

Perancangan Primer untuk Deteksi Kandungan Gen *Cytochrome b* Babi dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* dan Aplikasinya pada Berbagai Produk Industri

*Dianti Devi Astari, Sania Gustiani Dewi, Sinta Setyaningrum, Bevi Lidya**

Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Bandung, Kota Bandung, 40599, Indonesia

INFO ARTIKEL

Diterima 01 September 2021
Disetujui 28 Desember 2021

Key word:
Primer Design
Pig cytochrome b gene
Polymerase Chain Reaction

Kata kunci:
Perancangan Primer
Gen cytochrome b babi
Polymerase Chain Reaction

ABSTRACT

Types of meat from food products that circulating in the market can be detected by Polymerase Chain Reaction with the cytochrome b gene as a marker. The most important and characteristic component for the PCR reaction is the primer, which is an oligonucleotide that acts as an initiator in the PCR reaction. In this study, the primer designed was intended to amplify the pig cytochrome b gene. The design was carried out with the help of the Primer-BLAST application, and manually, three pairs of primers came from BLAST primers, and one pair of primers was designed manually. The primer that has been designed is tested on pork, beef, and food industry products, such as pork sausage, beef sausage, and chicken sausage. The results of PCR amplification were identified qualitatively using 1% Agarose Gel Electrophoresis and visualized using a UV transilluminator. The primer designed manually to produce the whole pig cytochrome b gene with a product size of 1140 bp has succeeded in amplifying the product and is specific because it only produces bands in pork samples, while in chicken and beef samples, it does not produce bands. The three pairs of primers suggested by Primer-BLAST could amplify the porcine cytochrome b gene with band sizes of 121 bp, 272 bp, and 262 bp, but they are not specified yet because it also can amplify the gene in beef and chicken samples. The manual primer design is the best primer and can be further used to detect foodstuffs contains pig genes by PCR.

ABSTRAK

Jenis daging dari produk pangan yang beredar di pasaran dapat dideteksi secara Polymerase Chain Reaction dengan gen cytochrome b sebagai marker. Komponen terpenting dan bersifat khas untuk reaksi PCR adalah primer, yaitu suatu oligonukleotida yang berperan sebagai inisiator dalam reaksi PCR. Pada penelitian ini, primer yang dirancang ditujukan untuk mengamplifikasi gen cytochrome b babi. Perancangan primer menghasilkan tiga pasang primer yang disarankan oleh primer-BLAST dan satu pasang primer yang dirancang manual. Pengujian primer dilakukan terhadap sampel daging babi, daging sapi serta produk industri pangan, yaitu sosis babi, sosis sapi dan sosis ayam. Hasil amplifikasi DNA menggunakan PCR diidentifikasi dengan elektroforesis gel agarose 1% dan divisualisasikan dengan alat UV transiluminator. Primer yang dirancang manual untuk menghasilkan gen cytochrome b babi secara utuh dengan ukuran produk 1140 bp telah berhasil mengamplifikasi produk dan bersifat spesifik karena hanya menghasilkan pita pada sampel babi sedangkan pada sampel ayam dan sapi tidak menghasilkan pita. Tiga pasang primer yang disarankan oleh Primer-BLAST mampu mengamplifikasi gen cytochrome b babi dengan ukuran pita sebesar 121 bp, 272 bp dan 262 bp, namun belum spesifik karena dapat mengamplifikasi gen pada sampel sapi dan ayam. Primer yang dirancang manual adalah primer terbaik dan dapat digunakan untuk mendeteksi kandungan babi secara PCR

*e-mail: bevi_lidya@polban.ac.id

*Telp: 085863244833

Pendahuluan

Seiring dengan berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi, terdapat pergantian cara pengolahan dan pemanfaatan bahan baku untuk produk industri khususnya pada bahan pangan yang semula bersifat alamiah dan sederhana menjadi hasil dari rekayasa ilmu pengetahuan. Pengolahan produk dengan memanfaatkan kemajuan ini memungkinkan terdapat campuran bahan baku atau bahan-bahan lain.

