LIMIT OF DETECTION (*LOD*) FRAGMEN DNA PENGKODE GEN SITOKROM B (*cyt b*) BABI *(Sus scrofa)*

SKRIPSI

OLEH:

DITA UMI ROSIDAH LARASATI

H71214008

PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN SAINS
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL

SURABAYA
2018

LIMIT OF DETECTION (*LOD*) FRAGMEN DNA PENGKODE GEN SITOKROM B (*cyt b*) BABI *(Sus scrofa)*

Di ajukan untuk memenuhi syarat
Mendapatkan gelar Sarjana Sains (S.Si)

OLEH:

DITA UMI ROSIDAH LARASATI

H71214008

PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN SAINS
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL

SURABAYA
2018

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Dita Umi Rosidah Larasati

NIM : H71214008

Program Studi : Biologi

Angkatan : 2014

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul :

***LIMIT OF DETECTION* (LOD) FRAGMEN DNA PENGKODE GEN SITOKROM B *(cyt b)* BABI *(Sus scrofa)*.**

Apabila suatu saat nanti saya terbukti melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 2 agustus 2018

METERAI TEMPEL
C0344ADF380535739
6000
ENAM RIBU RUPIAH

Dita Umi Rosidah L.

***LIMIT OF DETECTION (LOD)* FRAGMEN DNA**
PENGKODE GEN SITOKROM B *(cyt b)*
BABI *(Sus scrofa)*

Disusun oleh:
Dita Umi Rosidah Larasati
H71214008

Telah Dipertahankan Di Depan Dewan Penguji
Pada Tanggal 17 Juli 2018
Dan Dinyatakan Telah Memenuhi Syarat
Untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Sains (S.Si)

Susunan Dewan Penguji

Surabaya, 31 JULI 2018
Pembimbing (Penguji) I

Yuanita Rachmawati ,M.Sc.
NUP. 201603302

Surabaya, 30 JULI 2018
Pembimbing (Penguji) II

Irul Hidayati, M.Kes.
NIP. 198102282014032001

Surabaya, 30 juli 2018
Penguji III

Estri Kusumawati, M.Kes.
NIP. 198708042014032003

Surabaya, 2 agustus 2018
Penguji IV

Dr.dr.Hj.Siti Nur Asiyah, M.Ag.
NIP. 197209271996032002

Mengetahui
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Ampel Surabaya

Dr. Eni Purwati, M.Ag
NIP. 196512211990022001

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Setelah memeriksa dan memberikan arahan terhadap skripsi yang ditulis oleh:

Nama :Dita Umi Rosidah Larasati

NIM : H71214008

Program Studi : Biologi

yang berjudul: **"*LIMIT OF DETECTION* (*LOD*) FRAGMEN DNA PENGKODE GEN SITOKROM B (*Cytb*) BABI *(Sus scrofa)*"**, tim pembimbing berpendapat bahwa skripsi tersebut dapat diajukan untuk disidangkan.

Surabaya, 5 juli 2017

Pembimbing I	Pembimbing II
Yuanita Rachmawati, M.Sc.	Irul Hidayati, M.kes.
NUP. 201603302	NIP.198102282014032001

KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN
Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : DITA UMI ROSIDAH LARASATI
NIM : H71214008
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI / BIOLOGI
E-mail address : ditameyme@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :
☑ Sekripsi ☐ Tesis ☐ Desertasi ☐ Lain-lain (.....)
yang berjudul :
LIMIT OF DETECTION (LOD) FRAGMEN DNA PENGKODE GEN SITOKROM B *(cyt b)* BABI *(Sus scrofa)*

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Ekslusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara ***fulltext*** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 1 Agustus 2018

Penulis

(DITA UMI ROSIDAH L)

LIMIT OF DETECTION* (LOD) FRAGMENT DNA CODE GENE SITOKROM B *(cyt b)* PORK *(Sus scrofa)

ABSTRACT

UIN Sunan Ampel Surabaya is an Islamic-based Education University by integrating science. UINSA has a halal center University which is already to be the center of halal testing. The laboratory is completed by using molecular biology technology. *Limit of Detection (LOD)* can be the basis in the detection of samples on foods suspected pork gene content. The purpose of this research was to determine the minimum concentration required in detecting DNA fragment encoding *cytochrome b* gene (*cyt b*) in pork by using PCR (Polymerase Chain Reaction). PCR was performed in : 98°C - 1 min; 95°C - 30 sec; 61°C - 30 sec; 72°C - 40 sec; 72°C - 3 min; 4°C - for storage. Concentrations used for testing are 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg. 10^{-1} pg, 10^{-2} pg, 10^{-3} pg, 10^{-4} pg, 10^{-5} pg, until 10^{-6} pg. The average value of DNA purity rasio is also obtained between 1.7-1.9. Therefore, the DNA obtained has a high purity level. In this research, *Limit of Detection* resulted at concentrations of 10^{-6} pg showed with the DNA *band* on coding *cyt b* gene pork as ± 149 bp. High sensitivity at concentrations of 10^{-6} pg produced in this research emerged a good laboratory specifications in UIN Sunan Ampel Surabaya to be used as a reference in detecting products which presume contaminated pork as testing halal food.

Keywords: *Limit of Detection*, DNA *cyt b* pork, PCR

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

LIMIT OF DETECTION* (LOD) FRAGMEN DNA PENGKODE GEN SITOKROM B *(cyt b)* BABI *(Sus scrofa)

ABSTRAK

UIN Sunan Ampel Surabaya merupakan Lembaga Pendidikan berbasis agama Islam dengan mengintegrasikan ilmu pengetahuan secara Ilmiah. UINSA telah memiliki halal center yang fungsinya dapat melakukan pengujian kehalalan makanan menggunakan teknologi Biologi molekular yang terus mengalami perkembangan dan kemajuan yang pesat. *Limit of Detection* (LOD) dapat menjadi dasar penentuan dalam melakukan deteksi sampel pada makanan yang diduga mengandung gen babi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi minimum yang diperlukan dalam mendeteksi fragmen DNA pengkode gen sitokrom b (cyt b) pada babi dengan menggunakan PCR *(Polymerase Chain Reaction).* Suhu yang digunakan antara lain: 98°C – 1 menit; 95°C – 30 detik; 61°C – 30 detik; 72°C – 40 detik; 72°C – 3 menit; 4°C – untuk penyimpanan. Beberapa Konsentrasi yang digunakan untuk pengujian adalah 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg. 10^{-1} pg, 10^{-2} pg, 10^{-3} pg, 10^{-4} pg, 10^{-5} pg, dan 10^{-6} pg. Hasil menunjukkan bahwa pada pada konsentrasi minimum 10^{-6} pg, band DNA masih muncul sebesar ±149 bp dengan divisualisasikan menggunakan elektroforesis. Nilai rata-rata kemurnian DNA juga diperoleh antara 1,7-1,9 sehingga DNA yang diperoleh memiliki tingkat kemurnian yang baik. Pada penelitian ini Nilai Limit of Detection ditentukan pada konsentrasi 10^{-6} pg dengan munculnya band DNA pengkode gen cyt b babi yaitu ±149 bp, sensitivitas yang tinggi pada konsentrasi 10^{-6} pg yang dihasilkan pada penelitian ini menunjukkan spesifikasi laboratorium yang baik di UIN Sunan Ampel Surabaya untuk dijadikan acuan dalam mendeteksi produk-produk yang diduga tercemar babi sebagai pengujian kehalalan makanan.

Kata kunci : *Limit of Detection*, DNA *cyt b* Babi, PCR

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
LEMBAR PENGESAHAN ii
PERNYATAAN KEASLIAN iii
KATA PENGANTAR iv
DAFTAR ISI vi
DAFTAR TABEL vii
DAFTAR GAMBAR viii
DAFTAR LAMPIRAN ix
ABSTRACT x
ABSTRAK xi
BAB I PENDAHULUAN 1
A. Latar Belakang 1
B. Rumusan Masalah 5
C. Tujuan Penelitian 6
D. Batasan Penelitian 6
E. Manfaat Penelitian 6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA 7
A. Klasifikasi Babi 7
B. Keharaman Babi 8
C. Gen Sitokrom b *(cyt b)* DNA Mitokondria 9
D. Isolasi DNA 12
E. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) 12
F. Elektroforesis 17
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN 19
A. Kerangka Konsep 19
B. Hipotesis Penelitian 20
BAB IV METODE PENELITIAN 21
A. Rancangan Penelitian 21
B. Waktu dan Lokasi Penelitian 21
C. Bahan dan Alat Penelitian 21
D. Variabel Penelitian 21
E. Prosedur Penelitian 21
F. Analisis Data 27
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN 29
A. Isolasi DNA 29
B. Amplifikasi Menggunakan *Polymerase Chain* 33
C. Elektroforesis 35
D. Visualisasi Hasil PCR 38
BAB VI PENUTUP 47
A. Simpulan 47
B. Saran 47
DAFTAR PUSTAKA 48
LAMPIRAN 53

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Anatomi Babi 9
Gambar 2.2 Genom Mitokondria 10
Gambar 3.1 Kerangka konsep 19
Gambar 5.1 Proses Elektroforesis 36
Gambar 5.2 Visualisasi DNA konsentrasi 1 ng/ml dan 10 ng/ml 38
Gambar 5.3 Visualisasi DNA konsentrasi 100 ng/ml dan 1 pg/ml. 39
Gambar 5.4 Visualisasi DNA konsentrasi 10 pg/ml dan 100 pg/ml. 40
Gambar 5.5 Visualisasi DNA konsentrasi 10^{-3} pg/ml dan 10^{-2} pg/ml. 40
Gambar 5.6 Visualisasi DNA konsentrasi 10^{-1} pg/ml dan 10^{-6} pg/ml. 41
Gambar 5.7 Visualisasi DNA konsentrasi 10^{-5} pg/ml dan 10^{-4} pg/ml. 42

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Primer yang digunakan untuk amplifikasi PCR 25
Tabel 5.1 Kemurnian dan konsentrasi hasil isolasi DNA genom 31

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kit yang digunakan untuk Isolasi DNA 53
Lampiran 2. Proses amplifikasi menggunakan PCR..... 53
Lampiran 3. Hasil Tm Primer dengan menggunakan spektrofotometer..... 54

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Daging, susu, dan telur merupakan kebutuhan pangan masyarakat yang memiliki nilai protein cukup tinggi. Kebutuhan konsumsi daging dalam negeri yang tidak diimbangi dengan ketersediaan yang cukup menyebabkan terjadinya kenaikan impor bahan makanan baik dalam bentuk bahan baku mentah maupun olahan dari negara lain ke Indonesia.

Pemerintah telah menetapkan kriteria daging yaitu Aman, Sehat, Utuh dan Halal yang di singkat dengan ASUH. Aman berarti daging tidak mengandung bahaya yang dapat menimbulkan penyakit dan mengganggu kesehatan manusia. Sehat berarti daging memiliki zat-zat yang berguna bagi kesehatan dan pertumbuhan tubuh. Utuh berarti daging tidak dikurangi atau dicampur dengan bagian lain dari hewan tersebut atau bagian dari hewan lain. Halal berarti hewan dipotong dan ditangani sesuai syariat agama Islam. Pangan halal didefinisikan sebagai bahan pangan yang tidak mengandung unsur atau bahan haram atau dilarang untuk dikonsumsi umat Islam serta pengolahannya tidak bertentangan dengan syariat Islam (DEPAG RI.,2001).

MUI (Majelis Ulama' Indonesia) merupakan perkumpulan ulama Islam tertinggi di Indonesia. Dengan bekerja sama dengan LPPOM (Lembaga Pusat Pengkajian Obat dan Makanan), MUI telah melakukan sertifikasi halal terhadap produk-produk makanan yang beredar, termasuk produk pangan hasil olahan daging. Makanan dapat disebut halal jika terbuat dari bahan yang tidak

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dilarang oleh *nash-nash* agama Islam. Kehalalan makanan bisa menjadi haram jika makanan tersebut berasal dari bahan yang tidak baik untuk dikonsumsi. Pada dasarnya segala sesuatu di dunia diperbolehkan untuk dikonsumsi kecuali yang dilarang, diantaranya yaitu bangkai, darah, daging babi dan daging yang disembelih untuk selain Allah (Raraswati *et al*, 2012). Hal tersebut tercantum dalam surat Al Baqarah : 173, Al An'am : 145, Al Maidah : 3, dan An Nahl : 115.

إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخِنْزِيرِ وَمَا أُهِلَّ بِهِ لِغَيْرِ اللَّهِ ۖ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَلَا إِثْمَ عَلَيْهِ ۚ إِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَحِيمٌ

Artinya : *"Sesungguhnya Allah hanya mengharamkan bagimu bangkai, darah, daging babi, dan binatang yang (ketika disembelih) disebut (nama) selain Allah. Tetapi barangsiapa dalam keadaan terpaksa (memakannya) sedang dia tidak menginginkannya dan tidak (pula) melampaui batas, maka tidak ada dosa baginya. Sesungguhnya Allah Maha Pengampun lagi Maha Penyayang,"* (QS. Al-Baqarah [2]: 173).

