

BAB II

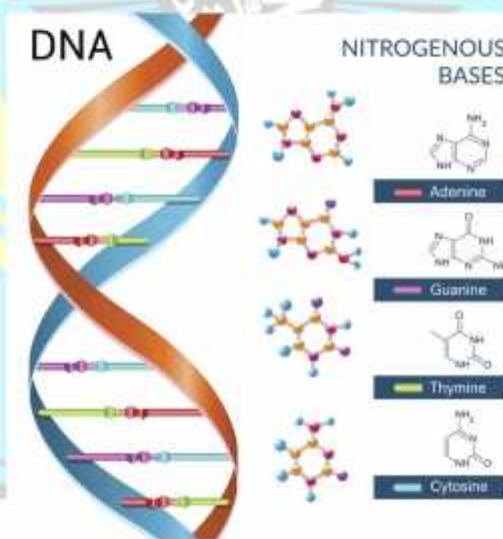
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sel

Sel merupakan unit terkecil dari makhluk hidup, dalam arti bahwa sel dapat hidup tanpa sel lain. Di alam, sel dapat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu prokariotik (sel bakteri) dan eukariotik. Ukuran sel prokariotik umumnya memiliki lebih kecil dengan struktur sederhana, sedangkan sel eukariotik memiliki ukuran lebih besar dengan struktur yang lebih kompleks.

Perbedaan antara kedua sel ini adalah terletak pada lokasi materi genetiknya (DNA). DNA prokariotik tidak dibatasi oleh membran inti, sedangkan pada sel eukariotik dibatasi oleh membran inti (Sumadi dan Marianti, 2007).

2.2 DNA



Gambar 1. Struktur DNA

(<https://www.medicalnewstoday.com/articles/319818.php>)

DNA merupakan polimer linear rantai panjang yang terdiri atas nukleotida. Nukleotida yaitu unsur pembangun asam nukleat yang mengandung

satu gugus fosfat, gula dan sebuah basa purin atau pirimidin (molekul-molekul berbentuk cincin pipih mengandung nitrogen dan karbon). Jika nukleotida-nukleotida itu saling menyambung dalam jumlah besar disebut polinukleotida. Nukleotida-nukleotida terikat menjadi satu yang dihubungkan oleh gugus fosfat dengan residu deoksiribosa pada atom karbon 5' dengan nukleotida berikutnya pada atom karbon 3' yang membentuk rantai-rantai polipeptida. Ikatan ini menjadi tulang punggung DNA.

DNA terdiri dari basa purin (adenosin dan guanin) dan pirimidin (timin dan sitosin), jumlah adenosin sama dengan jumlah timin, sedangkan jumlah guanin sama dengan jumlah sitosin. Masing-masing basa purin dan pirimidin dihubungkan oleh ikatan hidrogen. Meskipun ikatan-ikatan hidrogen ini sangat lemah, namun setiap nukleotida mengandung begitu banyak basa sehingga rantai-rantai komplementernya tidak pernah terpisah secara spontan pada kondisi fisiologis. Akan tetapi, jika DNA terkena pengaruh suhu yang mendekati titik didih, maka banyak pasangan DNA yang putus sehingga heliks gandanya terbelah menjadi rantai-rantai komplementernya (denaturasi).

Proses denaturasi pun dapat dipengaruhi oleh pH yang ekstrim ($\text{pH} < 3$ atau $\text{pH} > 10$). Namun proses denaturasi ini dapat kembali lagi pada posisi normal (renaturasi) membentuk heliks-heliks ganda asal jika kondisi dikembalikan pada suhu subdenaturasi (mendekati 60°C). Akan tetapi proses renaturasi dapat menjadi tidak sempurna jika suhu tidak begitu mengikat atau suhu lebih rendah.

2.3 Gen Spesifik

Teknik DNA rekombinan ini dapat digunakan untuk menghasilkan klon DNA (spesies spesifik) dan dapat digunakan sebagai primer untuk mendeteksi spesies tertentu dalam suatu produk daging olahan. Ada beberapa pendekatan yang dapat digunakan untuk mengembangkan pelacak spesifik. Pendekatan yang memanfaatkan kemajuan bioinformatika dan teknik PCR, saat ini merupakan salah satu cara yang relatif dapat dilakukan. Pengembangan penanda spesifik gen dengan memanfaatkan informasi dari *database* yang diakses dari internet.