Terdapat berbagai jenis metode analisa yang telah dikembangkan untuk mendeteksi jenis-jenis daging yang digunakan dalam produk pangan olahan; seperti daging babi, sapi atau ayam, seperti FTIR, kromatografi, ELISA, *electronic nose*, LC-MS/MS, *isoelectric focusing* dan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Salah satu metode analisis yang cukup menjanjikan, yaitu deteksi secara biomolekuler menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Kelebihan dari metode ini memiliki sensitivitas yang tinggi serta waktu analisa yang lebih cepat [1]. Selain itu, jumlah sampel DNA yang dibutuhkan dalam metode PCR hanya sedikit dan deteksinya tidak terpengaruh oleh tahap perkembangan dan lingkungan. Pada penelitian ini akan dicoba deteksi kandungan daging babi dalam produk olahan.

Salah satu komponen yang berperan penting dalam keberhasilan proses PCR adalah primer. Primer adalah nukleotida yang berukuran 18-30 nt dan digunakan untuk membatasi fragmen DNA target yang akan diamplifikasi [2]. Perancangan primer perlu diperhatikan dan dipilih sesuai dengan kriteria yang ada, agar primer tersebut dapat menempel secara spesifik dan efisien pada fragmen DNA target. Salah satu gen yang dapat digunakan sebagai penanda spesifik antar satu spesies dengan spesies mamalia lain adalah gen *cytochrome b*. [3].

Di Indonesia, perancangan primer untuk mendeteksi gen *cytochrome b* babi sudah pernah dilakukan oleh peneliti lain. Fidia dkk., menggunakan primer p14 yang berasal dari gen *cytochrome b* babi dengan panjang produk 481 bp untuk mendeteksi daging babi pada produk bakso di pusat Kota Salatiga menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction*. Hasil menunjukkan adanya pita spesifik berukuran

481 bp pada daging babi dan sampel bakso nomor 13 yang mengandung daging babi. Hal ini menunjukkan bahwa gen penanda yang digunakan, yaitu *cytochrome b* babi spesifik dalam mendeteksi kandungan babi [4]. Namun demikian, berdasarkan hasil *study*, urutan primer p14 tidak ditemukan posisi penempelan primer pada gen *cytochrome b* babi.

Pada penelitian ini akan dilakukan perancangan primer untuk amplifikasi gen *cytochrome b* babi dan dapat ditunjukkan posisi penempelan primer tersebut pada gen *cytochrome b* babi sehingga efektivitas sebagai primer untuk deteksi gen *cytochrome b* babi dapat terjamin. Perancangan primer ini diharapkan mampu menunjang pengembangan metode deteksi kandungan babi pada suatu produk dan akan digunakan untuk mendeteksi produk pangan yang beredar di Indonesia.

Bahan dan Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Politeknik Negeri Bandung. Tahap awal dimulai dengan perancangan primer dari gen *cytochrome b* babi menggunakan program Primer-BLAST dan secara manual, isolasi DNA *template* menggunakan Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega dan uji kemurnian isolat DNA menggunakan elektroforesis gel agarose 1% serta pengujian primer untuk deteksi kandungan gen *cytochrome b* babi dengan metode *Polymerase Chain Reaction*.

Alat dan Bahan

Alat dan instrumen yang digunakan adalah gelas kimia, gelas ukur, corong gelas, batang pengaduk, mortar dan alu, lemari pendingin, *waterbath*, *stopwatch*, *microcentrifuge tube*, vortex, *sentrifuge*, mikropipet, neraca analitik, spatula, labu erlenmeyer, *microwave*, tray elektroforesis, *comb* elektroforesis, tangki elektroforesis, UV *transilluminator*, mesin *Polymerase Chain Reaction* dan *Bio Safety Cabinet type A II*. Sedangkan program yang digunakan untuk perancangan primer, yaitu Primer-BLAST NCBI dan NetPrimer yang menggunakan database dari NCBI.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging babi, daging sapi, sosis babi, sosis sapi dan sosis ayam, Wizard Genomic

DNA Purification Kit Promega, *aquadest*, serbuk agarosa, larutan *buffer TAE 1X*, alkohol 70%, pewarna DNA *Diamond Nucleic Acid Dye*, blue/orange *loading dye*, DNA *ladder 1kb*, kertas *parafilm*, GoTaq *Green Master Mix*, *water for injection*, *nuclease free water*, primer, tisu, label, sarung tangan dan masker.