Negara Indonesia mayoritas penduduknya memeluk agama Islam. Oleh karena itu, pemerintah wajib untuk lebih memperhatikan tentang kehalalan distribusi makanan, misalnya campuran daging babi pada makanan olahan atau daging mentah seperti daging sapi. Penambahan daging babi tersebut sebagai bahan pengganti dibandingkan bahan aslinya karena harga daging sapi terus meningkat (Margawati & Ridwan, 2010).

Media massa sering memberikan informasi tentang adanya campuran mengenai produk olahan makanan daging berlabel halal yang dicampur dengan daging yang tidak memenuhi kriteria halal (daging babi, babi celeng). Salah satunya metronew.com memberitakan di Pasar Wonokromo Surabaya, penemuan daging babi berkedok daging sapi impor membuat resah pedagang

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

di Pasar Center Wonokromo atau Darmo Trade Center (DTC) Surabaya, Jawa Timur, pedagang daging sapi terancam merugi karena mereka khawatir konsumen tak lagi berminat membeli daging sapi (Amaluddin, 2015). Di Kota Lubuklinggau Sumatera Selatan, polisi menangkap tersangka yang diketahui mengoplos daging sapi dengan daging babi (Siregar, 2017). Di wilayah Citeureup, Bogor. Polisi mengamankan tujuh pelaku dalam penggerebekan sebuah kios yang dijadikan sebagai tempat pembuatan bakso oplosan berbahan daging celeng atau babi (Bempah, 2017). Hal tersebut meresahkan masyarakat mengingat sebagian besar masyarakat Indonesia adalah muslim, dan membuat masyarakat untuk lebih berhati-hati dalam membeli makanan.

Berdasarkan fakta di atas, UIN Sunan Ampel Surabaya sebagai Lembaga Pendidikan berbasis agama Islam seyogyanya dapat memberikan kontribusi nyata sebagai tindakan yang preventif. Dengan mengintregasikan ilmu pengetahuan secara Ilmiah dan memiliki nilai keislaman, yaitu dengan didirikannya halal center pengujian makanan berbasis molekular. Menggunakan teknologi biologi molekular yang terus mengalami perkembangan dan kemajuan yang pesat. LOD dapat menjadi dasar penentuan dalam melakukan deteksi sampel pada makanan yang diduga mengandung gen babi untuk pengujian kehalalan. Secara umum penggunaan teknik molekular untuk tujuan identifikasi suatu organisme mempunyai keunggulan yaitu lebih akurat dan lebih cepat. Sedangkan identifikasi menggunakan morfologi memiliki keterbatasan yaitu mudah terpengaruh oleh kondisi lingkungan (Meng *et al.*, 2011).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Banyak metode analisa yang telah dikembangkan dan mendapatkan hasil yang cepat dan otentik, salah satunya adalah metode berbasis DNA. Metode analisa dengan menggunakan DNA memiliki beberapa keuntungan, yaitu DNA bisa ditemukan pada semua tipe sel pada suatu individu dengan informasi genetik yang identik. DNA mitokondria (mtDNA) berperan pada studi keanekaragaman genetika dan populasi pada hewan. mtDNA dapat digunakan sebagai penanda genetika karena ukurannya relatif kecil. DNA adalah molekul yang stabil dalam proses ekstraksi, dan analisa DNA bisa dikerjakan dari beberapa tipe sampel yang berbeda (Jain, 2004).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode berbasis DNA yang paling umum digunakan untuk mengidentifikasi pemalsuan sumber hewan pada suatu produk makanan. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik pilihan yang digunakan untuk mengidentifikasi beberapa jenis ternak (Cespedes *et al.*, 1999). Metode PCR merupakan teknik yang dapat digunakan dalam mengidentifikasi kontaminasi babi (Farouk *et al.*, 2006).

Gen-gen yang paling sering digunakan sebagai penanda jenis hewan atau daging diantaranya adalah sitokrom b *(cyt b)*, 12S dan 16S subunit ribosom RNA *Displacement Loop* (D-loop). Sitokrom b *(cyt b)* telah digunakan beberapa peneliti untuk membedakan bahan yang berasal dari jenis hewan yang berbeda, pada *cyt b* terdapat variasi mutan yang menyebabkan gen ini banyak digunakan sebagai penanda untuk mengelompokkan jenis hewan. Gen *cyt b* memiliki kekhasan yaitu adanya daerah yang hampir sama untuk semua jenis hewan.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

LOD *(limit of detection)* adalah jumlah konsentrasi analit terendah di mana deteksi dapat dilakukan. Deteksi produk-produk yang tercemar babi harus di awali dengan optimasi penentuan konsentrasi batas terendah DNA babi yang dapat terdeteksi sesuai dengan spesifikasi laboratorium. Penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat mendeteksi fragmen DNA pengkode gen sitokrom b *(cyt b)* pada babi menggunakan PCR *(Polymerase Chain Reaction).* Sebagai upaya perlindungan konsumen dan pelaksanaan pelabelan pangan, maka metode deteksi dan identifikasi jenis daging dan produk olahan makanan terus dikembangkan. Teknik amplifikasi DNA spesifik untuk setiap jenis hewan pada keamanan dan kehalalan pangan dapat digunakan untuk verifikasi, sertifikasi (pengesahan), maupun untuk monitoring kebanyakan protein hewani dan produk-produk yang aman dan halal secara efisien dan efektif.

Berdasarkan latar belakang tersebut diharapkan penelitian ini dapat menjadi dasar penentuan dalam melakukan deteksi sampel yang diduga mengandung gen babi untuk diketahui konsentrasi terendah yang diperlukan sehingga dapat terdeteksi supaya hasil yang diperoleh lebih relatif dan akurat.

B. Rumusan Masalah

Berapakah konsentrasi minimum yang diperlukan untuk mendeteksi fragmen DNA pengkode gen sitokrom b *(cyt b)* pada babi dengan menggunaan PCR *(Polymerase Chain Reaction)?*

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi minimum yang diperlukan dalam mendeteksi fragmen DNA pengkode gen sitokrom b *(cyt b)* pada babi dengan menggunaan PCR *(Polymerase Chain Reaction).*

D. Batasan Penelitian

Nilai LOD ditentukan dengan melihat konsentrasi minimum DNA babi yang dapat tervisualisasi oleh elektroforesis dan menunjukkan *band* sepanjang ±149 bp. Sedangkan konsentrasi optimum DNA babi diperoleh jika pita pengkode *cyt b* babi terdeteksi dengan jelas dan tebal.

E. Manfaat Penelitian

Penelitian ini memiliki manfaat diantaranya sebagai berikut :

1. Digunakan sebagai acuan untuk pengujian kehalalan suatu produk makanan di Laboratorium Integrasi UIN Sunan Ampel Surabaya.
2. Dapat memberikan informasi seberapa banyak konsentrasi yang digunakan pada peneliti yang akan melakukan uji deteksi babi pada suatu sampel.
3. Dapat membantu dalam pengembangan teknologi untuk melindungi konsumen dari pemalsuan informasi khususnya pada produk pangan asal daging.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Babi

Klasifikasi ilmiah babi menurut (Lekagul & McNeely, 1977)

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Class : Mammalia

Ordo : Artiodactyla

Family : Suidae

Genus : *Sus*

Species : *Sus scrofa*

Babi adalah sejenis hewan ungulata yang bermancung panjang dan berhidung ceper pemakan daging maupun tumbuh-tumbuhan dan merupakan hewan yang berasal dari Eurasia. Babi merupakan binatang yang paling jorok dan kotor, suka memakan bangkai, kotorannya sendiri dan kotoran manusia. Sangat suka berada pada tempat yang kotor, tidak suka berada di tempat yang bersih dan kering. Babi hewan pemalas dan tidak suka bekerja (mencari pakan), tidak tahan terhadap sinar matahari, tidak gesit, makannya rakus (lebih suka makan dan tidur), paling rakus diantara hewan jinak lainnya. Jika tambah umur, jadi makin malas dan lemah (tidak berhasrat menerkam dan membela diri). Babi hewan yang suka dengan sejenis dan tidak pencemburu (Mayasari, 2007).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

B. Keharaman Babi

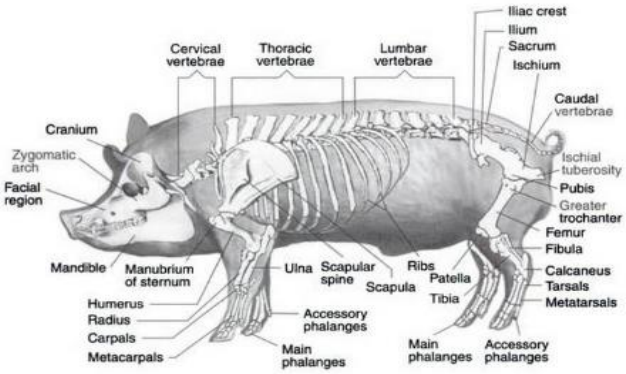
Umat muslim di ajarkan untuk tidak menganiaya diri sendiri dengan mengkonsumsi sesuatu yang membahayakan tubuh, termasuk dilarang mengkonsumsi apapun olahan dari daging babi. Hal tersebut sangat jelas telah didalam Al Qur'an Surah Al An'am ayat 145 :

قُلْ لَا أَجِدُ فِي مَا أُوحِيَ إِلَيَّ مُحَرَّمًا عَلَىٰ طَاعِمٍ يَطْعَمُهُ إِلَّا أَنْ يَكُونَ مَيْتَةً أَوْ دَمًا مَسْفُوحًا أَوْ لَحْمَ خِنْزِيرٍ فَإِنَّهُ رِجْسٌ أَوْ فِسْقًا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ ۚ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَإِنَّ رَبَّكَ غَفُورٌ رَحِيمٌ

Artinya : Katakanlah: "*Tiadalah aku peroleh dalam wahyu yang diwahyukan kepadaKu, sesuatu yang diharamkan bagi orang yang hendak memakannya, kecuali kalau makanan itu bangkai, atau darah yang mengalir atau daging babi - karena Sesungguhnya semua itu kotor - atau binatang yang disembelih atas nama selain Allah. Barangsiapa yang dalam Keadaan terpaksa, sedang Dia tidak menginginkannya dan tidak (pula) melampaui batas, Maka Sesungguhnya Tuhanmu Maha Pengampun lagi Maha Penyayang*".

Islam memiliki cara tersendiri dalam penyembelihan hewan, dengan memutus urat nadi dibagian leher hewan sembari menyebut nama Allah. Dengan begitu maka hewan akan mati akibat kehabisan darah sehingga organ lainnya masih utuh. Sebab, jika organ vitalnya yang cidera misalkan otak atau jantung maka hewan tersebut akan mati seketika dan menyebabkan penggumpalan darah pada urat-uratnya yang dapat mencemari daging oleh *uric acid* yang menjadikan daging itu beracun. Dan para ahli baru menyadari hal ini. Sedangkan babi sesuai anatomi ilmiahnya, hewan ini tidak memiliki leher. Hal tersebut merupakan alasan mengapa muslim tidak mengkonsumsi babi.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 2. 1 Anatomi babi (McGlone & Pond, 2003)

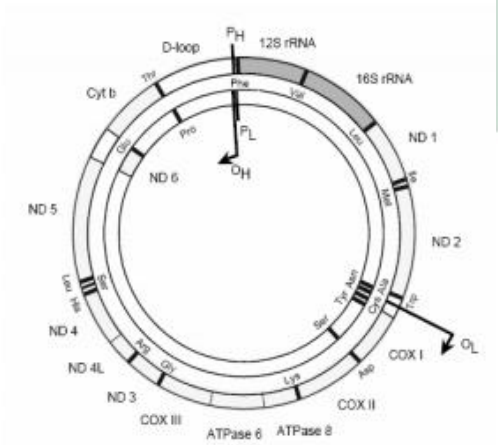
C. Gen Sitokrom b *(cyt b)* DNA Mitokondria

Sitokrom b *(cyt b)* merupakan gen yang dikodekan oleh DNA mitokondria dan terlibat dalam transportasi elektron. Sitokrom b *(cyt b)* berisi delapan transmembran heliks yang dihubungkan oleh intramembran atau domain ekstramembran. Sekuen gen *cyt b* memiliki keunikan yaitu terdapat bagian yang sifatnya kekal di dalam tingkat spesies, sehingga banyak peneliti yang melakukan pengelompokkan atau penentuan hubungan kekerabatan antar jenis hewan dengan menggunakan gen *cyt b* tersebut (Widayanti, 2006). Sekuen gen *cyt b* yang berasal dari *Sus scrofa* mempunyai panjang sekuen 1140 pb (Han *et al.*, 2004)**.**

Mitokondria merupakan organel yang berada di dalam sitoplasma sel eukariota. Struktur organel mitokondria berwujud kantung yang diselaputi oleh membran luar dan dalam, dan memiliki dua kompartemen yaitu matriks mitokondria (yang diselimuti langsung oleh membran dalam) dan ruang antar membran. Protein yang terkandung pada matriks mitokondria sekitar 67%, selain protein juga terkandung enzim, DNA mitokondria dan ribosom (Lodish *et al*., 2000; Artika, 2003).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DNA mitokondria (mtDNA) berbentuk lingkaran heliks yang tertutup dan berada di dalam matrik yang urutan nukleotidanya telah diketahui secara lengkap (Anderson *et al*., 1981) dan dapat diakses melalui GenBank Accesion: M63933. MtDNA mempunyai 2 untai yaitu untai Heavy (H) yang kaya dengan guanin dan untai Light (L) yang kaya dengan sitosin. MtDNA merupakan DNA yang memiliki banyak gen dan hampir tidak memiliki intron, ukurannya sebesar 16569 pasang basa (pb) yang membentuk 37 gen (Gambar 2). Untai H menyandi 13 polipeptida untuk protein kompleks rantai respirasi, 22 tRNA dan 2 rRNA (12S dan 16S) yang berfungsi pada proses sintesis protein mitokondria (Anderson *et al*., 1981). 13 polipeptida terbut meliputi 7 sub unit (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 dan 6) dari kompleks I rantai respirasi, 1 sub unit (apositokrom b) dari kompleks III, 3 sub unit (CO I, II, III) dari kompleks IV dan 2 sub unit (ATP ase 6 dan ATP ase 8) dari kompleks V (Narasimhan & Attardi.,1987).