Urutan primer dapat dibuat dengan menggunakan *software* komputer. Urutan nukleotida dianalisis BLAST untuk menentukan daerah-daerah terkonservasi, dan urutan nukleotidanya dikonfirmasi. Dua diantara daerah tersebut dipilih untuk dasar merancang sepasang primer. Perancangan ini dapat dilakukan dengan program *primer3* secara *online* ataupun secara semimanual dengan memperhatikan parameter-parameter yang umum, antara lain jumlah nukleotida, kandungan G-C 50% atau lebih (Sasmito, 2014).

Penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh (Fontanesi, 2008), menunjukkan bahwa gen amelogenin terdapat pada kromosom X dan Y yang dapat digunakan untuk membedakan jenis kelamin hewan. Gen amelogenin dijadikan target karena banyak ditemukan pada kromosom X dan Y mamalia. Penelitian ini kemudian dijadikan dasar identifikasi jenis kelamin daging yang diperjualbelikan dipasaran. Tidak cukup sampai disitu, penelitian ini kemudian dilengkapi karena hanya mampu mendeteksi gen amel pada region 3 dengan menggunakan PCR namun hasil dari PCR ini harus divisualisasi menggunakan

polyacrilamid gel elektrophoresis karena ukuran fragmennya yang kecil sekitar 9 bp. Hasil studi ini kemudian mendorong penelitian lain menggunakan target gen amelogenin untuk membedakan asal daging dari babi jantan atau betina, dengan mengamplifikasi gen menggunakan primer dengan panjang fragmen DNA sekitar 741 bp untuk babi betina dan 562 bp untuk babi jantan (langen, dkk., 2010). Hasil penelitiannya masih memiliki kekurangan karena tidak dapat mengidentifikasi gen pada daging yang telah mengalami pengolahan sehingga ukuran fragmentasi DNA menjadi lebih pendek.

Identifikasi DNA menggunakan PCR dengan primer spesifik dapat mengetahui ada tidaknya kontaminasi (Erwanto, 2011). Penelitian (Kasmen dkk, 2007) mendapatkan hasil yang dapat mendeteksi kontaminasi sampai level 1% dengan menggunakan *species-specific primer* untuk mendeteksi spesies daging pada produk sosis dengan beberapa variasi campuran daging. Desain *species-specific primer* didapatkan dari gen ATPase8 (*ATP synthase subunit 8*), ATPase6 (*ATP synthase subunit 6*), ND2 (*NADH dehydrogenase subunits 2*) dan ND5 (*NADH dehydrogenase subunits 5*).

Primer yang digunakan dalam amplifikasi fragmen DNA spesifik untuk sapi dan babi mengacu pada Kocher (1989) dan Sulandari (1997). Primer P14 pengait lokus PRE-1 yang hanya terdapat pada genom babi.

Tabel 2. Hasil pencarian hasil sekuensing sampel DNA babi menggunakan primer P14 dengan data sekuen DNA babi dari NCBI.

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

Berdasarkan Tabel 2. diperoleh hasil bahwa kemiripan hasil sekuensing produk PCR dan sekuen database spesies *Sus scrofa* menunjukkan bahwa primer P14 baik untuk mengidentifikasi DNA babi pada sosis (Priyanka, 2017). Urutan basa dan ukuran Primer P14. Primer (P14) spesifik untuk babi (Sulandari, 1997) *Forward* 5' C CCC GTC TCC TTC CTC CGG TGG TTG ATG 3' (28 basa) *Reverse* 5' C TGC GAC ACA TGA TGC CTT TAT GTC CCA GC 3' (30 basa) Primer spesifik untuk sapi (Kocher *et al.*, 1989) *Forward* 5' GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA 3' (38 basa) *Reverse* 5' CTA GAA AAG TGT AAG ACC CGT AAT ATA AG 3' (29 basa).

2.4 Kornet

Kornet *beef* adalah makanan yang dibuat dari daging sapi tanpa tulang (*deboned*) atau hasil potongan daging yang telah dicincang dengan menambahkan bahan pengawet untuk mempertahankan warna daging agar tampak segar, yang sudah mengalami proses pengaraman (*curing*) sebelum dikalengkan. Bahan baku kornet terbuat dari daging ayam, domba, babi dan sapi. Di Indonesia dapat

dijumpai kornet dalam wadah kaleng ataupun dalam bentuk sachet (Griffin and Lewis, 2009), Cit (Ramadhan dkk., 2013).