Metode

Perancangan Primer

Sekuen nukleotida gen *cytochrome b* babi, didapatkan dengan cara mencari data pada database *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menggunakan penelusuran di kotak pencarian dengan kata kunci, yaitu *CYTB sus scrofa* [5].

Perancangan primer menggunakan program Primer BLAST dilakukan dengan cara menempelkan sekuen nukleotida gen *cytochrome b* babi yang telah diambil dalam format FASTA pada *template* kosong. Tekan tombol "Get Primers" untuk mendapatkan beberapa pasang primer dengan susunan basa nukleotida yang berbeda-beda. Perancangan secara manual dibuat berdasarkan parameter panjang primer yang berkisar antara 18 sampai 30 nukleotida.

Beberapa pasang primer yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan program NetPrimer sehingga didapat data hasil analisis berupa sifat-sifat dan struktur sekunder dari masing-masing primer. Pemilihan primer terbaik dilakukan dengan mempertimbangkan nilai % GC, panjang basa, *temperature melting* (T_m), *hairpin*, *self dimer* dan *cross dimer* dari beberapa primer tersebut. Primer hasil rancangan dipesan ke IDT dengan memberikan data berupa urutan nukleotida primer.

Isolasi DNA

Sampel yang telah dihaluskan sebanyak 50 mg dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml lalu ditambahkan *nucleic lysis solution* sebanyak 600 μ L. Campuran tersebut dihomogenkan selama 1-3 detik dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit. Masing-masing campuran yang sudah diinkubasi ditambahkan larutan RNase sebanyak 3 μ L kemudian tabung dibolak-balik sebanyak 2-5 kali. Inkubasi kembali pada suhu 37°C selama

15 menit. Sampel dibiarkan mencapai suhu kamar. Selanjutnya *protein precipitation solution* sebanyak 200 μ L ditambahkan ke dalam campuran lalu divortex pada kecepatan tinggi selama 20 detik. Sentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Protein akan mengendap membentuk pelet. Supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke dalam tabung mikro sentrifuga 1,5 ml baru bersih yang sudah diisi 600 μ L isopropanol suhu kamar (biarkan pelet protein tetap di dasar tabung), larutan dalam tabung dicampurkan dengan dengan membolak-balik tabung hingga terbentuk massa DNA yang dapat terlihat. Tabung disentrifugasi pada 13,000 rpm selama 1 menit pada temperatur kamar. Supernatan dari tabung dipindahkan dan ditambahkan 600 μ L etanol 70% suhu kamar, kemudian tabung dibolak-balik dengan hati-hati beberapa kali untuk membilas DNA. Tabung disentrifugasi pada 13,000 rpm selama 1 menit pada temperatur kamar. Sisa etanol dikeringkan. Tabung dibalikkan di atas permukaan kertas penyerap yang bersih, pelet dikeringkan di udara selama 15 menit. 100 μ L DNA *rehydration solution* ditambahkan dan diinkubasi semalam pada temperatur kamar atau pada 4°C untuk rehidrasi DNA. DNA disimpan pada 2–8°C [6].

Uji Kemurnian Isolat DNA

Serbuk agarosa sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam 50 mL larutan *buffer TAE 1x* dan dimasukkan ke dalam *oven microwave* selama 2 menit hingga semua serbuk agarosa larut dan larutan berwarna jernih. Larutan agarosa yang telah larut sempurna didiamkan pada suhu ruang hingga suhu $\pm 60^\circ\text{C}$ dan ditambahkan pewarna DNA *Diamond Nucleic Acid Dye* sebanyak 5 μ L. Terakhir, larutan agarosa dituang ke dalam *tray* dan dipasang *comb* untuk membentuk 'sumur', gel yang terbentuk dibiarkan sampai mengeras (25-30 menit) dan *comb* dilepas. *Tray* dan *comb* yang digunakan telah dibersihkan terlebih dahulu menggunakan larutan alkohol 70%.