Gambar 2. 2 Genom Mitokondria (Anderson *et al*., 1981)

DNA mitokondria yang diturunkan melalui induk betina tanpa mengalami rekombinasi (bersifat khusus). Saat terjadi pembuahan sel telur, bagian ekor

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

sperma dilepaskan sehingga hampir tidak ada (hanya sedikit) mtDNA yang masuk ke dalam sel telur. Hal ini berarti sumbangan paternal (dari ayah hanya berjumlah 100 mitokondria. Dalam proses pertumbuhan sel, jumlah mtDNA secara paternal semakin berkurang, jika di bandingan dengan sumbangan secara maternal (dari ibu) yaitu 100.000. Sehingga dapat dianggap tidak terjadi rekombinasi dan dapat dikatakan bahwa mtDNA bersifat haploid, di turunkan dari ibu ke seluruh keturunannya (Cann *et al*., 1987; Giles *et al*., 1980; Wallace, 1997) . Beberapa alasan penggunaan mtDNA sebagai penanda dalam studi keragaman genetik dan studi Biologi populasi pada hewan yaitu (Solihin, 1994) :

1. DNA mitokondria mempunyai jumlah salinan yang tinggi. memanfaatkan DNA mitokondria sebagai target akan meningkatkan kesempatan untuk mendapatkan hasil DNA yang cukup untuk keperluan analisis genom
2. Ukuran DNA mitokondria relatif kecil (14-39 kb) oleh karena itu bisa di pelajari sebagai satu kesatuan yang utuh.
3. Bagian-bagian dari genom mitokondria berevolusi dengan kecepatan yang berbeda. Tingkat evolusi dari suatu bagian DNA merupakan faktor penting gen-gen yang terkonservasi dengan baik dapat dijadikan sebagai dasar pencarian kesamaan asal-usul, sedangkan bagian yang berubah cepat digunakan untuk mengetahui seberapa cepat divergensi dalam spesies tersebut terjadi.
4. Genom mitokondria berukuran kecil karena mtDNA hewan tidak memiliki intron atau pun spacer yang antar gennya berukuran besar.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

5. Penyusunan mtDNA sangat polimorf, baik untuk intrapopulasi maupun intraspesies.

D. Isolasi DNA

Secara umum, metode yang saat ini digunakan meliputi, penghancuran sel dan jaringan, penghilangan protein dan RNA (purifikasi), dan presipitasi DNA (Muladno, 2010). Kini terdapat pengembangan teknologi baru untuk pengekstraksian DNA yang mudah dan lebih cepat dari sebelumnya dengan menggunakan mesin yang terdapat reagen kit di dalamnya, Dengan cara ini pemurnian DNA dapat dilakukan secara otomatis, singkat dan efisien. Instrumen ini dapat memproses sampai dengan 16 sampel dalam 30-40 menit. Dapat dilakukan pada sampel cair, maupun padat, seperti darah, sel dan sampel jaringan. Mesin purifikasi DNA ini memurnikan sampel dengan bantuan partikel-partikel paramagnetic (PMPs) instrumen ini dilengkapi dengan *cartridge* yang berisi *lysis buffer*, magnestilr pmps, *wash buffer* dan elusi dengan *elution buffer* menggunakan bantuan magnestilr pmps (Promega, 2010). Hasil DNA yang telah dimurnikan dapat langsung di aplikasikan pada proses retriksi oleh enzim endonuclease, PCR, di elektroforesis gel agarosa.

E. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

PCR merupakan alat yang digunakan untuk menggandakan molekul DNA pada target tertentu, yaitu dengan cara mensintesa molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA tersebut dengan enzim polimerase dan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

oligonukleotida pendek sebagai primer. Metode ini berjalan enzimatik melalui mekanisme perubahan suhu (Buzdin & Lukyanov, 2007).

Target PCR yaitu asam nukleat (DNA) untai ganda yang diekstraksi dari berbagai macam sel dan terdenaturasi menjadi asam nukleat beruntai tunggal. Komponen proses reaksi PCR terdiri atas pasangan primer yang berupa oligonukleotida spesifik untuk target gen yang dipilih, enzim (umumnya *Taq polymerase*, enzim *thermostable* dan *thermoactive* yang berasal dari *Thermus aquaticus*) dan *trifosfat deoxynucleoside* (dNTP) digunakan untuk mengamplifikasi target gen secara eksponensial dengan hasil replikasi ganda dari target awal. Reaksi ini dilakukan pada mesin pemanas yang diprogram secara otomatis dapat mengatur suhu beserta siklusnya yang disebut *thermocycler*. Mesin tersebut menyediakan kondisi termal yang diperlukan untuk proses amplifikasi (Nollet & Toldra 2011).

Proses yang terjadi pada mesin PCR meliputi tiga tahap utama yaitu denaturasi (pemisahan untai ganda DNA), *annealing* (penempelan primer) dan ekstensi (pemanjangan primer). Proses dimulai dari proses denaturasi, kemudian penempelan dan ekstensi yang mana dalam satu proses tersebut disebut satu siklus. Produk PCR divisualisasikan dengan menggunakan proses elektroforesis dan digunakan untuk analisis lebih lanjut (Weissensteiner *et al.* 2004). Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel yang diwarnai dengan bromida dan divisualisasikan menggunakan sinar ultraviolet (Nollet & Toldrá 2011).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

1. Komponen PCR

Template DNA, sepasang primer oligonukleotida, DNA *polymerase*, doksinukleotida trifosfat (Dntp), dan larutan *buffer* merupakan beberapa komponen penting yang diperlukan dalam reaksi PCR (Yusuf, 2010; Muladno, 2010; Gaffar, 2007; Sulistyaningsih, 2007)

a. *Template* DNA

Template DNA merupakan molekul DNA untai ganda yang mengandung *sequen* target yang akan di amplifikasi. Ukuran DNA bukan faktor utama untuk keberhasilan PCR, karena berapapun panjang untai DNA bila DNA tidak mengandung *sequen* yang diinginkan maka proses PCR tidak akan berhasil. Sebaliknya bila ukuran DNA pendek tetapi mengandung *sequen* yang diinginkan maka proses PCR akan berhasil (Sulistyaningsih, 2007). Kemurnian dan kuantitas atau konsentrasi merupakan dua hal penting pada cetakan. Sebaiknya DNA cetakan yang digunakan berkisar antara 105-106 molekul. (Yusuf, 2010). Apabila konsentrasinya terlalu rendah primer tidak dapat menemukan target dan jika konsentrasi terlalu tinggi akan meningkatkan *mispriming.* Kemurnian *template* haruslah diperhatikan karena akan mempengaruhi hasil reaksi PCR (Sulistyaningsih, 2007).

b. Primer

Primer merupakan salah satu komponen yang menjadi tolak ukur keberhasilan PCR. Pasangan primer terdiri dari 2 oligonukleotida yang mengandung 18-28 nukleotida dan mempunyai 45-60% *GC content* yang

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA (Yusuf, 2010). *Sequen* primer yang lebih pendek dapat memicu amplifikasi produk PCR yang spesifik. Ujung 3' primer penting dalam menentukan spesifisitas dan sensivitas PCR. Ujung ini tidak boleh mempunyai 3 atau lebih basa G atau C, karena dapat menstabilisasi *annealing* primer, sehingga memungkinkan untuk menambahkan *sequen* tertentu seperti sisi retriksi enzim, *start codon* ATG atau *sequen promoter*. Untuk merangsang urutan primer ,perlu diketahui urutan nukleotida pada awal dan akhir DNA target. DNA s*ynthesizer* merupakan alat yang digunakan untuk mensintesis Primer Oligonukliotida (Gaffar, 2007).

c. DNA *Polymerase*

DNA *polymerase* merupakan enzim yang mengkatalis polimerisasi DNA. Pada awalnya, PCR dilakukan dengan menggunakan Klenow fragment DNA. Polimerase 1 selama reaksi polimerisasinya. Pada proses denaturasi enzim ini tidak aktif secara termal, sehingga peneliti harus menambahkan enzim disetiap siklusnya. Seiring dengan perkembangannya, kini digunakan digunakan enzim *Taq*DNA *polymerase* yang memiliki keaktifan pada suhu tinggi sehingga tidak perlu menambahkan enzim pada setiap siklus dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin (Gaffar, 2007).

d. *Deoxynucleotida Triphosphate* (dNTP)

Deoxynucleotida Triphosphate merupakan bahan utama untuk sintesis DNA dalam proses PCR yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

infosfat), dGTP (deoksiguanosin trifosfat), dCTP (deoksitidin trifosfat) dan dTTP (deoksitimidin trifosfat). Konsentrasi dNTP masing-masing sebesar 20-200 µM dapat menghasilkan keseimbangan optimal antara hasil, spesifitas dan ketetapan PCR. Konsentrasi masing-masing dNTP haruslah seimbang untuk meminimalisir kesalahan penggabungan. *Deoxynucleotide Triphosphate* akan menurunkan Mg^{2+} bebas sehingga mempengaruhi aktifitas polimerase dan menurunkan *annealing* primer. Konsentrasi dNTP yang rendah dapat mengurangi terjadinya *mispriming* pada daerah non target dan menurunkan terjadinya kemungkinan perpanjangan nukleotida yang salah. Oleh karena itu spesifitas dan ketetapan PCR meningkat pada konsentrasi dNTP yang lebih rendah (Sulistyaningsih, 2007).

e. Larutan *Buffer*

Larutan *buffer* berfungsi untuk menstabilkan PH agar medium, karena reaksi PCR akan berlangsung pada PH tertentu, oleh karena itu diperlukan larutan *buffer*. *Buffer* yang di gunakan pada reaksi PCR mengandung 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 Mm KCl dan 1,5 mM $MgCl_2$. Optimalisasi konsentrasi ion Mg^{2+} merupakan hal yang penting (Sulistyaningsih, 2007).

f. Kofaktor ion Metal

Magnesium Klorida merupakan kofaktor esensial untuk DNA *Polymerase* yang digunakan di dalam PCR dan konsentrasinya harus di optimasi untuk setiap sistem primer *template*. Konsentrasi ini

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

mempengaruhi beberapa hal pada *annealing* primer, suhu pemisahan untai *template* dan produk PCR, spesifikasi produk, pembentukan primer-dimer serta aktivitas dan ketatapan enzim *Taq Polymerase.* Konsentrasi ion magnesium harus melebihi total konsentrasi dNTP. Biasanya untuk memulai proses optimasi, sebanyak 1,5 mM $MgCl_2$ di tambahkan ke dalam PCR yang di dalamnya terdapat 0,8 mM dNTP sehingga terdapat sekitar 0,7 mM magnesium bebas untuk DNA *polymerase*. Secara umum, ion magnesium harus di variasikan dalam seri konsentrasi dari 1,5 – 4,0 mM (Kolmodin & Birch, 2002).

F. Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul (Titrawani, 1996). Pemisahan dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran berat molekul dan muatan listrik yang dikandung oleh makro-molekul tersebut. Bila arus listrik dialirkan pada suatu medium penyangga yang telah berisi protein plasma maka komponen-komponen protein tersebut akan mulai bermigrasi. Menurut titrawani (1996) teknik elektroforesis dapat dibedakan menjadi dua cara, yaitu : elektroforesis larutan *(moving boundary electrophoresis)* dan elektroforesis daerah *(zone electrophoresis)*. Pada teknik elektroforesis larutan, larutan penyangga yang mengandung makro-molekul ditempatkan dalam suatu

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

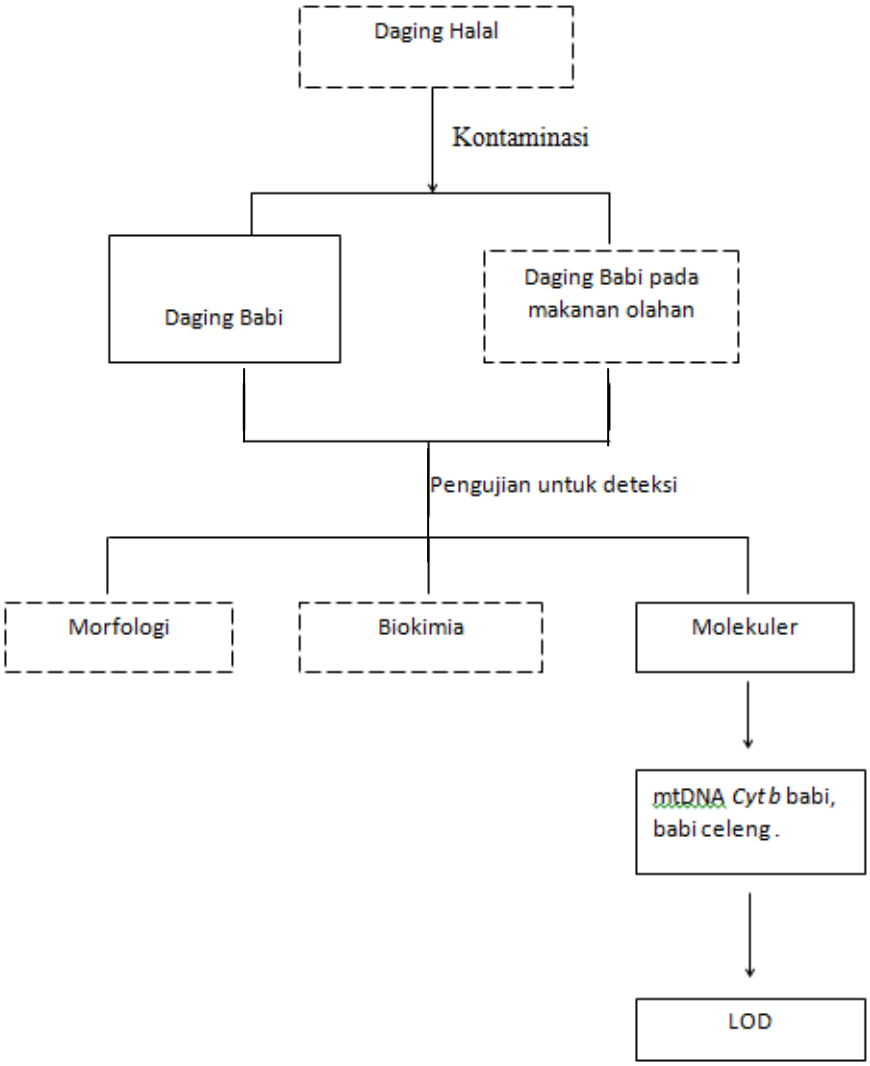
kamar tertutup dan dialiri arus listrik. Kecepatan migrasi dari makromolekul diukur dengan jalan melihat terjadinya pemisahan dari molekul (terlihat seperti pita) di dalam pelarut. Sedangkan teknik elektroforesis daerah adalah menggunakan suatu bahan padat yang berfungsi sebagai media penunjang yang berisi (diberi) larutan penyangga. Media penunjang yang biasa dipakai adalah gel agarose, gel pati, gel poliakrilamida dan kertas sellulose poliasetat. Adapun menurut Sargent & George (1975) elektroforesis daerah disebut sebagai elektroforesis gel dengan dua buah model yaitu horizontal dan vertikal. Metode yang biasa digunakan adalah model horizontal, karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu peralatan yang digunakan sangat sederhana, relatif murah dan pemisahan untuk enzim tertentu dapat menghasilkan pemisahan yang lebih baik.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB III
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

A. Kerangka Konsep

Kerangka konsep pada penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut :



Keterangan :

———— : Diamati

– – – – – – – : Tidak diamati

Gambar 3. 1 Kerangka konsep

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Kesadaran masyarakat untuk mencukupi kebutuhan pangan yang berprotein tinggi salah satunya adalah mengkonsumsi daging, namun harga daging saat ini cukup mahal. Oleh karena itu banyak pedagang yang mencampur daging sapi dengan daging babi. Karena hal itu maka diperlukan uji secara ilmiah untuk membuktikan hal tersebut, salah satunya dengan menggunakan ekstraksi DNA daging yang di uji menggunakan teknik PCR. Kemudian dapat diketahui konsentrasi minimum yang diperlukan untuk mendeteksi fragmen DNA babi tersebut.

B. Hipotesis Penelitian

Pada konsentrasi yang berbeda maka akan didapatkan hasil deteksi fragmen DNA babi yang berbeda pula.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk ke dalam penelitian observasional deskriptif.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

1. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Maret 2018.

Minggu / Kegiatan	Februari					Maret				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Supervisi Pasar										
Persiapan Alat dan Bahan										
Preparasi Sampel										
Spektrofotometri										
PCR										
Elektroforesis										
Penentuan hasil										

2. Lokasi

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium *Genetic and Tissue Culture* UIN Sunan Ampel Surabaya.

C. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah usus, lemak, hati, *blood* (darah), dan daging babi, Wizard KIT Promega®, etanol 70%, isopropanol, Go Taq Green Master Mix®, *buffer* TAE, DNA ladder

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BenchTop, *loading dye, free nuclease water, Diamond nulcei acid*, sampel kontrol negatif, primer babi, agarosa, tissue.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau steril, set elektroforesis [Mupid-Exu], spektrofotometer [Biochrom Biodrop-DUO], *Thermocycler* [Labnet MultiGene Optimax], *microcentrifuge*, Transiluminator [Enduro GDS-1302], *water bath*, mikropipet, vortex mixer, kaca arloji, spatula, timbangan analitik, gelas beaker .

D. Variable Penelitian

Variabel yang digunakan adalah sebagai berikut :

Variabel Kontrol = Daging, usus, lemak, darah dan hati habi

Variabel Respon = Hasil visualisasi DNA

Variabel Manipulasi = Perbedaan konsentrasi

E. Prosedur Penelitian

1. Preparasi sampel dan Isolasi DNA,

Sampel yang digunakan adalah daging, hati, lemak,usus dan darah babi karena organ-organ tersebut biasanya dijadikan bahan konsumsi oleh masyarakat. Dilakukan preparasi sampel dengan langkah sebagai berikut :

a. Sampel diambil sebanyak 50 mg ditambahkan 600 µl *Nuclei Lysis Solution* dan dihomogenkan selama 10 detik.

b. Kemudian di Inkubasi pada suhu 65°C selama 15-30 menit.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

c. Ditambahkan 3 µl RNAse ke dalam sampel yang telah diberi *Nuclei Lysis Solution* kemudian dihomogenkan, lalu diinkubasi selama 15-30 menit pada suhu 37°C, dan didinginkan hingga suhu ruangan
d. Sampel pada suhu ruangan tersebut ditambahkan 200 µl protein precipitation solution dan divortex kemudian didinginkan pada es selama 5 menit.
e. Kemudian disentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 1300-1600 rpm.
f. Pindahkan supernatan ke dalam tabung yang berisi 60 µl isopropanol, pada suhu ruangan.
g. Supernatan dicampur dengan cara inversi (dikocok)
h. Supernatan disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13.000-16.000 rpm.
i. Dihilangkan supernatant dan ditambahkan 60 µl etanol 70%.
j. Aspirasikan etanol dan dikering anginkan pellet selama 15 menit.
k. Ditambahkan 100 µl larutan rehidrasi DNA dengan menginkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam, atau semalaman pada suhu 4°C.

2. Pengujian Konsentrasi dan Kemurnian Isolat DNA

Pengujian DNA hasil ekstraksi secara kuantitatif dilakukan dengan spektrofotometer dengan langkah sebagai berikut :

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

a. Alat spektrofotometer Biodrop dinyalakan, bagian '*nucleid acid'* di tekan. Dipilih *pathlength* 0,5 mm. Pedestas dibersihkan terlebih dahulu dengan tissue.
b. Kemudian dipipet sebanyak 1 µl blanko Larutan TE dan diteteskan pada pedestal.
c. Bagian *'BLANK'* pada layar ditekan untuk pengukuran blanko, setelah selesai pedestal dibersihkan dengan tissue.
d. Larutan isolat DNA sebanyak 1 µl dipipet dan dimasukkan ke dalam pedestal.
e. Kemudian klik tombol *'Measure'* sehingga layar akan menampilkan spektrum dan jumlah konsentrasi yang dihitung. (Biodrop, 2012). Konsentrasi yang digunakan untuk pengujian adalah 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 1 pg/ml. 10^{-1} pg/ml, 10^{-2} pg/ml, 10^{-3} pg/ml, 10^{-4} pg/ml, 10^{-5} pg/ml, dan 10^{-6} pg/ml.

3. Amplifikasi Fragmen DNA Spesifik

Amplifikasi ruas gen *cyt b* dilakukan dengan metode PCR.

a. Bahan-bahan dimasukkan ke dalam *microtube* dengan komposisi sebagai berikut :
   1.) Sampel DNA sebanyak 2,5 µl
   2.) GoTaq® Green Mater mix 12,5 µl
   3.) Primer *Forward* dan *Reverse* sebanyak @1 µl
   4.) Nuclease Free Water 8 µl

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

b. Semua bahan dalam *microtube* di homogensi dengan vortex

c. Selanjutnya dilakukan proses amplifikasi pada mesin *thermocycler* [Labnet MultiGene Optimax]

Proses PCR dilakukan dengan optimasi temperatur sebagai berikut :

a. Pradenaturasi 98°C selama 2 menit

b. Denaturasi 95°C selama 30 detik

c. *Annealing* 61 ^{o}C selama 30 detik

d. *Extension* 72°C selama 40 detik

e. *Praextension* 72°C selama 3 menit

f. Setelah proses tersebut selesai, tabung diambil dan disimpan pada suhu ruang atau pada suhu 4°C sampai akan dianalisis lebih lanjut.

Tabel 4. 1 Primer yang digunakan untuk amplifikasi PCR

Target gen	**Primer**	**Sequence 5' 3'**	**Amplicon (bp)**	**Referensi**
Cyt b	Pork-F	ATGAAACATTGGAGTAGTCCTACTATTTACA	±149bp	Dooley *et al*, 2004: Amaral *et al.*, 2014
	Pork-R	CTACGAGGTCTGTTCCGATATAAGG		

Dalam penelitian ini, Primer Pork F / Pork R digunakan untuk memperkuat fragmen internal (±149 bp) gen sitokrom b mitokondria (*cytb*). Dalam penelitian sebelumnya, primer yang dipilih tidak menunjukkan dimerisasi primer dan spesifisitas tinggi, ditunjukkan oleh pencarian kesamaan urutan pada database NCBI dan tidak ada reaktivitas silang dengan DNA dari spesies lain. gen *cyt b* ini dapat digunakan sebagai penanda material yang berasal dari jenis hewan yang berbeda (Primasari, 2011).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

4. Elektroforesis

Elektroforesis diawali dengan pembuatan gel agarosa dengan konsentrasi 2% sebagai berikut ;

a. 2 gram agarose dan 100 ml larutan *buffer* (0,5 x TAE) dipanaskan selama 1 menit sampai agarosa menjadi larut dan larutan berwarna bening.
b. Larutan agarosa dibiarkan agak dingin sambil diaduk dengan spatula.
c. Kemudian ditambahkan 10 µl *diamond safe* dan dihomogenkan
d. Lalu di tuang ke dalam *gel caster* yang telah disisipkan *comb.*
e. Selanjutnya agarosa didiamkan hingga membentuk gel padat.
f. Setelah terbentuk gel padat, gel di letakkan pada *chamber* elektroforesis dengan posisi sumur pada muatan negatif.
g. Kemudian *buffer* dituang hingga gel terendam dalam *chamber* elektroforesis namun tidak melebihi garis batas maksimum.
h. Pencampuran sampel yang akan di elektroforesis dilakukan dengan menggunakan parafilm.
i. DNA sampel yang digunakan sebanyak 5 µl
j. Kemudian *marker* DNA diletakkan di sumur paling kiri, selanjutnya diikuti DNA sampel.
k. *Chamber* elektroforesis ditutup rapat. Alat elektroforesis dinyalakan (diberi arus listrik) dengan tegangan 50 Volt selama 120 menit untuk DNA genom dan 20 menit untuk produk PCR.
l. DNA akan bergerak dari muatan negatif menuju muatan positif.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

5. **Visualisasi Produk PCR**
   a. Gel agarosa hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan UV transiluminator.
   b. UV transiluminator dinyalakan dan pita DNA akan berpendar saat terkena sinar UV. Pendaran tersebut dapat didokumentasikan dengan Enduro GDS-1302 yang terhubung dengan kamera sehingga gambar yang di tangkap oleh kamera kemudian disimpan dalam komputer.

F. Analisis Data

Data pada penelitian ini dianalisa secara deskriptif :

1. **Data Kualitatif**

   Data molekular dianalisis secara kualitatif dengan melihat pita atau *band* yang terbentuk pada proses elektroforesis yang akan menunjukkan *band* sebesar ± 149bp.

