitrogen Cair," *Scripta Biologica*, vol. 4, no. 2, hlm. 91, Jun 2017, doi: 10.20884/1.sb.2017.4.2.423.
- [79] S. Lora Aulia, R. A. Suwignyo, dan M. Hasmeda, "Optimasi Suhu *Annealing* untuk Amplifikasi DNA Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode Polymerase Chain Reaction," *Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, vol. 18, no. 1, 2021, doi: 10.31851/sainmatika.v18i1.5805.
- [80] N. Aulia dkk., "Desain Primer dan Optimasi Suhu *Annealing* untuk Amplifikasi Gen RET," 2023. [Daring]. Tersedia pada: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [81] T. Winarni Agustini, M. Suzery, A. Ni, matullah Al-Baarri, S. Rahmi Putri, dan dan Kurdianto, "Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sebagai Alat Deteksi DNA Babi dalam Beberapa Produk Non-Pangan," 2019.
- [82] N. Widya Firma, Z. Azizah, dan R. Asra, "Pork DNA Contamination in Pharmaceutical Products: A Review," *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, vol. 8, no. 5, hlm. 96–104, 2020, doi: 10.22270/ajprd.v8i5.846.
- [83] F. A. Baifin, *Analisis kandungan daging Babi pada sosis Sapi dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Bandung: UIN Sunan Gunung Djati Bandung, 2023.

- [84] “NCBI, ‘Primer Blast,’ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1726005367&job_key=gYtfAZDWnX66QJhFISW8d-8-rUXCLbZYww.”
- [85] A. N. Kurniah, R. Lindiawati Puspitasari, dan A. T. Perdana, “Detection Of Cytochrome b Pork in Packaged Meatball from Traditional Markets Around Jakarta,” 2020.
- [86] A. K. Almira, “Deteksi Kandungan DNA Babi dalam Produk Olahan Daging dengan Metode Real Time-Polymerase Chain Reaction,” *Jurnal Teknologi dan Mutu Pangan*, vol. 2, no. 1, hlm. 1, 2023, doi: <https://doi.org/10.30812/jtmp.v2i1.3068>.
- [87] P. M. Prasetyowati, “Analisis cemaran daging babi pada kornet sapi dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR),” Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati Bandung, Bandung, 2024.
- [88] R. B. Satiyarti, N. D. Sajati, dan R. Mulyani, “Identifikasi Mutasi DNA Daerah HV1 dan HV2 D-Loop Mitokondria dari Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2 (DMT2),” *Jurnal Kartika Kimia*, vol. 3, no. 1, Mei 2020, doi: 10.26874/jkk.v3i1.41.
- [89] R. Setyawati dan S. Zubaidah, “Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu *Annealing* dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR),” Online, 2021.
- [90] K. Huang dkk., “Exploring the Impact of Primer–Template Mismatches on PCR Performance of DNA Polymerases Varying in Proofreading Activity,” *Genes (Basel)*, vol. 15, no. 2, Feb 2024, doi: 10.3390/genes15020215.
- [91] T. C. Lorenz, “Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 63, Mei 2015, doi: 10.3791/3998.
- [92] A. Tantan dan Y. Sundara, “Optimasi Volume DNA Template dan Suhu Denaturasi untuk Deteksi *Brugia malayi* menggunakan Real Time PCR,” *Jurnal Riset Kesehatan Poltekes Bandung*, vol. 11, no. 2, 2020.