Tray yang telah berisi gel agarosa diletakkan pada tangki elektroforesis dan diisi oleh larutan *buffer TAE 1x* hingga gel agarosa terendam sekitar 1 mm di atas permukaan gel. Sebanyak 1 μ L blue/orange *loading dye*

dicampur dengan 5 µl DNA hasil isolasi yang diletakkan di atas kertas *parafilm* dan diaduk hingga homogen. Selanjutnya larutan dimasukkan ke dalam 'sumur' gel agarosa, setiap 'sumur' memuat masing-masing larutan DNA hasil isolasi. Kemudian DNA ladder 1 kb sebagai penanda juga dimasukkan ke dalam salah satu 'sumur' gel agarosa sebanyak 5 µl. Jika semua 'sumur' telah terisi, tangki elektroforesis ditutup dan dilakukan *running* dengan parameter yang diatur yaitu tegangan pada 100 volt selama 25 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, daya listrik dimatikan dan tray dikeluarkan dari tangki elektroforesis.

Proses visualisasi elektroforegram dilakukan menggunakan alat *UV transilluminator* dan didokumentasikan.

Pengujian Primer dengan metode PCR

Reaksi 1xPCR dibuat dengan komposisi sebagai berikut.

Tabel 1. Komponen PCR	
Komponen	Volume
Nuclease Free Water to	7,5 µL
GoTaq® Green Master Mix	12,5 µL
Primer Reverse 100µM	1,25 µL
Primer Forward 100µM	1,25 µL
DNA Template	2,5 µL
Total Volume	25 µL

Campuran komponen ditempatkan dalam *cycler* termal dan dilakukan proses PCR dengan program yang sudah dibuat sebanyak 30 siklus yang meliputi denaturasi, *annealing* dan *elongasi*.

Tabel 2. Pengaturan program PCR untuk primer CYTB-Full

Tahapan	Suhu (°C)	Waktu (detik)
Pre-denaturasi	93	180 detik
Denaturasi	93	60 detik
<i>Annealing</i>	46	30 detik
Elongasi	72	90 detik
Final Elongasi	72	180 detik

Tabel 3. Pengaturan program PCR untuk primer-BLAST

Tahapan	Suhu (°C)	Waktu (detik)
Pre-denaturasi	93	180 detik
Denaturasi	93	60 detik
<i>Annealing</i>	52	30 detik
Elongasi	72	60 detik
Final Elongasi	72	180 detik

Identifikasi hasil amplifikasi DNA dilakukan metode elektroforesis gel agarose 1%. Visualisasi elektroforegram dilakukan menggunakan alat *UV transilluminator* dan didokumentasikan.

Hasil dan Pembahasan

Perancangan Primer

Perancangan primer secara *in silico* dilakukan menggunakan program Primer-BLAST dengan 'pick primer' dari fragmen tertentu pada gen *cytochrome b* babi. Perancangan primer secara manual dilakukan dengan mengambil gen *cytochrome b* babi secara utuh dengan harapan lebih mampu mendeteksi secara spesifik gen *cytochrome b* babi, karena urutan keseluruhan nukleotida gen *cytochrome b* pada setiap organisme berbeda.

Berdasarkan hasil perancangan primer, diperoleh 12 kandidat primer yang dirancang secara manual dan 10 pasang primer yang dirancang menggunakan program Primer-BLAST. Masing-masing pasang kandidat primer diseleksi kembali sesuai dengan kriteria primer yang baik untuk amplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang meliputi panjang basa, *temperature melting*, kandungan GC serta struktur sekunder yang sebelumnya telah dilakukan dianalisis secara terpisah menggunakan program Net-Primer.