2. **Data Kuantitatif**

   Analisis data secara kuantitatif dilakukan dengan melihat absorbansi DNA dan RNA pada panjang gelombang pada spektrofotometer. Spektrofotometer dapat digunakan untuk penentuan tingkat kemurnian DNA yang berkorelasi dengan kualitas DNA yaitu dengan melihat rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm (A260/280). Nilai absorbansi pada 260/280 nm untuk DNA murni adalah sekitar 1.8 (~1.8).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DNA (µg/ml) = (A_{260} x fp x 50 µg/mL)
A_{260} : nilai serapan pada λ 260 Fp : faktor pengenceran

Konsentrasi DNA dapat dihitung dengan nilai absorbansi pada λ 260 nm di kalikan faktor pengencerannya dan konstanta serapan. Konstanta serapan DNA murni pada λ 260 nm dengan 1 absorbansi unit mengandung 50 µg/mL (Sambrook & Russel, 2001).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui *Limit of Detection* yang diperlukan dalam mendeteksi fragmen DNA pengkode gen sitokrom b *(cyt b)* pada babi dengan menggunaan PCR *(Polymerase Chain Reaction).* Tahapan penelitian yang dilakukan penelitian ini dimulai dari isolasi DNA, pengujian konsentrasi dan kemurnian DNA, amplifikasi fragmen DNA spesifik dengan metode PCR, elektroforesis dan visualisasi produk PCR.

A. Isolasi DNA

Sebelum melakukan analisa yang berhubungan dengan DNA maka diperlukan proses isolasi dan purifikasi DNA karena DNA terbungkus di dalam sel. Pada penelitian ini isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan sampel usus, lemak, hati, darah *(blood),* dan daging babi yang dibeli dari Pasar Petemon, Surabaya. Masing-masing sampel yang digunakan sebanyak 50 mg, dengan menggunakan metode kit ekstaksi DNA *Wizard® Genomic DNA Purification Kit,* Promega. Alasan pemilihan ekstraksi dengan metode ini dikarenakan lebih singkat dan efisien dibandingkan metode konvensional yang memerlukan proses cukup lama. Selain itu, metode ini sudah terbukti hasilnya baik secara kuantitas dan kualitas DNA yang dihasilkan. Secara umum, metode Isolasi DNA meliputi, penghancuran sel dan jaringan, penghilangan protein dan RNA (purifikasi), dan presipitasi DNA (Muladno, 2010).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Pada Isolasi DNA langkah pertama yang dilakukan yaitu menimbang masing-masing sampel sebanyak 50 mg, kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml. Sampel dihaluskan dengan cara digerus menggunakan spatula steril berukuran kecil, lalu ditambahkan 600 µl *Nuclei Lysis Solution* dan dihomogenkan selama 10 detik. Larutan *Nuclei Lysis Solution* ini berfungsi untuk melisiskan sel (Sihotang, 2014), selain itu untuk menjaga struktur DNA selama proses lisis dan pemurnian (Iqbal *et al*., 2016), lalu di inkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit, tujuan inkubasi ini untuk menonaktifkan enzim yang dapat menghambat proses isolasi DNA, serta untuk mempercepat pemecahan selnya sehingga memaksimalkan keluarnya DNA dari sel dan mendegradasi protein dari dinding sel secara optimal (Langga *et al*., 2012). Kemudian ditambahkan 3 µl RNAse ke dalam sampel yang telah di beri *Nuclei Lysis Solution*, fungsi RNAse untuk mendegradasi RNA kontaminan. RNAse merupakan endoribonuklease yang mengkatalis degradasi C dan U pada untai tunggal RNA dengan pemotongan rantai 3'-5'-fosfodiester ribosa dan nukleotida pada pirimidin (Raines, 1998; Moussaoui *et a.l*, 2007). Kemudian dihomogenkan, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, lalu didinginkan hingga suhu ruangan. Sampel pada suhu ruangan tersebut ditambahkan 200 µl *Protein Precipitation Solution* yang berfungsi untuk pengendapan protein dan garam mineral yang masih ada didalam DNA, sehingga DNA yang terisolasi tidak bercampur dengan debris. Lalu di vortex kembali dan di dinginkan pada *frezeer* selama 5 menit.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Pemisahan komponen-komponen yang timbul akibat berakhirnya proses lisis dilakukan dengan cara sentifugasi selama 1300-1600 rpm. Karbohidrat, protein, RNA, dan pengotor lipid masih terkandung dalam supernatan yang terbentuk (Dale & Malcom, 2002). Supernatan hasil sentifugasi dipindahkan ke dalam tabung yang berisi 600 µl isopropanol. Isopropanol atau etanol merupakan alkohol yang biasa digunakan untuk presipitasi yaitu memisahkan DNA dari larutan (Sambrook & Russel, 2001; Dale & Malcom, 2002).

Kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 13.000-16.000 rpm, lalu supernatan dihilangkan dan tambahkan 60 µl etanol 70% untuk melonggarkan pelet, dan divortex. Etanol berfungsi untuk penetrasi dan pencucian DNA (Roger & Bendich, 1994). Kemudian disentifugasi kembali, dibuang sisa etanol dan pellet dikering anginkan, pellet yang sudah kering di tambahkan 100 µl larutan rehidrasi DNA, dapat juga dengan air (ddH2O) atau TE *buffer* (Muladno, 2010).

Hasil kuantifikasi kemurnian DNA diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer Biochrom Biodrop-DUO tersaji pada Tabel 5.1.

Tabel 5. 1 Kemurnian dan konsentrasi hasil isolasi DNA genom

No	Sampel	Panjang Gelombang		Konsentrasi (µg/ml)	Rasio
		A_{260}	A_{280}		
1	Usus	0,238	0,143	10,86	1,777
2.	Lemak	0,054	0,046	0,887	1,821
3.	Hati	0,430	0,249	19,89	1,835
4.	*Blood*	0,008	0,002	0,611	1,964
5.	Daging	0,047	0,028	2,097	1,808

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Diperlukan jumlah dan kemurnian DNA tertentu untuk kinerja optimal sampel yang digunakan. Prinsip spektrofotometer terhadap pengukuran jumlah DNA berdasarkan pada serapan iradiasi sinar ultraviolet oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Untuk menentukan konsentrasi rata-rata dan kemurnian DNA pada sampel umumnya menggunakan analisis asam nukleat yang menyerap sinar ultraviolet dengan pola tertentu. Sinar ultraviolet dan fotodetektor cahaya menembus sampel pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, semakin besar cahaya yang diserap sampel, maka semakin tinggi konsentrasi asam nukleat dalam sampel (Sambrook & Russel, 2001). Kemurnian isolat DNA dapat dilihat dari perbandingan absorbansi A260/A280. Dari Tabel 5.1 nilai rata-rata kemurnian DNA yang diperoleh dari penelitian ini berkisar antara 1,8–1,9 kecuali sampel usus memiliki konsentrasi terendah dibandingkan konsentrasi yang lain yaitu sebesar 1,777 yang berarti masih terdapat kontaminasi protein dan bahan organik. Dalam Tenriulo (2001), nilai rasio (< 1,8) menandakan bahwa terdapat kontaminasi protein dan bahan organik lainnya, dan jika nilai rasio tinggi (> 2,0) menandakan adanya kontaminasi fenol. Konsentrasi sampel pada penelitian ini memiliki kemurnian yang tinggi. Molekul DNA dikatakan murni jika nilai rasio perbandingan absorbansi A260/A280 berkisar antara 1,8-2,0. DNA dengan kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan dalam analisis molekuler (Sambrook & Russel, 2001).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Pada penelitian ini nilai konsentrasi yang didapatkan bervariasi dengan hasil terendah yaitu darah *(blood)* sebesar 0,611 μg/ml. Hal ini dikarenakan bahwa darah *(blood)* memiliki prosedur yang berbeda jika menggunakan metode kit ekstaksi DNA *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, Promega. Sedangkan pada penelitian ini darah *(blood)* di ekstraksi menggunakan metode yang disamakan dengan sampel jaringan lainnya. Hal ini sengaja penulis lakukan supaya tidak membedakan metode yang dilakukan pada masing-masing sampel.

Setelah mengetahui konsentrasi isolat DNA yang diperoleh langkah selanjutnya untuk mengetahui *Limit of Detection* adalah dengan mengencerkan konsentrasi isolat DNA tersebut menjadi beberapa serial berikut ; 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml, 1 pg/ml, 10^{-1} pg/ml, 10^{-2} pg/ml, 10^{-3} pg/ml, 10^{-4} pg/ml, 10^{-5} pg/ml, dan 10^{-6} pg/ml. Sebagai target dalam pengembangan uji spesifik babi untuk menentukan batas deteksi dari pengujian yang akan dilakukan. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan TE *buffer*. Kemudian di amplifikasi menggunakan PCR.

B. Amplifikasi Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sebelum melakukan amplifikasi menggunakan PCR, salah satu parameter penting untuk keberhasilan metode ini yaitu mengetahui desain primer yang spesifik. Hal ini sangat penting dalam pengujian makanan halal dengan metode yang berbasis PCR. Suatu makanan dikatakan halal jika tidak dicampuri oleh bahan makanan lain yang haram, salah satunya babi

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

berapapun besar cemarannya. Oleh karena itu, dalam mendeteksi makanan yang tercemar gen babi diperlukan primer yang spesifik dan sensitif yang mampu mendeteksi sampai dengan konsentrasi yang sangat kecil. DNA mitokondria di amplifikasi dengan menggunakan primer spesifik untuk spesies babi (Kesmen *et al.*, 2009).

Dalam penelitian ini, primer Pork F / Pork R yang digunakan untuk memperkuat fragmen internal (149 bp) gen sitokrom b mitokondria *(cyt b*). Dalam penelitian Dooley (2004), primer yang dipilih tidak menunjukkan dimerisasi primer dan spesifisitas tinggi, ditunjukkan oleh pencarian kesamaan urutan pada database NCBI dan tidak ada reaktivitas silang dengan DNA dari spesies lain. Gen *cyt b* ini dapat digunakan sebagai penanda material yang berasal dari jenis hewan yang berbeda (Primasari, 2011). Setelah menentukan primer yang sesuai maka melakukan proses optimasi suhu *annealing*. Karena apabila suhu *annealing terlalu* rendah maka akan terjadi *mispriming* dan apabila suhu *annealing* terlalu tinggi DNA tidak teramplifikasi, selain itu optimasi suhu *annealing* dapat meningkatkan spesifitas produk PCR (Dale & Malcom, 2002; Prezioso & Jahns, 2013). Penentuan suhu *annealing* dapat ditentukan dengan menghitung *melting temperatur*. *Melting Temperature* (Tm) merupakan temperatur yang diperlukan oleh separuh dupleks mengalami disosiasi atau lepas ikatan. Primer dengan Tm berkisar 52-58°C sangat ideal, sedangkan Tm di atas 65°C akan mengurangi efektivitas *annealing* sehingga proses amplifikasi DNA kurang berjalan baik. Berdasarkan Tm primer yang

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

digunakan *forwards* 58,8^{o}C dan *reverse* 58,1^{o}C, setelah dilakukan beberapa percobaan untuk penentuan *annealing*, optimasi suhu yang sesuai sebesar 61°C untuk amplifikasi PCR. Setelah ditentukan suhu *annealing* dan desain primer yang spesifik selanjutnya melakukan amplifikasi pada mesin *thermocycler* Labnet MultiGene Optimax.

Komponen PCR dibuat dalam volume total 25 µl dengan komposisi Sampel DNA sebanyak 2,5 µl, GoTaq® Green Mater mix 12,5 µl**,** primer *Forward* dan *Reverse* sebanyak @1 µl**,** nuclease Free Water 8 µl kemudian dihomogenkan. Proses yang terjadi dalam mesin PCR meliputi tiga tahap utama yaitu denaturasi (pemisahan untai ganda DNA), *annealing* (penempelan primer) dan ekstensi (pemanjangan primer). Proses yang dimulai dari denaturasi, penempelan dan ekstensi disebut sebagai satu siklus. Produk PCR dapat langsung divisualisasikan melalui proses elektroforesis dan digunakan untuk analisis lebih lanjut (Weissensteiner *et al*. 2004).

C. Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen/molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik (Westermeier, 2004). Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Dengan demikian elektroforesis dapat digunakan untuk separasi makromolekul (seperti protein dan asam nukleat). Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan matriks

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan (Hutahaean *et al.*, 2014).

Pada penelitian ini langkah pertama elektroforesis dengan pembuatan gel agarosa dengan konsentrasi 2%. Gel ini berfungsi sebagai media untuk menvisualisasikan DNA. Pembuatan gel dari 2 gram agarose dan 100 ml larutan *buffer* (0,5 x TAE) dipanaskan selama 1 menit sampai agarosa menjadi larut dan larutan berwarna bening. TAE digunakan sebagai buffer elektroforesis karena memiliki kapasitas buffering yang tinggi pada titik isoelektriknya. Borat bertindak sebagai conducting ion sehingga dapat mempertahankan kesetimbangan ion H+ dan OH- yang dihasilkan oleh elektrode, hal ini berhubungan dengan fungsi buffer dalam menjaga kesetimbangan pH saat migrasi fragmen DNA berlangsung, perubahan pH dapat mendenaturasi struktur DNA sehingga merubah elektromobilitas DNA (Hutahaean *et al*., 2014).