Kasus pencampuran daging sapi dengan daging babi baik yang masih mentah maupun pada produk olahan banyak ditemukan di Indonesia. Adanya pencampuran daging babi pada daging sapi di temukan di pasar tradisional Ibh, Kota Payakumbuh, Sumatera Barat. Kandungan daging babi juga ditemukan pada dendeng sapi di Malang Jawa Timur (Irawati, 2009). Dua dari tiga produk makanan halal di Saudi Arabia yang dideteksi oleh (Alaraidh, 2008) dengan menggunakan primer spesifik DNA babi, terbukti mengandung campuran daging babi. Penelitian yang dilakukan Mulyana (2010) pada kornet sapi, menemukan satu dari enam kornet sapi yang DNAny teramplifikasi oleh primer spesifik babi.

2.5 PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu teknik amplifikasi asam nukleat *in vitro* yang paling banyak dipelajari dan digunakan secara luas. Dalam waktu sembilan tahun sejak pertama kali ditemukan oleh ilmuwan dari *Cetus Corporation*, PCR telah berkembang menjadi teknik utama dalam laboratorium biologi molekuler, antara lain untuk transkripsi *in vitro* dari PCR *template*, PCR rekombinan, *DNAse I footprinting*, *Sequencing* dengan bantuan *phage promoters*, dan sebagainya (Putra, 1999).

PCR digunakan untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan DNA target tersebut dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu *thermocycle*. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai

ribuan nukleotida yang posisinya diapit sepasang primer. Primer yang berada sebelum daerah target disebut primer *forward* dan yang berada setelah daerah target disebut primer *reverse*. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA yang baru dikenal disebut enzim polimerase. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP, dCTP, dGTP dan dTTP (Muladno, 2010).

PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan, yaitu pemisahan (denaturasi) rantai DNA *template*, penempelan (*annealing*) pasangan primer pada DNA target dan pemanjangan (*extention*) primer atau reaksi polimerase yang dikatalis oleh DNA polimerase (Gaffar, 2007).

Pada akhir siklus pertama, suatu molekul DNA untai ganda dilipatgandakan jumlahnya menjadi dua molekul DNA untai ganda. Dua molekul DNA untai ganda hasil amplifikasi pada siklus pertama menjadi DNA target dan dilipatgandakan menjadi empat molekul DNA, dan selanjutnya empat molekul baru ini dilipatgandakan lagi jumlahnya menjadi delapan dan seterusnya (Muladno, 2010).

2.5.1 Komponen PCR

1. DNA *template*

DNA *template* adalah molekul DNA untai ganda yang mengandung sekuen target yang akan diaplifikasi. Ukuran DNA bukan merupakan faktor utama keberhasilan PCR, berapapun panjangnya jika tidak mengandung sekuen yang diinginkan maka tidak akan berhasil proses suatu PCR, namun

sebaliknya jika ukuran DNA tidak terlalu panjang tapi mengandung sekuen yang diinginkan maka PCR akan berhasil.

Konsentrasi DNA juga dapat mempengaruhi keberhasilan PCR. Jika konsentrasinya terlalu rendah maka primer mungkin tidak dapat menemukan target dan jika konsentrasi terlalu tinggi akan meningkatkan kemungkinan *mispriming*. Disamping itu perlu diperhatikan kemurnian *template* karena akan mempengaruhi hasil reaksi.

2. Primer

Susunan primer merupakan salah satu kunci keberhasilan PCR. Pasangan primer terdiri dari 2 oligonukleotida yang mengandung 18-28 nukleotida dan mempunyai 40-60% GC *content*. Sekuen primer yang lebih pendek akan memicu amplifikasi produk PCR non spesifik. Ujung 3' primer penting dalam menentukan spesifitas dan sensitivitas PCR. Ujung tidak boleh mempunyai tiga atau lebih basa G atau C, karena dapat menstabilisasi *annealing* primer non spesifik. Disamping itu, ujung 3' kedua primer tidak boleh komplementer satu dengan yang lain, karena hal ini akan mengakibatkan pembentukan *primer-dimer* yang akan menurunkan hasil produk yang diinginkan. Ujung 5' primer tidak terlalu penting untuk *annealing* primer sehingga memungkinkan untuk menambahkan sekuen tertentu misalnya sisi restriksi enzim, *start codon* ATG atau sekuen *promoter*. Konsentrasi primer biasanya optimal pada 0.1-0.5 μM .

Konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan menyebabkan *mispriming* (penempelan pada tempat yang tidak spesifik) dan akumulasi produk non spesifik serta meningkatkan kemungkinan terbentuk *primer-dimer*, sebaliknya bila konsentrasi primer terlalu sedikit maka PCR menjadi tidak efisien sehingga hasilnya rendah.

3. DNA polymerase

DNA *polymerase* adalah enzim yang mengkatalisis polimerisasi DNA. Dalam perkembangannya, kini banyak digunakan enzim *Taq DNA Polymerase* yang memiliki keaktifan pada suhu tinggi sehingga penambahan enzim tidak perlu dilakukan disetiap siklus dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin (Gaffar, 2007).

Enzim *Taq DNA polymerase* terdiri atas 2 macam yaitu enzim alami yang diisolasi dari sel bakteri *Thermus aquaticus* dan enzim rekombinan yang disintesis dalam sel bakteri *Escherchia coli* (Muladno, 2010). Enzim ini masih mempunyai aktifitas eksonuklease dari 5' ke 3' tetapi tidak mempunyai aktifitas eksonuklease dari 3' ke 5'. Konsentrasi enzim yang dibutuhkan untuk PCR biasanya 0.5-2.5 unit. Kelebihan jumlah enzim mengakibatkan akumulasi produk yang diinginkan (Sulistyaningsih, 2007).

4. Deoxynukleotida Triphosphate (dNTP)

Deoxynukleotida Triphosphate merupakan material utama untuk sintesis DNA dalam proses PCR yang terdiri dari dATP, dCTP, dGTP dan dTTP. Konsentrasi dNTP masing-masing sebesar 20-200 μM dapat menghasilkan keseimbangan optimal antara hasil, spesifisitas dan ketepatan

PCR. Konsentrasi masing-masing dNTP harus seimbang untuk meminimalkan kesalahan penggabungan.

Deoxynukleotida Triphosphate akan menurunkan Mg^{2+} bebas sehingga mempengaruhi aktifitas polimerase dan menurunkan *annealing* primer. Konsentrasi dNTP yang rendah akan meminimalkan *mispriming* pada daerah non target dan menurunkan kemungkinan perpanjangan nukleotida yang salah. Oleh karena itu spesifisitas dan ketepatan PCR meningkat pada konsentrasi dNTP yang lebih rendah (Sulistyaningsih, 2007).

5. Larutan *buffer*

Larutan *buffer* yang biasa digunakan untuk 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).

6. Kofaktor Ion Metal

Magnesium klorida merupakan kofaktor esensial untuk DNA *polymerase* yang digunakan didalam PCR dan konsentrasinya harus dioptimasi untuk setiap sistem primer *template*. Keberadaan ion magnesium yang bebas penting sebagai kofaktor enzim dalam PCR. Konsentrasi ion ini mempengaruhi beberapa hal yaitu *annealing* primer, suhu pemisah untai *template* dan produk PCR, spesifisitas produk, pembentukan primer-dimer serta aktivitas dan ketepatan enzim *Taq Polymerase*. Konsentrasi ion magnesium harus melebihi total konsentrasi dNTP. Biasanya, untuk memulai proses optimasi, sebanyak 1.5 mM $MgCl_2$ ditambahkan kedalam PCR yang

didalamnya terdapat 0.8 mM dNTP, sehingga terdapat sekitar 0.7 mM magnesium bebas untuk DNA *polymerase*. Secara umum, ion magnesium harus divariasikan dalam seri konsentrasi dari 1.5-4.0 mM (Kolmodin dan Birch, 2002).

2.5.2 Tahapan PCR

Berikut ini merupakan tahapan yang terjadi pada proses PCR (Muladno, 2010; Gaffar, 2007; Sulistyaningsih, 2007).

1. Denaturasi

Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusnya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan (Gaffar, 2007). Predenaturasi 94°C selama 40 menit, Denaturasi dilakukan pada suhu 95°C selama 30 detik untuk meyakinkan bahwa molekul DNA yang ditargetkan ingin dilipatgandakan jumlahnya benar-benar telah terdenaturasi menjadi untai tunggal. Untuk denaturasi berikutnya, waktu yang diperlukan hanya 30 detik pada suhu 95°C (Erwanto, 2012)

Suhu denaturasi dipengaruhi oleh sekuen target. Jika sekuen target kaya akan G-C maka diperlukan suhu yang lebih tinggi. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi dan waktu denaturasi yang terlalu lama mengakibatkan hilangnya atau berkurangnya aktivitas enzim Taq *polymerase*. Waktu paruh aktivitas enzim tersebut adalah >2 jam pada suhu 92.5°C, 40 menit pada suhu

95°C dan 5 menit pada suhu 97.5°C (Muladno, 2010 & Sulistyaningsih, 2007).