Panjang primer yang terlalu pendek akan mudah menyebabkan terjadinya penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan (*mispriming*). *Temperature Melting* primer yang baik berada pada rentang 50-65°C. Kandungan GC pada primer harus berada pada rentang 40-60%. Kriteria lain, yaitu struktur sekunder yang meliputi *hairpin*, *self-dimer* dan *cross-dimer*. Struktur sekunder dapat menyebabkan primer tidak dapat menempel dengan DNA *template*. Stabilitas struktur sekunder ditentukan oleh energi bebas (ΔG). Energi bebas merupakan

energi yang diperlukan untuk memecah struktur sekunder [7].

Berikut hasil rancangan primer secara manual dan menggunakan program Primer-BLAST yang dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Primer Hasil Rancangan

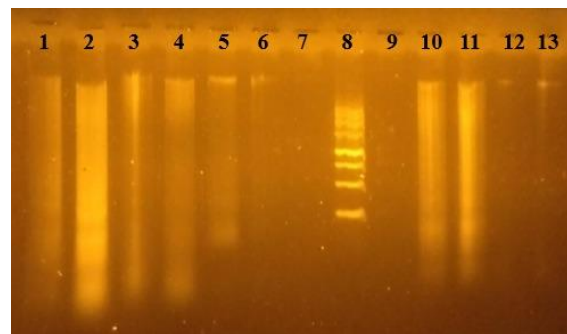
No.	Primer (Sekuens 5→3')	Panjang Produk	Panjang Primer	Tm (°C)	GC (%)	Hairpin	Self Dimer	Cross Dimer
						(kcal/mol)		
Primer CYTB-Full								
1	Forward ATGACCAACATCCGAAAATC	1140	20	50,7	40.0	-	-	
	Reverse TCATTTTAATAGGTTGTTTTCG		22	47,1	27.27	-	-4.85	
Primer-BLAST								
1	Forward CACCCCAGCAAACCCACTAA	121	20	57,7	55	-	-	-3.56
	Reverse GGCTACTAGGGCCAACACTC		20	57,4	60	-2.11	-9.28 -4,16	
2	Forward GACAAAGCAACCCTCACACG	272	20	56,7	55	-	-	-9.42 -8,64
	Reverse GGGTTTGCTGGGGTGTAGTT		20	57,7	55	-	-	-7.48 -5,84 -5.64 -4,29
3	Forward ACACGATTCTTCGCCTTCCA	262	20	56,7	50	-0.69	-	-6.02 -6,02
	Reverse TTAGTGGGTTTGCTGGGGTG		20	57,7	55	-	-	-4,3

Adapun beberapa ketidaksesuaian dari primer yang dipilih terhadap kriteria primer yang baik, yaitu kandungan GC dan Tm pada primer *reverse* CYTB-Full dan beberapa struktur sekunder yang masih terbentuk. Ketiga hal tersebut dapat ditoleransi karena kriteria utama diambil dari kedekatan *temperature melting* pasangan primer. Nilai *temperature melting* sangat penting karena berhubungan dengan pemilihan suhu *annealing* dimana merupakan suhu yang digunakan agar primer dapat menempel pada DNA *template*. Jika terjadi kekeliruan pada pemilihan suhu *annealing*, maka tidak terjadi amplifikasi pada proses PCR.

Isolasi dan Uji kemurnian Isolat DNA

Pada gambar 1 dapat dilihat bahwa sampel daging babi dan daging sapi terlihat adanya pita DNA yang menandakan proses isolasi telah berhasil, namun pita tersebut belum terlihat jelas karena kuantitas DNA yang terdeteksi hanya sedikit. Hal ini disebabkan karena sampel tidak seluruhnya masuk ke dalam 'sumur' gel agarose. Sedangkan pada sampel

sosis babi, sosis sapi dan sosis ayam tidak terdapat pita DNA dan terlihat *smear* di sepanjang lajur. *Smear* disebabkan oleh dua faktor. Pertama sampel sosis mengandung unsur kompleks, seperti polisakarida dan lemak yang dapat mengkontaminasi kemurnian DNA [8], sehingga diperlukan KIT isolasi DNA khusus untuk bahan pangan olahan. Faktor berikutnya akibat adanya proses *grinding*, *milling*, tekanan mekanik dan hidrolisis enzimatis pada saat proses pembuatan [9].