Gambar 5. 1 Proses Elektroforesis

Sumber : Dokumentasi pribadi.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Agarosa yang digunakan merupakan matriks penyangga yang dipakai untuk pemisahan protein dan asam nukleat (Hutahaean *et al*, 2014). Larutan agarosa dibiarkan agak dingin sambil diaduk dengan spatula. Kemudian ditambahkan 10 µl *Diamond safe* dan dihomogenkan. *Diamond safe* berfungsi sebagai pewarna DNA agar ketika DNA divisualisasikan pita-pitanya berpendar sehingga dengan mudah diamati. Setelah itu buffer dituangkan hingga merendam gel agarose. Fungsi buffer untuk menjaga kesetimbangan pH saat migrasi fragmen DNA berlangsung, perubahan pH dapat mendenaturasi struktur DNA sehingga merubah elektromobilitas DNA (Hutahaean *et al.*, 2014). Loading dye kemudian ditambahkan sebanyak 1 µl pada sampel. Loading dye ini, terdiri dari sebuah pewarna yaitu *bromophenol blue* yang berfungsi untuk visualisasi pergerakan DNA pada saat elektroforesis dicampurkan kedalam genom. Adanya gliserol didalam loading dye untuk meningkatkan densitas sampel dan memastikan bahwa DNA didalam ladder dan sampel membentuk lapisan dibawah sumur gel dan tidak menyebar. Fungsi lainnya buffer ini dapat juga membantu pergerakan sampel ke anoda (Vivikanada, 2014).

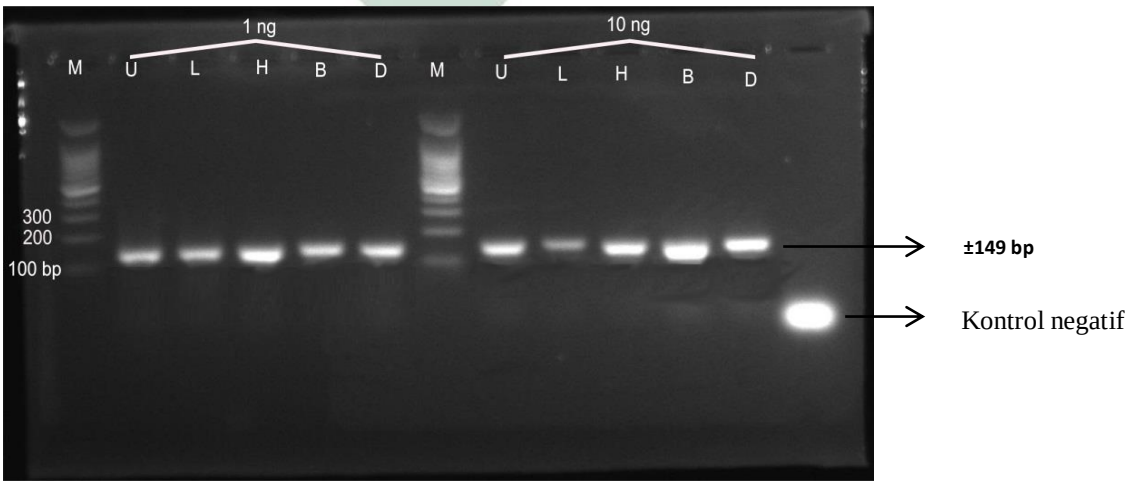
Kemudian sampel dimasukkan kedalam sumur gel. DNA sampel yang digunakan sebanyak 5 µl. Kemudian *marker* DNA diletakkan di sumur paling kiri (pertama), selanjutnya diikuti DNA sampel dan kontrol negatif di sumur paling kanan. Pada penelitian ini kontrol negatif yang digunakan adalah *Psidium guajava L*, lalu *Chamber* elektroforesis ditutup rapat. Alat elektroforesis dinyalakan (diberi arus listrik) dengan tegangan 50 Volt

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

selama 100 menit untuk gen. DNA merupakan molekul bermuatan negatif, sehingga bila diletakkan di medan listrik, DNA akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif. Prinsip inilah yang dipakai dalam elektroforesis untuk memisahkan molekul-molekul DNA. Pergerakan ini kecepatannya tergantung dari: ukuran molekul DNA, kerapatan (konsentrasi) gel yang dilalui DNA, dan arus listrik yang diberikan untuk memigrasikan molekul DNA. Semakin kecil ukurannya, DNA akan bermigrasi semakin cepat. Semakin rapat media (gel) yang digunakan semakin lambat pergerakan DNA di dalam gel. Dan semakin kuat arus listrik yang diberikan akan semakin cepat migrasi DNA (Hutahaean *et al*., 2014).

D. Visualisasi Hasil PCR

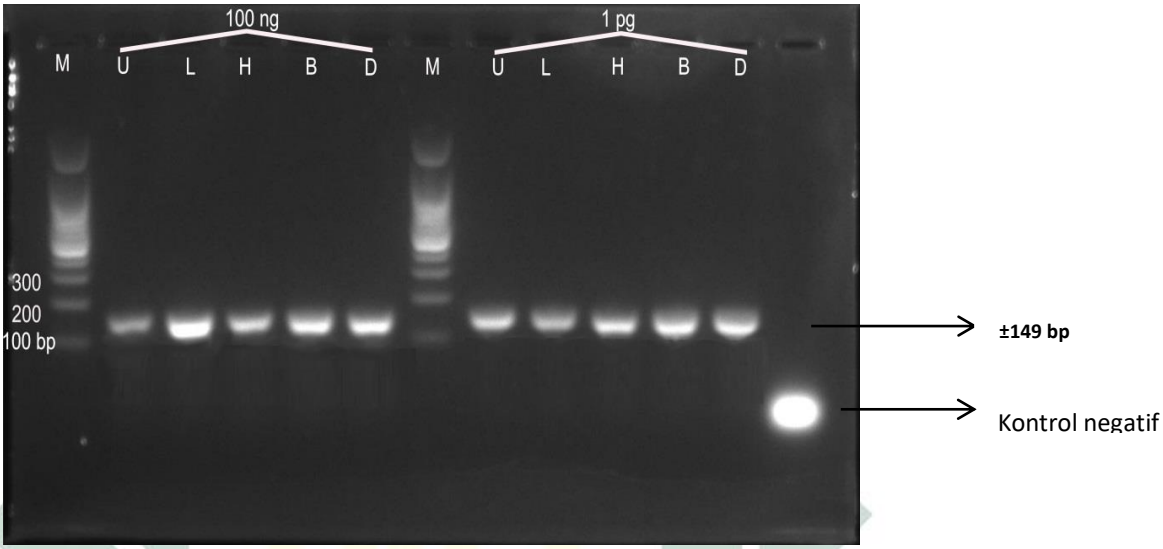
Pengujian DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan cara kualitatif dan kuantitatif. Penilaian kuantitas menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui konsentrasi DNA dan penilaian kualitas dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa. hasil elektroforesis tersebut divisualisasi menggunakan UV transiluminator.



Gambar 5. 2 Visualisasi DNA konsentrasi 1 ng/ml dan 10 ng/ml.
Keterangan : M : Marker 100 bp; U : Usus; L: Lemak; H: Hati; B : *Blood;* D : Daging.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

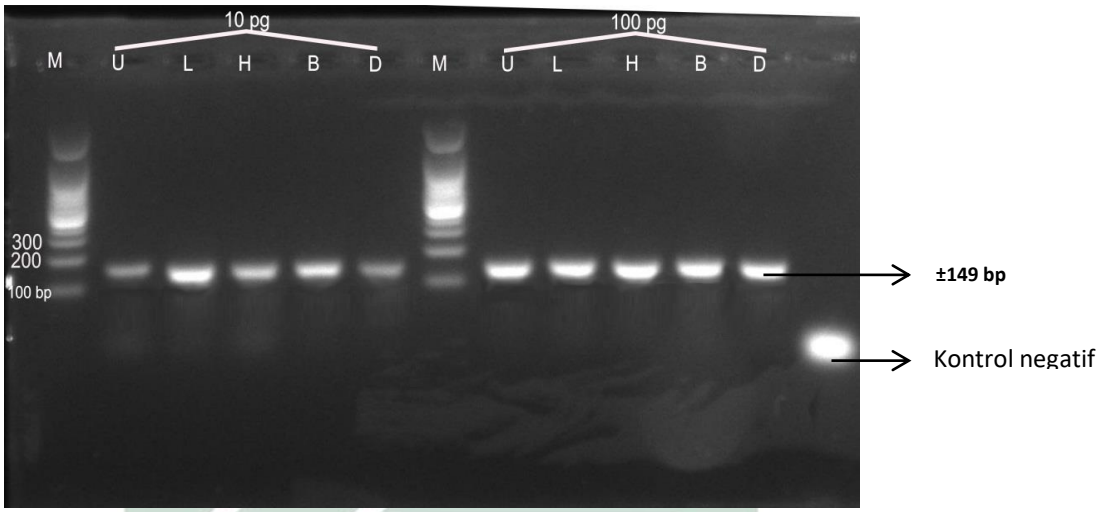
Gambar 5.2 menunjukkan hasil visualisasi PCR dengan konsentrasi 1 ng dan 10 ng terlihat *band* yang tebal dan jelas. Sehingga pada konsentrasi ini hasil kemurnian isolasi sangat baik ketika di amplifikasi pada PCR.



Gambar 5. 3 Visualisasi DNA konsentrasi 100 ng/ml dan 1 pg/ml.
Keterangan: M : Marker 100 bp; U : Usus; L: Lemak; H: Hati; B : *Blood;* D : Daging.

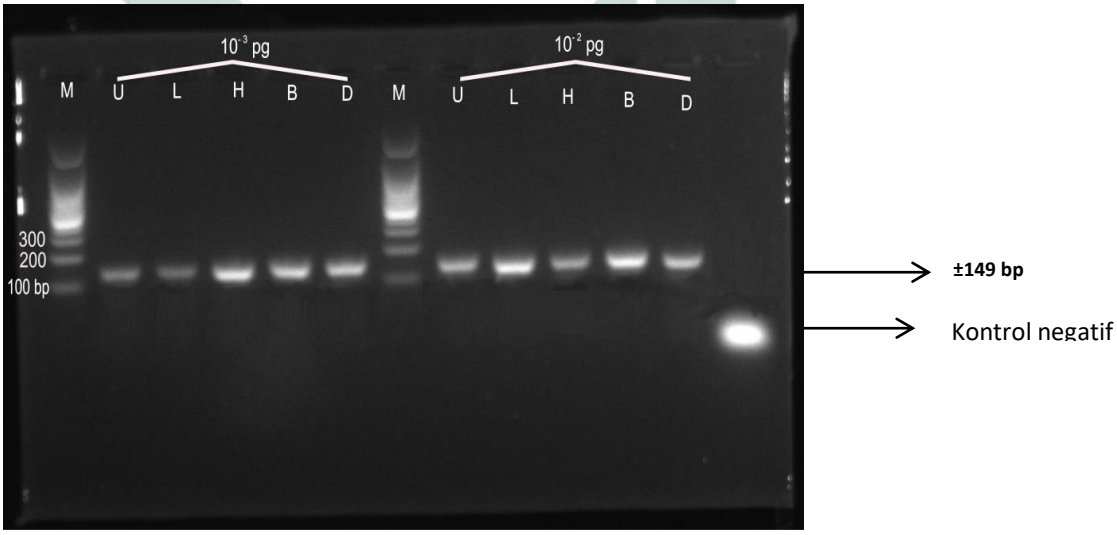
Gambar 5.3 menunjukkan hasil visualisasi PCR dengan konsentrasi 100 ng dan 1 pg nampak *band* yang masih terlihat tebal dan jelas. Sehingga pada konsentrasi ini juga dapat dikatakan hasil kemurnian isolasi baik ketika di amplifikasi pada PCR.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 5. 4 Visualisasi DNA konsentrasi 10 pg/ml dan 100 pg/ml.
Keterangan : M : Marker 100 bp; U : Usus; L: Lemak; H: Hati; B : *Blood;* D : Daging.

Gambar 5.4 menunjukkan hasil visualisasi PCR dengan konsentrasi 10 pg dan 100 pg terlihat *band* yang masih terlihat jelas. Sehingga pada konsentrasi ini juga dapat dikatakan hasil kemurnian isolasi cukup baik ketika di amplifikasi pada PCR.