2. *Annealing*

Pada tahap penempelan primer (*annealing*), primer menuju daerah spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing* ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada *template*. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu *melting time* (T_m) primer, yaitu suhu dimana separuh jumlah primer menempel pada *template*. Suhu *Annealing* yang digunakan yaitu 62°C (gen babi primer P14) dan 49°C (gen sapi). semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya (Muladno, 2010). Selanjutnya, DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya (Gaffar, 2007). Suhu dan lamanya waktu yang dibutuhkan untuk *annealing* primer juga tergantung pada komposisi basa, panjang dan konsentrasi primer (Sulistyaningsih, 2007).

3. Reaksi Polimerisasi

Reaksi polimerisasi (*extention*) atau perpanjangan rantai, terjadi pada suhu 72°C selama 2 menit karena merupakan suhu optimum Taq *polymerase*, sedangkan untuk final *extention* berada pada suhu 72°C selama 7 menit. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'-nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan *template* oleh DNA *polymerase* (Gaffar, 2007).

Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan antara 35 sampai 100 nukleotida perdetik, bergantung pada *buffer*, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian, untuk produk PCR sepanjang 2000 pasang basa, waktu satu menit sudah lebih dari cukup untuk tahap pemanjangan primer ini. Biasanya diakhir siklus PCR, waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai lima menit, sehingga seluruh produk PCR diharapkan berbentuk DNA untai ganda (Muladno, 2010).

2.6 Elektroforesis Agarose

Elektroforesis agarose didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyanggah matriks stabil dibawah pengaruh medan listrik. Media yang umum digunakan adalah gel agarose. Elektroforesis agarose digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 bp dan dijalankan secara horizontal (Gaffar, 2007).

Pencampuran antara DNA dengan *loading dye* dilakukan sebelum proses elektroforesis. *Loading dye* terdiri dari *glycerol*, *bromphenol blue* dan *xylene cyanol FF*. *glycerol* berfungsi sebagai pemberat sehingga DNA berada dibawah sumuran, sedangkan *bromphenol blue* dan *xylene cyanol FF* berfungsi sebagai visualisasi pada gel sehingga proses migrasi DNA pada saat berlangsungnya elektroforesis tidak melebihi batas gel (Carson, 2006).

Larutan DNA yang bermuatan negatif dimasukkan kedalam sumur-sumur yang terdapat dalam gel agarose dan diletakkan dikutub negatif, apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan *buffer* yang sesuai maka DNA

akan bergerak ke kutub positif. Laju migrasi DNA dalam medan listrik berbanding terbalik dengan massa DNA. Migrasi DNA terutama ditentukan oleh ukuran panjang dan bentuk DNA. Fragmen DNA yang berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan yang berukuran besar, sehingga elektroforesis mampu memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran panjangnya.

Kecepatan migrasi DNA ditentukan oleh beberapa faktor diantaranya (Muladno, 2010) :

1. Ukuran molekul DNA

Migrasi molekul DNA berukuran besar lebih lambat daripada migrasi molekul berukuran kecil.

2. Konsentrasi agarose

Migrasi molekul DNA pada gel berkonsentrasi lebih rendah lebih cepat daripada migrasi molekul DNA yang sama pada gel berkonsentrasi tinggi. Oleh karena itu, penentuan konsentrasi agarose dalam membuat gel harus memperhatikan ukuran molekul DNA yang akan dianalisis.

3. Konformasi DNA

Konformasi atau bentuk rangkaian molekul DNA berukuran sama akan bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda.

4. Voltase yang digunakan

Dalam voltase, kecepatan migrasi DNA sebanding dengan tingginya voltase yang digunakan. Akan tetapi apabila penggunaan voltase dinaikkan, mobilitas molekul DNA meningkat secara tajam. Ini

mengakibatkan pemisahan molekul DNA didalam gel menurun dengan meningkatnya voltase yang digunakan. Penggunaan voltase yang ideal untuk mendapatkan separase molekul DNA berukuran lebih besar 2 kb adalah tidak lebih dari 5 Volt per cm.