- [93] Novia Azahra Fatoni, Ai Djuminar, Acep Tantan Hardiana, dan Fusvita Merdekawati, “*Optimization off Annealing Temperature and Primer Concentration of Cytochrome b (cyt b) Gene for Pig DNA Detection with PCR Real-time Method,*” *Journal of Vocational Health Studies*, vol. 8, no. 3, hlm. 164–170, Mar 2025, doi: 10.20473/jvhs.V8.I3.2025.164-170.
- [94] Y. H. Park, M. R. Uzzaman, J. W. Park, S. W. Kim, J. H. Lee, dan K. S. Kim, “Detection of meat origin (Species) using polymerase chain reaction,” *Korean J Food Sci Anim Resour*, vol. 33, no. 6, hlm. 696–700, 2013, doi: 10.5851/kosfa.2013.33.6.696.
- [95] N. Hikmah, Muzuni, dan Ismaun, “Deteksi Molekuler Bakteri Escherichiacoli Sebagai Penyebab Penyakit Diare Dengan Menggunakan Teknik PCR.”
- [96] “Thermo Fischer Scientific, ‘Taq DNA Polymerase (recombinant),’” Diakses: 14 Juni 2025. [Daring]. Tersedia pada: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0012031_TaqDNAPolymerase_recombinant_5_UuL_10x500U_UG.pdf.
- [97] S. Sundari dan Bambang Priadi Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan Jl Sempur No, “Teknik Isolasi dan Elektroforesis DNA Ikan Tapah,” *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, vol. 17, no. 2, hlm. 87–90, 2019.
- [98] R. Kalendar, K. I. Ivanov, O. Samuilova, U. Kairov, dan A. A. Zamyatnin, “Isolation of High-Molecular-Weight DNA for Long-Read Sequencing Using a High-Salt Gel Electroelution Trap,” *Anal Chem*, vol. 95, no. 48, hlm. 17818–17825, Des 2023, doi: 10.1021/acs.analchem.3c03894.
- [99] K. Motohashi, “Development of highly sensitive and low-cost DNA agarose gel electrophoresis detection systems, and evaluation of non-mutagenic and loading dye-type DNA-staining reagents,” *PLoS One*, vol. 14, no. 9, Sep 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0222209.

- [100] Z. T. C. G. L. Y. Z. C. J. SW. Tuo LJ, “Proper Application of DNA Dyes in Agarose Gel Electrophoresis,” vol. 45, no. 19–20, hlm. 1796–1804, 2024.



LAMPIRAN A

PERHITUNGAN PEMBUATAN LARUTAN

A.1 Pembuatan Gel Agarosa 2%

$$\begin{aligned}\text{Massa} &= \text{Konsentrasi (\%)} \times \text{Volume (mL)} \\ &= 0,02 \times 45 \text{ mL} \\ &= 0,9 \text{ gram}\end{aligned}$$

A.2 Pengenceran Larutan Primer dari 100 μM menjadi 10 μM

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 100 \mu\text{M} \times V_1 &= 10 \mu\text{M} \times 50 \mu\text{L} \\ V_1 &= 5 \mu\text{L}\end{aligned}$$

A.3 Konsentrasi DNA

➤ Daging babi

$$\begin{aligned}[\text{DNA}] &= A_{260} \times fp \times 50 \mu\text{g/mL} \\ &= 0,9634 \times 20 \times 50 \mu\text{g/mL} \\ &= 963,4 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

➤ Daging sapi

$$\begin{aligned}[\text{DNA}] &= A_{260} \times fp \times 50 \mu\text{g/mL} \\ &= 1,2946 \times 20 \times 50 \mu\text{g/mL} \\ &= 1294,6 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

➤ Sampel 1

$$\begin{aligned}[\text{DNA}] &= A_{260} \times fp \times 50 \mu\text{g/mL} \\ &= 0,5443 \times 20 \times 50 \mu\text{g/mL} \\ &= 544,3 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

➤ Sampel 2

$$\begin{aligned}[\text{DNA}] &= A_{260} \times fp \times 50 \mu\text{g/mL} \\ &= 1,8439 \times 20 \times 50 \mu\text{g/mL} \\ &= 1843,9 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

➤ Sampel 3

$$\begin{aligned}[\text{DNA}] &= A_{260} \times fp \times 50 \mu\text{g/mL} \\ &= 2,3501 \times 20 \times 50 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

$$= 2350,1 \mu g/mL$$

- Sampel 4

$$\begin{aligned} [\text{DNA}] &= A_{260} \times fp \times 50 \mu g/mL \\ &= 2,0863 \times 20 \times 50 \mu g/mL \\ &= 2086,3 \mu g/mL \end{aligned}$$