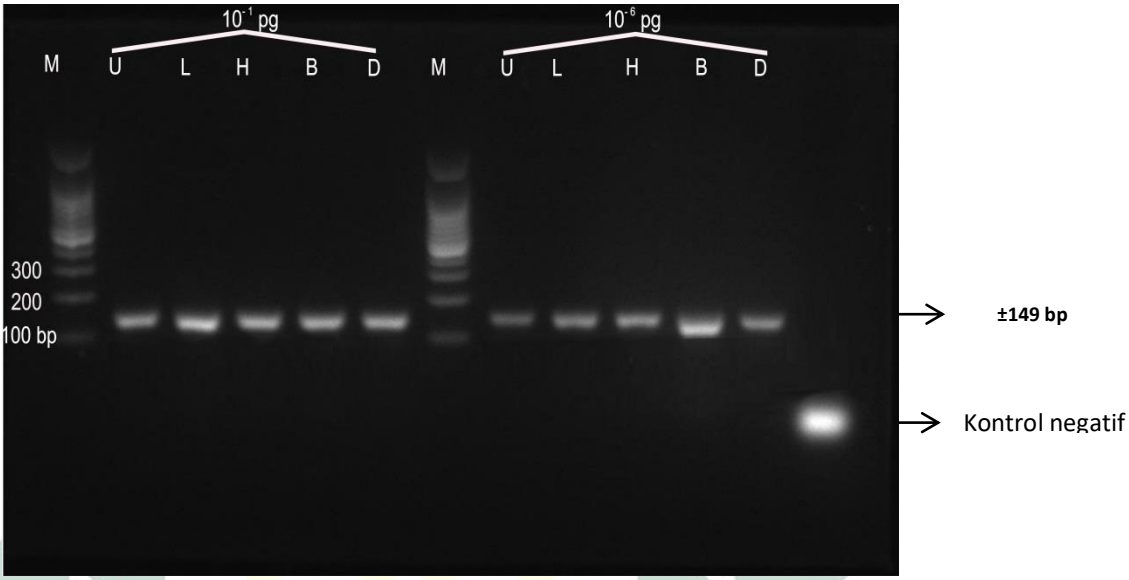


Gambar 5. 5 Visualisasi DNA konsentrasi 10^{-3} pg/ml dan 10^{-2} pg/ml.
Keterangan : M : Marker 100 bp; U : Usus; L: Lemak; H: Hati; B : *Blood;* D : Daging.

Gambar 5.5 menunjukkan hasil visualisasi PCR dengan konsentrasi 10^{-3} pg dan 10^{-2} pg 10 pg nampak *band* yang masih terlihat baik dan jelas.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

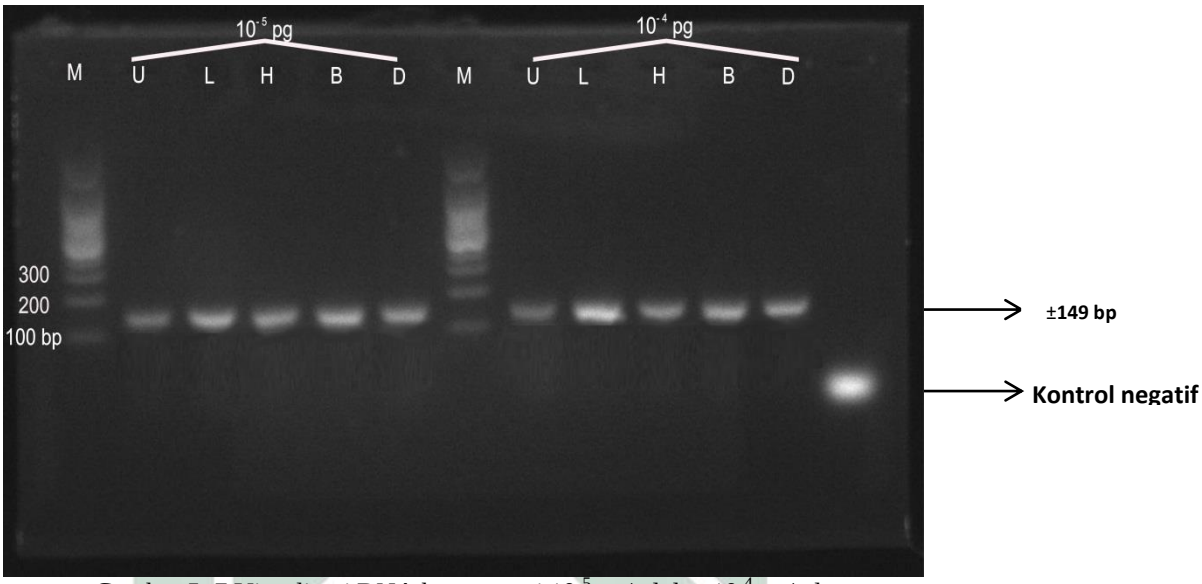
Sehingga pada konsentrasi ini juga dapat dikatakan hasil kemurnian isolasi cukup baik ketika diamplifikasi pada PCR.



Gambar 5. 6 Visualisasi DNA konsentrasi 10^{-1} pg/ml dan 10^{-6} pg/ml.
Keterangan : M : Marker 100 bp; U : Usus; L: Lemak; H: Hati; B : *Blood;* D : Daging.

Gambar 5.6 menunjukkan hasil visualisasi PCR dengan konsentrasi 10^{-1} pg dan 10^{-6} pg nampak *band* yang masih terlihat baik dan cukup jelas. Sehingga pada konsentrasi ini juga dapat dikatakan hasil kemurnian isolasi cukup baik ketika di amplifikasi pada PCR.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 5. 7 Visualisasi DNA konsentrasi 10^{-5} pg/ml dan 10^{-4} pg/ml.
Keterangan : M : Marker 100 bp; U : Usus; L: Lemak; H: Hati; B : *Blood;* D : Daging.

Gambar 5.7 menunjukkan hasil visualisasi PCR dengan konsentrasi 10^{-5} pg dan 10^{-4} pg nampak *band* yang masih terlihat cukup baik dan cukup jelas. Sehingga pada konsentrasi ini juga dapat dikatakan hasil kemurnian isolasi cukup baik ketika di amplifikasi pada PCR.

Dari hasil visualisasi PCR di atas menunjukkan bahwa pada semua serial konsentrasi 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg. 10^{-1} pg, 10^{-2} pg, 10^{-3} pg, 10^{-4} pg, 10^{-5} pg, dan 10^{-6} pg/ml DNA *cyt b* pada babi masih dapat teramplifikasi, bahkan pada 10^{-6} pg yang merupakan konsentrasi terkecil. Penelitian sebelumnya oleh Yusop *et al.*, (2011) *Limit of Detection* untuk PCR spesifik babi ditemukan sebesar 0,0001 ng atau setara dengan 10^{-1} pg pada daging babi dalam campuran daging mentah dengan beberapa spesies hewan lain. Hal tersebut membuktikan bahwa penelitian ini menemukan *Limit of Detection* yang lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Hasil yang baik ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kemurnian DNA hasil ekstraksi, ketepatan pemilihan primer yang digunakan serta ketepatan kondisi reaksi PCR. PCR terbukti sebagai metode yang memadai untuk mendeteksi DNA dalam jumlah yang kecil, khususnya memperkuat wilayah target DNA template dengan cara cepat dan sensitif. Dengan menggunakan primer yang spesifik dan universal, banyak urutan mitokondria misalnya gen *cyt b* (Burgener & HuÈbner, 1998; Matsunaga *et al*., 1999). DNA yang digunakan untuk reaksi amplifikasi adalah DNA mitokondria yang diisolasi dengan menggunakan *Wizard Genomic Purification System, promega* yang sudah dalam bentuk kit sehingga DNA yang dihasilkan mempunyai kemurnian yang tinggi dan rendahnya kontaminasi DNA dari berbagai macam debris (Lelana *et al*., 2002)

Ketepatan pemilihan primer juga berpengaruh untuk mendapatkan *limit of detection* dengan konsentrasi yang rendah. Primer yang digunakan telah memenuhi syarat-syarat dalam seleksi primer, seperti terdiri dari 20 basa, kandungan G/C nya 50%, kemungkinan terbentuknya struktur sekunder dalam primer adalah kecil serta 2 basa pada 3 basa terakhir terdiri dari G/C, tidak menunjukkan dimerisasi primer dan spesifisitas tinggi. Primer merupakan bagian penting dalam reaksi amplifikasi DNA karena merupakan initiator pada sintesis DNA. Ketepatan kondisi pada reaksi PCR merupakan faktor utama dalam menentukan keberhasilan suatu reaksi PCR. Ketepatan kondisi reaksi ditentukan oleh ketepatan campuran reaksi dan ketepatan kondisi suhu pada masing-masing siklus (Lelana *et al*., 2002).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Gen DNA mitokondria telah sering digunakan menjadi target untuk berbagai tes PCR dalam deteksi spesiasi hewan, tumbuhan, dan sel mikroba. DNA mitokondria memiliki jumlah salinan tinggi dalam sel. Oleh karena itu, memanfaatkan DNA mitokondria sebagai target akan meningkatkan kesempatan untuk mendapatkan hasil DNA yang cukup untuk tes PCR berikutnya terutama ketika menggunakan produk yang diproses atau dipanaskan, yang dapat menyebabkan degradasi DNA genom. Pemeriksaan spesifik PCR spesifik yang menargetkan gen *cyt b* mitokondria yang dikodekan telah banyak dimanfaatkan oleh beberapa peneliti (Aida *et al.*, 2007; Matsunaga *et al*., 1999).

Sensitivitas yang tinggi pada konsentrasi 10^{-6} pg/ml pada peneltian ini menunjukkan bahwa penelitian ini memiliki prospek yang baik untuk dijadikan acuan dalam mendeteksi produk-produk yang diduga tercemar babi sesuai dengan spesifikasi laboratorium di UIN Sunan Ampel Surabaya sebagai pengujian kehalalan makanan. Untuk melindungi konsumen agar produk yang akan dikonsumsi terjamin kehalalan dan kesuciannya sesuai dengan ajaran syari'ah Islam. Hukum Islam diciptakan untuk mewujudkan kemaslahatan manusia baik di dunia maupun di akhirat. Dasar yang digunakan untuk keharusan mengonsumsi sesuatu yang halal baik makanan, minuman, tumbuhan dan binatang telah tercantum dalam Alquran dan Hadits.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

حُرِّمَتْ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةُ وَالدَّمُ وَلَحْمُ الْخِنْزِيرِ وَمَا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ وَالْمُنْخَنِقَةُ وَالْمَوْقُوذَةُ وَالْمُتَرَدِّيَةُ وَالنَّطِيحَةُ وَمَا أَكَلَ السَّبُعُ إِلَّا مَا ذَكَّيْتُمْ وَمَا ذُبِحَ عَلَى النُّصُبِ وَأَنْ تَسْتَقْسِمُوا بِالْأَزْلَامِ ۚ ذَٰلِكُمْ فِسْقٌ ۗ الْيَوْمَ يَئِسَ الَّذِينَ كَفَرُوا مِنْ دِينِكُمْ فَلَا تَخْشَوْهُمْ وَاخْشَوْنِ ۚ الْيَوْمَ أَكْمَلْتُ لَكُمْ دِينَكُمْ وَأَتْمَمْتُ عَلَيْكُمْ نِعْمَتِي وَرَضِيتُ لَكُمُ الْإِسْلَامَ دِينًا ۚ فَمَنِ اضْطُرَّ فِي مَخْمَصَةٍ غَيْرَ مُتَجَانِفٍ لِإِثْمٍ ۙ فَإِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَحِيمٌ

Artinya : *"Diharamkan bagimu (memakan) bangkai, darah, daging babi, (daging hewan) yang disembelih atas nama selain Allah, yang tercekik, yang terpukul, yang jatuh, yang ditanduk, dan diterkam binatang buas, kecuali yang sempat kamu menyembelihnya, dan (diharamkan bagimu) yang disembelih untuk berhala. Dan (diharamkan juga) mengundi nasib dengan anak panah, (mengundi nasib dengan anak panah itu) adalah kefasikan. Pada hari ini orang-orang kafir telah putus asa untuk (mengalahkan) agamamu, sebab itu janganlah kamu takut kepada mereka dan takutlah kepada-Ku. Pada hari ini telah Kusempurnakan untuk kamu agamamu, dan telah Ku-cukupkan kepadamu nikmat-Ku, dan telah Ku-ridhai Islam itu jadi agama bagimu. Maka barang siapa terpaksa karena kelaparan tanpa sengaja berbuat dosa, sesungguhnya Allah Maha Pengampun lagi Maha Penyayang* " (Al Maidah (5) : 3)

Dalam ayat tersebut telah jelas bahwa babi merupakan sesuatu yang diharamkan, sekalipun dalam ayat tersebut menyebutkan secara khusus daging babi, namun yang dimaksud ialah seluruh bagian babi, karena daging yang biasanya dimanfaatkan untuk dikonsumsi. Keseluruhan bagian babi mutlak haram, hal ini telah disepakati oleh para ulama'. Ibnu Hazm menyebutkan dalam buku Maratib *al-Ijma'* bahwa para ulama sepakat daging, syaraf, otak, tulang rawan, isi perut (usus), dan anggota tubuh lainnya, baik jantan, betina, kecil ataupun besar hukumnya haram. Maka tidak diperbolehkan makan sebagian dari salah satu bagian tubuh babi, baik yang berupa daging, kulit, lemak dan anggota tubuh lainnya. Hal ini sudah

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

disepakati oleh semua umat Islam. *(Bidayah al-Mujtahid*, jilid I, h. 488; *al-Qawanin al-Fiqhiyyah*, h.34; *al-Mughni*, Jilid I, h. 136; *Mughni al-Muhtaj*, Jilid I, h. 77; *Syarh al-Minhaj*, Jilid I, h. 69)

UIN Sunan Ampel Surabaya sebagai Lembaga Pendidikan berbasis agama Islam seyogyanya dapat memberikan kontribusi nyata sebagai tindakan yang preventif. Dengan mengintregasikan ilmu pengetahuan secara Ilmiah dan memiliki nilai keislaman, yaitu dengan didirikannya halal center pengujian makanan berbasis molekuler. Menggunakan teknologi biologi molekular yang terus mengalami perkembangan dan kemajuan yang pesat. LOD yang diperoleh pada penelitian ini memiliki sensitivitas yang tinggi yaitu 10^{-6} pg/ml yang dapat menjadi dasar penentuan dalam melakukan deteksi sampel pada makanan yang diduga mengandung gen babi untuk pengujian kehalalan.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB VI

PENUTUP

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa Nilai *Limit of Detection* didapatkan pada konsentrasi 10^{-6} pg dengan munculnya *band* DNA pengkode gen *cyt b* babi yaitu ±149 bp dengan visualisasi menggunakan elektroforesis. Sensitivitas yang tinggi pada konsentrasi 10^{-6} pg yang dihasilkan pada penelitian ini menunjukkan spesifikasi laboratorium yang baik di UIN Sunan Ampel Surabaya untuk dijadikan acuan dalam mendeteksi produk-produk yang diduga tercemar babi sebagai pengujian kehalalan makanan.