Gambar 1. Elektroforegram Isolat DNA

Keterangan:

- | | |
|----------------------|---------------------------|
| 1. DNA Sosis ayam 1 | 7. DNA <i>Ladder</i> 1 kb |
| 2. DNA Sosis ayam 2 | 8. – |
| 3. DNA Sosis Sapi 1 | 9. DNA Sosis babi 1 |
| 4. DNA Sosis Sapi 2 | 10. DNA Sosis babi 2 |
| 5. DNA Daging sapi 1 | 11. DNA Daging babi 1 |
| 6. DNA Daging sapi 2 | 12. DNA Daging babi 2 |

Pada [gambar 1](#) dapat dilihat bahwa sampel daging babi dan daging sapi terlihat adanya pita DNA yang menandakan proses isolasi telah berhasil, namun pita tersebut belum terlihat jelas karena kuantitas DNA yang terdeteksi hanya sedikit. Hal ini disebabkan karena sampel tidak seluruhnya masuk ke dalam ‘sumur’ gel agarose. Sedangkan pada sampel sosis babi, sosis sapi dan sosis ayam tidak terdapat pita DNA dan terlihat *smear* di sepanjang lajur. *Smear* disebabkan oleh dua faktor. Pertama sampel sosis mengandung unsur kompleks, seperti polisakarida dan lemak yang dapat mengkontaminasi kemurnian DNA [8], sehingga diperlukan KIT isolasi DNA khusus untuk bahan pangan olahan. Faktor berikutnya akibat adanya proses *grinding*, *milling*, tekanan mekanik dan hidrolisis enzimatis pada saat proses pembuatan [9].

Pengujian Primer dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*

Pada program PCR, suhu annealing yang digunakan, yaitu 3-5°C di bawah *temperature melting* dari primer [10]. Sementara perbedaan waktu pada tahap elongasi dikarenakan produk yang dihasilkan oleh primer CYTB-Full lebih panjang, sehingga Taq DNA Polymerase membutuhkan waktu yang lebih lama untuk membentuk untai DNA baru.

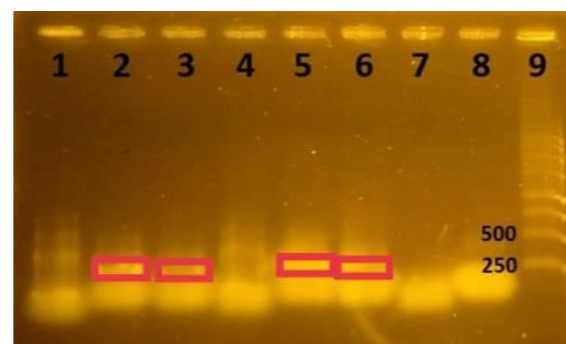


Gambar 2. Elektroforegram Hasil PCR Primer CYTB-Full

Keterangan:

- | | |
|----------------------|---------------------------|
| 1. DNA Daging babi 1 | 7. DNA Daging Sapi |
| 2. DNA Daging babi 2 | 8. – |
| 3. DNA Sosis babi 1 | 9. DNA <i>Ladder</i> 1 kb |
| 4. DNA Sosis babi 2 | 10. – |
| 5. DNA Sosis Ayam | 11. Kontrol (-) |
| 6. DNA Sosis Sapi | |