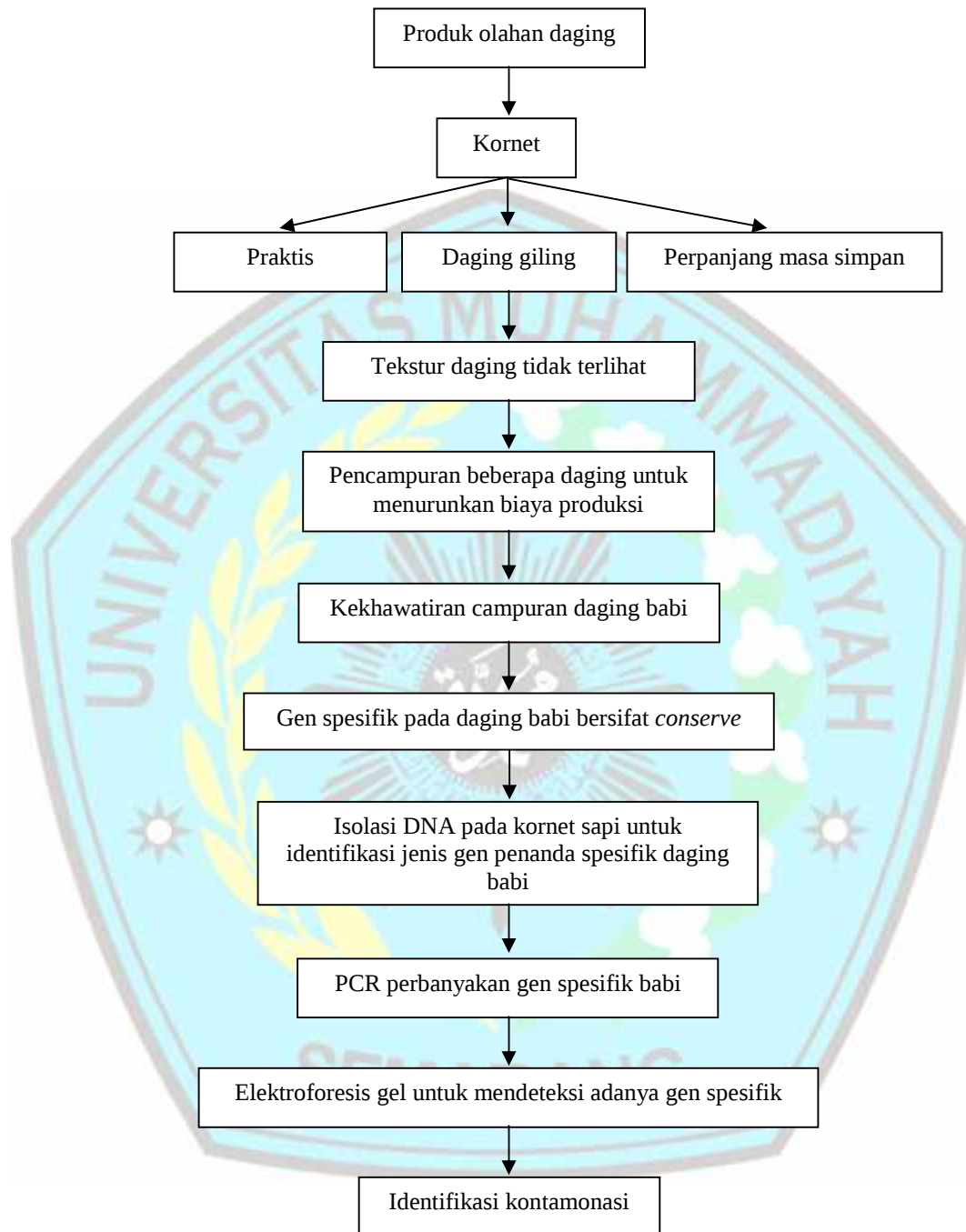
5. Pewarna SBYR *safe* didalam gel

Pewarna SBYR *safe* membuat DNA berpendar dibawah sinar UV. Pita DNA yang berpendar pada gel agarosa menunjukkan hasil positif bahwa terdapat DNA pada setiap lajur (Sambrook dan Russel, 2001).