A.4 Kemurnian DNA

- Daging babi

$$\begin{aligned} \text{Ratio} &= \frac{A_{260}}{A_{280}} \\ &= \frac{0,9634}{0,5218} \\ &= 1,85 \end{aligned}$$

- Daging sapi

$$\begin{aligned} \text{Ratio} &= \frac{A_{260}}{A_{280}} \\ &= \frac{1,2946}{0,6981} \\ &= 1,85 \end{aligned}$$

- Sampel 1

$$\begin{aligned} \text{Ratio} &= \frac{A_{260}}{A_{280}} \\ &= \frac{0,5443}{0,3039} \\ &= 1,79 \end{aligned}$$

- Sampel 2

$$\begin{aligned} \text{Ratio} &= \frac{A_{260}}{A_{280}} \\ &= \frac{1,8439}{0,9077} \\ &= 2,03 \end{aligned}$$

- Sampel 3

$$\begin{aligned} \text{Ratio} &= \frac{A_{260}}{A_{280}} \\ &= \frac{2,3501}{1,253} \end{aligned}$$



$$= 1,88$$

➤ Sampel 4

$$\begin{aligned} \text{Ratio} &= \frac{A_{260}}{A_{280}} \\ &= \frac{2,0863}{1,116} \\ &= 1,87 \end{aligned}$$

A.6 Perhitungan Perkiraan Optimasi Suhu *Annealing* Primer

Primer		Sequence	Produk	Basa	Tm	% GC	Self Dimer (kca/mol)	Hairpin (kca/mol)
Sapi	F	GCCATATACTCTCCTTGGTGACA	271	23	59.1	47	-3.91	-0.52
	R	GTAGGCTTGGGAATAGTACGA		21	56.63	47	-4.65	1.48
Babi	F	CTTGCAAATCCTAACAGGCCTG	131	22	61.67	50	-0.96	-0.38
	R	CGTTTGCATGTAGATAGCGAATAAC		25	62.12	40	-0.96	0.25

➤ Primer *atp 8* Sapi

$$Ta = 2^{\circ}\text{C} (A + G) + 4^{\circ}\text{C} (G + C)$$

$$\begin{aligned} \text{Primer forward} &= 2^{\circ}\text{C} (5 + 4) + 4^{\circ}\text{C} (4 + 7) \\ &= 62^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Primer reverse} &= 2^{\circ}\text{C} (6 + 8) + 4^{\circ}\text{C} (8 + 2) \\ &= 68^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata - rata} &= \frac{62^{\circ}\text{C} + 68^{\circ}\text{C}}{2} \\ &= 65^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

➤ Primer *cyt b* Babi

$$Ta = 2^{\circ}\text{C} (A + G) + 4^{\circ}\text{C} (G + C)$$

$$\begin{aligned} \text{Primer forward} &= 2^{\circ}\text{C} (6 + 5) + 4^{\circ}\text{C} (4 + 7) \\ &= 66^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