B. Saran

1. Pada penelitian ini isolat *blood* (darah) yang dihasilkan memiliki konsentrasi yang rendah, sebaiknya untuk melakukan Isolasi DNA pada sampel darah perlu dilakukan sesuai dengan metode pada kit yang digunakan supaya dapat menghasilkan DNA dengan konsentrasi yang lebih baik.
2. Penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk deteksi kontaminasi babi dalam pengujian kehalalan makanan sesuai dengan spesifikasi laboratorium di UIN Sunan Ampel Surabaya.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR PUSTAKA

Aida A.A, YB Che man, Raha AR, Son R (2007) Detection of pig derivatives in food products for halal authentication by polymerase chain reation-restriction length polymorphism. *J Sci of Food and Agri.* 87: 569–572.

Al-Quran Al-Karim. 2006. *Qur'an Tajwid dan Terjemahnya.* Maghfirah Pustaka, Jakarta.

Amaluddin. 2015 .*Daging Babi Ditemukan di Surabaya, Pedagang Khawatir Konsumen 'Kabur'.* Di akses pada tanggal 11 September 2017. <http://m.metrotvnews.com/jatim/peristiwa/VNxMPeab-daging-babi-ditemukan-di-surabaya-pedagang-khawatir-konsumen-kabur>.

Amaral, J.S., Cristina,G.S., Vitor, S.M., M., Beatriz,P.P.O., dam Isabel, M. 2014. Authentication of a traditional game meat sausage (*Alheira*) by species-species PCR assays to detect hare, rabbit, red deer. Pork and cow meets. *Food Research International.* 60 : 140-145

Anderson S., Bankier AT., Barrell BG., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290: 457-465.

Artika, IM. 2003. *Struktur, fungsi dan biogenesis mitokondria Eijkman Lecture Series I: Mitochondrial medicine.* Lembaga Biologi Molekul Eijkman, Jakarta.

Bempah, Ramdhan Triyadi. 2017. *Polres Bogor amankan 7 orang terkait bakso oplosan.* Di akses pada tanggal 30 Mei 2017. <http://regional.kompas.com/read/2017/05/30/14192801/polres.bogor.amankan.7.orang.terkait.bakso.oplosan.daging.babi,>.

Bidayah al-Mujtahid, jilid I, h. 488; *al-Qawanin al-Fiqhiyyah,* h.34; *al-Mughni,* Jilid I, h. 136; *Mughni al-Muhtaj,* Jilid I, h. 77; *Syarh al-Minhaj,* Jilid I, h. 69

BioDrop. 2012. Diakses pada tanggal 6 September 2017. <http://www.biodrop.co.uk>.

Burgener, M., & Huebner, P. 1998. Mitochondrial DNA enrichmen for species identi®cation and evolutionary analysis. *Zeitschrift fuÈr Lebensmitteluntersuchung und-Forschung.* 207: 261-263.

Buzdin A & Lukyanov S. 2007. *Nucleic Acids Hybridization Modern Applications.* Springer, Netherlands.

Cann, L, R., Stoneking, M., dan Wilson, A.C.,O., 1987. *Mitochondrial DNA and Human Evolution. 235.*

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Cespedes, Ana., Teresa Garcia., Esther Carrera., Isabel Gonzalez., Alicia Fernandez., Pablo E., Hernandez., dan Rosario Martin., 1999. Identification of Sole *(Solea solea)* and Greenland Halibut *(Reinhardtius hippoglossoides)* by PCR Amplification of the 5S rDNA Gene. *Food chem*. 47(3): 1046-1050.

Dale, Jeremy W. & Malcom von Schantz. 2002 , *From Genes to Genomics*: *Concepts and Application of DNA Techology*. John Wiley & Sons Ltd, USA.

Departemen Agama Republik Indonesia. 2001. *Keputusan Menteri Agama Republik Indonesia tentang Pedoman dan Tata Cara Pemeriksaan dan Penetapan Pangan Halal*. Depag RI, Jakarta.

Dooley, J.J. Kelly,E.P., Stephen, D.G., Helen, M.B. 2004. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*. 68: 431-438.

Farouk A., MF Batcha., R Griner., HM Salleh., MR Salleh dan AR Sirajudin., 2006. The use of a molecular technique for the detection of porcine ingredients in the Malaysian food market. *Saudi Med J*. 27: 447- 450.

Gaffar, Shabarni. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Jurusan Kimia, FMIPA UNPAD, Bandung.

Giles, R.E., H Blanc, H M Cann dan D C Wallace., 1980. Maternal Inheritance of Human Mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. SCI. USA*. 77 (11): 6715-6719.

Han SH., Kang MC., Song JH., Oh JH., Oh YS., dan Oh MY. 2004. Phylogenetic relationship of Korean wild boars based on mitochondrial DNA Cytochrome b gene. di akses pada tanggal 27 Oktober 2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Hutahaean, S., Jamilah dan Saleha, H. 2014. *Penuntun Praktikum Bioteknologi*. Universitas Sumatera Utara, Medan.

Ibnu Hazm al-Andalusi. TT. *Maratib al-Ijma*' (Dari al-Afaq al- Jadidah) Hal.148.

Iqbal, M., Ibnu, D.B., dan Nia K. 2016. Analisis perbandingan metode isolasi DNA untuk deteksi white spot syndrome virus (WSSV) pada undang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*. 7 (1): 54-65.

Kesmen, Z., Yetim, H., & Sahin, F. 2009. *Identification Of different Meat species Used in Sucuk production by pcr Assay*. *Research/Arasturma*. GD0928.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Kolmodin, L.A. & D.E. Birch. 2002. *Polymerase chain reaction: basic principles and routine practice. PCR Cloning Protocols, 2nd edition. (Chen, B. & H.W. Janes, Eds.).* Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.

Jain, Shally. 2004. *Use of Cytochrome B Generasi Variability In Detecting Meat Species By Multiplex PCR Assay.* Department Of Veterinary Public Health, College Of Veterinary Science & Animal Husbandry, Anand Agricultural University, Anand.

Langga, I.F., M., Restu, dan Tutik, K. 2012. Optimalisasi Suhu Dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi Dna Tanaman Bitti (Vitex Cofassus Reinw)Serta Analisis Keragaman Genetik Dengan Teknik Rapd-Pcr. *J. Sains & Teknologi.* 12 (3) : 265-276.

Lekagul, B. & J.A. McNeely. 1977. *Mammals of Thailand.* The Association for the Conservatiin of Wildlife, Bangkok.

Lelana, N.E., Sutarno, dan Nita, E. 2002. Identifikasi Polimorfisme pada Fragmen ND-5 DNA Mitokondria Sapi Benggala dan Madura dengan Teknik PCR-RFLP. *Biodiversitas*. 4 (1): 1-6.

Lodish, H., Berk AS., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., dan Darnell J., 2000. *Molecular Cell Biology.* W. H. Freeman and Company.

Margawati, Endang Tri & Muhammad Ridwan. 2010. *Pengujian Pencemaran Daging Babi Pada Beberapa Produk Bakso Dengan Teknologi PCR. Pencarian Sistem Pengujian Efektif.* Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Bogor.

Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, Shinmura Y., 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* 51: 143–148.

Mayasari, Nura. 2007. *Memilih Makanan Halal.* Qultum Media, Jakarta.

McGlone, John & Wilson G Pond. 2003. *Pig Reproduction: Biological Principles and Applications.* Thomson Delmar Learning, Texas

Meng, L., Yang HX., Mao PC., Gao HW., dan Sun FD., 2011. Genetic diversity analysis of *Arrenatherum elasticus* germplasm with inter—simple sequence repeat (ISSR) markers. *Afr.J. Biotechol.* 10(56): 8729-36.

Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa genetika, Edisi Kedua.* IPB Pres, Bogor.

Moussaoui. 2007. A Phosphate-Binding Subsite in Bovine pancreatic ribonuclease A can be converted into a very efficient Catalytic Site. *Protein Science*. 16: 99-109.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Narasimhan N & G Attardi. 1987. Specific requirement for ATP at an early step of in vitro transcription of human mitochondrial DNA. *Sci USA.* 84 (12): 4078-4082.

Nollet, LML & Toldra F. 2011. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*. CRC Press, New York.

Prezioso, Vincent & alex jahns 2013, *using gradient PCR to determine the optimum annealing temperature.* Eppendorf Scientific inc, USA

Primasari, Almira. 2011. Sensitivitas Gen Sitokrom b (Cyt b) Sebagai Marka Spesifik pada Genus Rattus dan Mus untuk Menjamin Keamanan Pangan Produk Asal Daging. *Tesis*. Prodi Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan IPB, Bogor.

Promega. 2010. *Technical Manual Maxwell® 16 DNA Purification Kits.* United States of America. Di akses pada tanggal 28 Mei 2017. <www.promega.com>.

Raines, R.T. 1998. Ribonuclease *A. Chem. Rev*. 98: 1045-1065.

Raraswati, A.,Triyana K., Triwahyudi., Rahman A. 2012. Differentiation of Bovine and Porcine Gelatins in Soft Candy Based on Amino Acid Profiles and Chemometric. *J. Food Pharm. Sci.* 2 (2014) 1-6.

Roger, Scott O., & Bendich A. J. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae, and fungi. *Plant Molecular Biology Manual*. Dl: 1-8.

Sambrook, J., & Russel, D. W. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual 3rd Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sargent, J.R., & S. G. George. 1975. Method in Zone Electrophoresis. BDH Chemical LTD. Poole England.

Sihotang, L. 2014. Isolasi DNA genom pada darah. Diakses pada tanggal 23 Juni 2018. <https://laurentsihotang.files.wordpress.com/2014/06/isolasi-dna-genom-pada-darah.pdf>.

Siregar, Raja Adil. 2017. *Polisi ciduk pengoplos daging sapi dan babi di lubuk lingau.* di akses pada tanggal 27 Mei 2017. <https://news.detik.com/berita/d-3519736/polisi-ciduk-pengoplos-daging-sapi-dan-babi-di-lubuklinggau>.

Solihin, Dedy Duryadi. 1994. *Ulas balik Peran DNA Mitokondria (mtDNA) dalam Studi Keragaman Genetik dan Biologi Populasi pada Hewan.* FMIPA IPB, Bogor.

Sulistyaningsih, Erma. 2007. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi.* Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Jember.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tenriulo, A., E Suryati, A. parenregi, Rosmiat. 2001. Ekstraksi DAN rumput laut Kappaphycus allvarezii dengan metod fenol kloroform. *Marina chimica acta*. 2(2): 6-10.

Titrawani. 1996. *Biodiversiti Kodok Genus Rana Ditinjau dari morfologi, kariotip dan pola protein di Kodya Swahlunto.* Program Pasca Sarjana ITB, Bogor.

Vivikananda, E. 2014. Deteksi DNA babi dan DNA sapi dengan menggunakan Metode *insulated Isothermal Polymerase Chain Reaction* (ii-PCR). Skripsi. Program studi Farmasi. UIN Syarif Hidayatulloh, Jakarta.

Wallace, D.C, Carol Stugard, Deborah Murdock, Theodore Schurr, dan Michael D. Brown., 1997. Ancient mtDNA Squences in the Human Nuclear Genome: A Potential Source of Errors In Identifying Pathogenic Mutation. *Proc. Natl. Acd. SCI. USA*. 95. 14900-14905.

Weissensteiner, T., Griffin, H.G., Griffin, A. 2004. *PCR Technology Current Innovations, Ed ke-2, Boca Raton*. CRC Press LLC. Florida.

Widayanti, R. 2006. Kajian penanda genetik gen *Cytochrome b* dan daerah D-Loop pada *Tarsius* sp. *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Yusuf, Z.K. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek.* 5(6): 1–6.

Yusop M, shuhaimi M., Yaakob B., Che Man, Abdul Rahman O dan Nur Fadilah K.M. 2011. Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial Cytochrome B generasi by molecular reacon probe real time polymerase chain reaction. *food analysis method.* 5: 422-429.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id