6. Komposisi larutan *buffer*

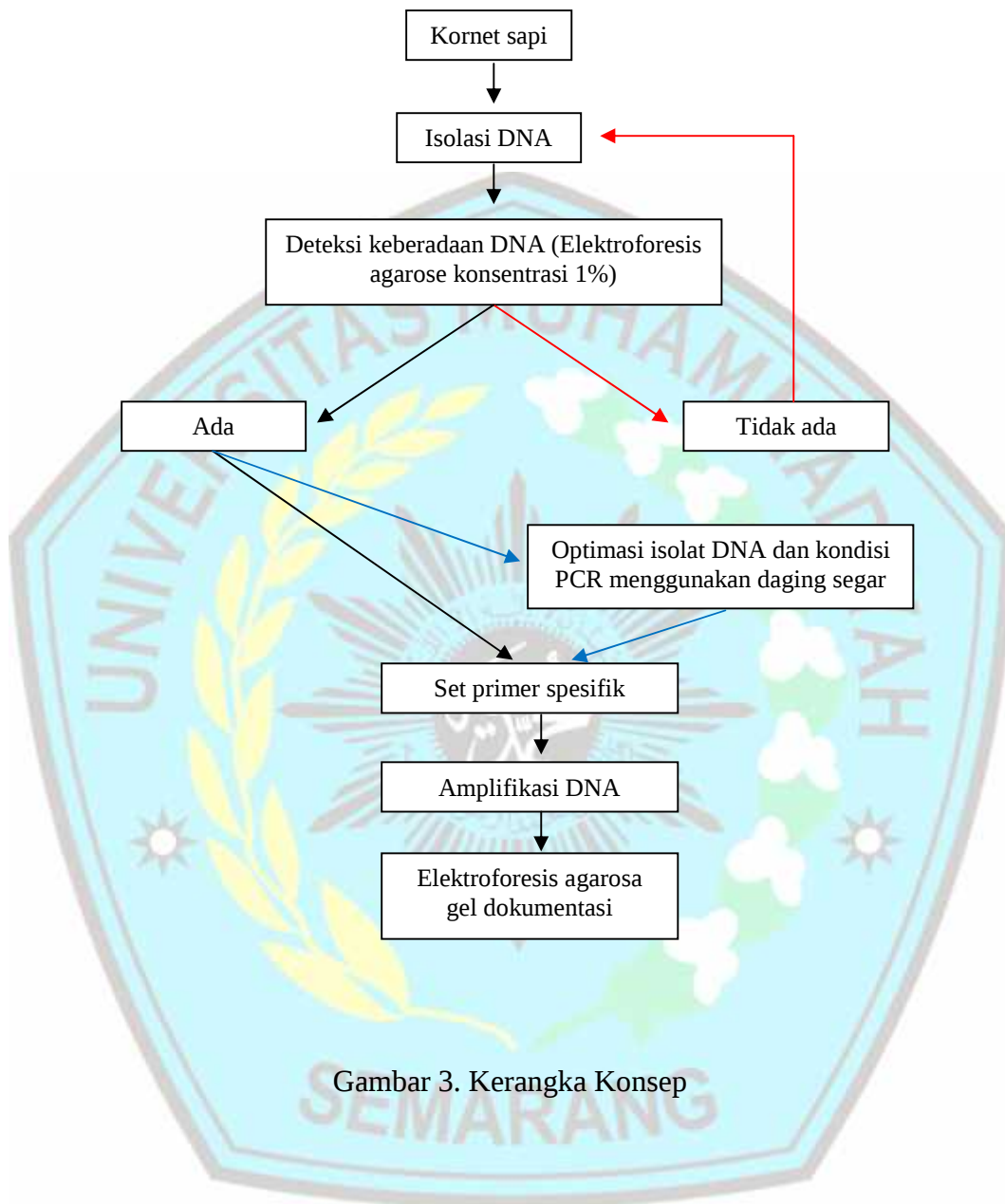
Apabila tidak ada kekuatan ion didalam larutan, maka aliran listrik akan sangat minimal dan migrasi DNA sangat lambat. Sementara larutan *buffer* berkekuatan ion tinggi akan meningkatkan panas, sehingga aliran listrik menjadi sangat maksimal. Ada kemungkinan gel akan meleleh dan DNA dapat mengalami denaturasi.

2.7 KERANGKA TEORI



Gambar 2. Kerangka Teori

2.8 KERANGKA KONSEP



Gambar 3. Kerangka Konsep