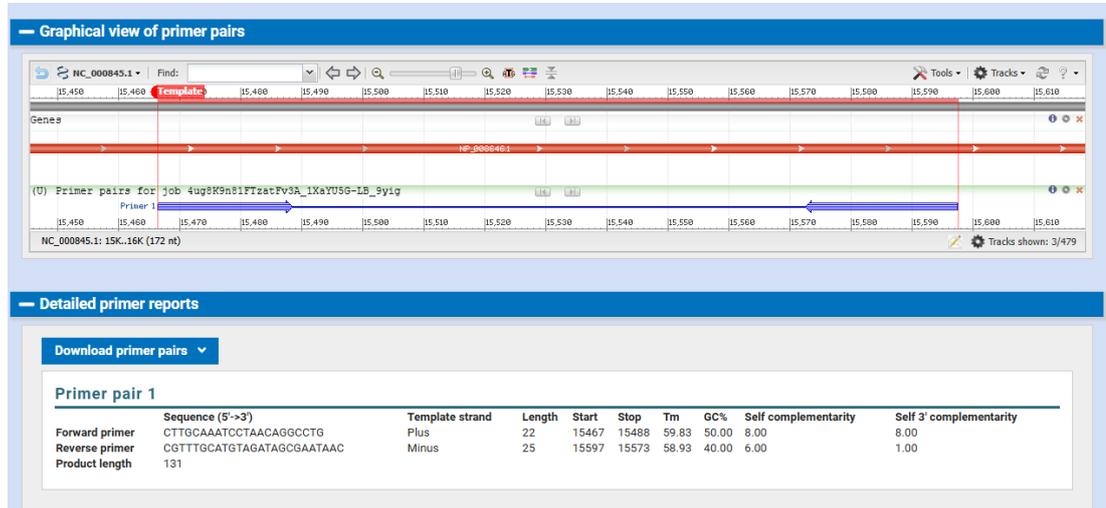
$$\begin{aligned} \text{Primer reverse} &= 2^{\circ}\text{C} (8 + 7) + 4^{\circ}\text{C} (6 + 4) \\ &= 70^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata - rata} &= \frac{66^{\circ}\text{C} + 70^{\circ}\text{C}}{2} \\ &= 68^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

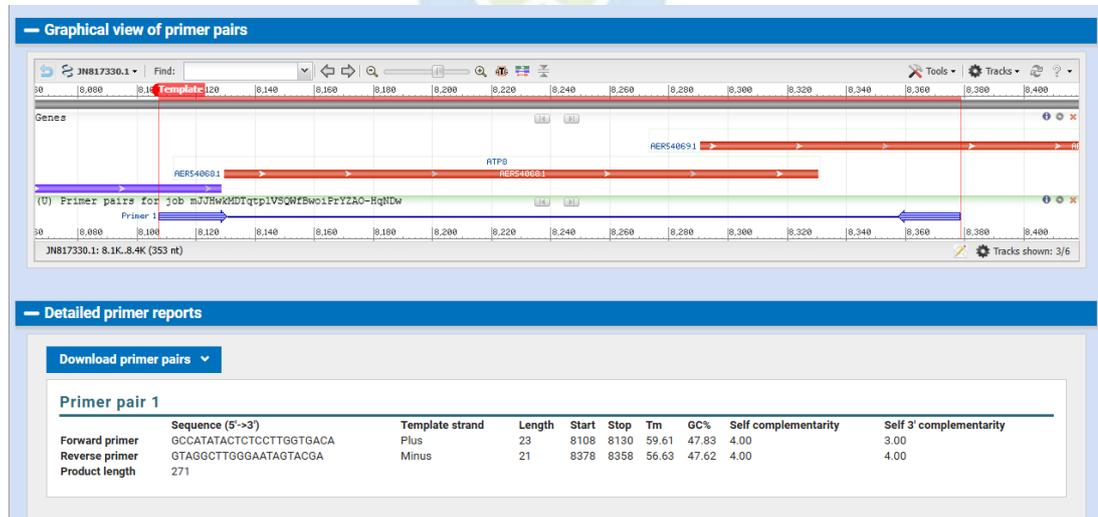
LAMPIRAN B

HASIL BLAST PRIMER *cyt b* BABI DAN *atp8* SAPI

B.1 Primer *cyt b* Babi



B.2 Primer *atp8* Sapi



LAMPIRAN C

DOKUMENTASI



Sampel bakso sapi A1



Sampel bakso sapi A2



Sampel bakso sapi A3



Sampel bakso sapi A4



Penimbangan sampel



Sampel setelah dihaluskan
ditambahkan reagen GENEZOLE™



Sampel setelah dihaluskan
ditambahkan reagen GENEZOLE™
dan dihomogenkan



Lisil sel



Presipitasi



Pencucian DNA



Isolat DNA hasil ekstraksi



Proses kuantifikasi DNA menggunakan spektrofotometer nanodrop



Proses amplifikasi DNA menggunakan PCR konvensional



Proses elektroforesis gel agarosa



Analisis hasil elektroforesis gel agarosa menggunakan UV-transiluminator