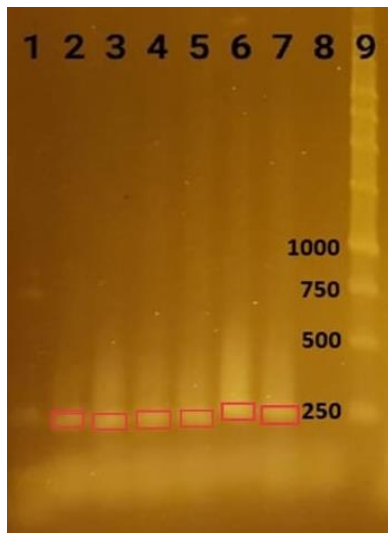
Hasil elektroforegram amplifikasi menggunakan primer CYTB-Full ditunjukkan pada Gambar. Sampel daging babi dan sosis membentuk pita pada ukuran 1140 bp. Ini menunjukkan bahwa primer mampu mendeteksi DNA babi. Pada sampel sosis sapi dan sosis ayam tidak terbentuk pita DNA, artinya primer spesifik terhadap DNA babi. Adapun pita DNA yang terbentuk pada sampel daging sapi berasal dari kontaminasi karena tipisnya pita yang dihasilkan dan tidak terbentuk pita pada sampel sosis sapi.



Gambar 2(a). Elektroforegram Hasil PCR primer-BLAST

Keterangan sampel:

1. DNA Daging babi 1 (primer 1)
2. DNA Daging babi 1 (primer 2)
3. DNA Daging babi 1 (primer 3)
4. DNA babi 2 (primer 1)
5. DNA babi 2 (primer 2)
6. DNA babi 2 (primer 3)
7. DNA Control (-) primer 1
8. DNA Control (-) primer 2
9. DNA *Ladder* 1 kb



Gambar 2(b). Elektroforegram Hasil PCR primer-BLAST

Keterangan sampel:

1. DNA Daging sapi primer 1
2. DNA Daging sapi primer 2
3. DNA Daging sapi primer 3
4. DNA Sosis sapi primer 3
5. DNA Sosis ayam primer 3
6. DNA Sosis babi primer 2
7. DNA Sosis babi primer 3
8. DNA Control (-) primer 3
9. DNA Ladder 1 kb

Hasil elektroforegram amplifikasi menggunakan primer rekomendasi dari Primer-BLAST ditunjukkan pada [gambar 2\(a\)](#) dan [gambar 2\(b\)](#). Ukuran pita DNA sampel

daging babi dan sosis babi menggunakan primer 2 dan 3 telah sesuai dengan panjang produk dari primer, yaitu pada 274 bp dan 262 bp. Sampel yang diamplifikasi menggunakan primer 1 menghasilkan pita yang tidak terlihat jelas dikarenakan primer 1 memiliki panjang produk sebesar 121 bp dimana tidak memasuki range dari DNA ladder 1 kb. Pengujian juga dilakukan pada sampel selain babi dan menghasilkan pita DNA yang jelas akibat terjadinya *Mispriming*. *Mispriming* disebabkan karena panjang fragmen yang dipilih untuk merancang primer terlalu pendek, sehingga memungkinkan fragmen lain yang memiliki kemiripan khususnya dari gen *cytochrome b* sapi dan ayam dapat teramplifikasi oleh primer tersebut. Selain itu, primer yang pendek juga mudah mengamplifikasi fragmen lain yang serupa sehingga perlu dilakukan penambahan jumlah nukleotida pada primer untuk memperkecil kemiripan. Panjang primer yang pendek dapat digunakan jika fragmen yang dipilih lestari, spesifik dan berbeda dari yang lain.

Proses *alignment* juga dilakukan antara primer gen *cytochrome b* babi yang terpilih dengan primer *cytochrome b* sapi dan ayam usulan primer-BLAST. Berikut [tabel 5](#) persentase *identity matrix* tertinggi hasil *alignment* menggunakan program Clustal Omega.

Tabel 5. Persentase Identity Matrix Primer Gen *Cytochrome b* Babi

No. Primer gen <i>cytochrome b</i> babi	Persent Identity Matrix			
	Primer gen <i>cytochrome b</i> ayam		Primer gen <i>cytochrome b</i> sapi	
	Primer Forward	Primer Reverse	Primer Forward	Primer Reverse
1	50%	74%	71%	52%
2	55%	73%	52%	83%
3	52%	64%	47%	82%

Berdasarkan hal tersebut, dapat disimpulkan bahwa primer yang disarankan oleh Primer-BLAST mampu mendeteksi DNA *cytochrome b* babi namun belum spesifik.

Kontrol negatif tidak terlihat adanya pita DNA. K (-) hanya menggunakan reagen, sehingga tidak ada daerah manapun yang teramplifikasi. Penumpukan primer juga terdapat pada bagian bawah gel agarosa yang

disebabkan karena penggunaan primer yang terlalu banyak, sehingga komposisi primer perlu dikurangi.

Kesimpulan

Pada penelitian ini, primer telah berhasil dirancang dan dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen *cytochrome b* babi secara *Polymerase Chain Reaction*. Tiga pasang primer

dirancang menggunakan program Primer-BLAST dan satu pasang primer dirancang secara manual dan diberi nama CYTB-Full. Primer CYTB-full bersifat spesifik dengan panjang produk 1140 dan suhu *annealing* yang digunakan 46°C, primer ini hanya dapat mengamplifikasi sampel babi dan tidak dapat mengamplifikasi sampel sapi dan ayam. Tiga pasang primer yang lain juga mampu mendeteksi sampel babi pada 121 bp, 272 bp dan 262 bp dengan suhu *annealing* yang digunakan 52 °C, namun primer ini tidak spesifik karena dapat mengamplifikasi fragmen dari sampel sapi dan ayam. Primer terbaik yang dapat mengamplifikasi gen *cytochrome b* babi secara spesifik adalah primer CYTB-Full yang dirancang secara manual.

Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui sensitivitas dari primer CYTB-Full sehingga konsentrasi terendah kandungan babi yang mampu dideteksi PCR dapat diketahui. Selain itu, pengulangan proses isolasi DNA template sebaiknya dilakukan agar dihasilkan isolat DNA dengan konsentrasi yang tinggi, sehingga pita DNA dapat terlihat dengan jelas pada saat diuji kemurniannya menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Daftar Pustaka

1. Santoso, T.J.; Utami, D.W.; Septiningsih, E.M. Analisis Sidik Jari DNA Plasma Nutfah Kedelai Menggunakan Markah SSR. *2549-1547* **2006**, doi:10.21082/jbio.v2n1.2006.p1-7.
2. Handoyo, D.; Rudiretna, A. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas* **2000**, *9*, 17–29.
3. Meyer, A. Shortcomings of the Cytochrome b Gene as a Molecular Marker. *Trends in Ecology & Evolution* **1994**, *9*, 278–280, doi:10.1016/0169-5347(94)90028-0.
4. Fibriana, F.; Widiati, T.; Retnoningsih, A.; Susanti - Deteksi Daging Babi Pada Produk Bakso Di Pusat Kota Salatiga Menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education* **2012**, *4*, doi:10.15294/biosaintifika.v4i2.3928.
5. NCBI, N. CYTB Cytochrome b [Sus Scrofa (Pig)] - Gene - NCBI Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/808513> (accessed on 23 February 2021).
6. Lidya, B. Isolasi Genome 2018.
7. Sasmito, D.E.K.; Kurniawan, R.; Muhimmah, I. Karakteristik Primer Pada Polymerase Chain Reaction (PCR) Untuk Sekuensing DNA: Mini Review.; Yogyakarta, December 6 2014; pp. 93–102.
8. Fitri Rahayu; Saryono Saryono; Titania Tjandrawati Nugroho Isolasi Dna Dan Amplifikasi Pcr Daerah Its Rdna Fungi Endofit Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia Variabilis*) Lbkurcc69. *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau* **2015**, *2*, 100–106.
9. Moreano, F.; Busch, U.; Engel, K.-H. Distortion of Genetically Modified Organism Quantification in Processed Foods: Influence of Particle Size Compositions and Heat-Induced DNA Degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9971–9979, doi:10.1021/jf051894f.
10. Yuenleni, Y. Langkah-Langkah Optimasi PCR. *Indonesian Journal of Laboratory* **2019**, *1*, 51–56, doi:10.22146/ijl.v1i3.48723.