

DETEKSI KANDUNGAN BABI PADA PRODUK OLAHAN DAGING MENGUNAKAN METODE MULTIPLEKS PCR DI KABUPATEN PANDEGLANG

Marlinda Indriati^{1*}

¹Universitas Mathla'ul Anwar, Indonesia

*Cc: marlinda.indriati87@gmail.com

Abstrak

Salah satu parameter status halal bahan pangan adalah harus bebas dari kandungan babi baik dari bahan dasar, bahan tambahan maupun proses pembuatannya. Tujuan dari penelitian ini adalah memastikan status kehalalan berupa ada tidaknya kandungan babi pada bahan pangan olahan daging (bakso) yang beredar di pasar tradisional di wilayah Kabupaten Pandeglang. Multipleks PCR adalah suatu teknik PCR dengan menggunakan beberapa primer secara bersama-sama dalam satu reaksi untuk amplifikasi beberapa daerah target. Gen-gen yang paling sering digunakan sebagai penanda jenis hewan atau daging diantaranya adalah *cytochrome b* (*cyt b*), adanya variasi urutan pada *cyt b* menyebabkan gen ini banyak digunakan sebagai penanda untuk membedakan material yang berasal dari jenis hewan yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen *cyt b* terbukti berhasil mengamplifikasinya DNA dari hewan sapi dan babi dalam campuran DNA (DNA mix) dari 2 jenis hewan ternak tersebut dalam satu reaksi sehingga terbentuk 2 pita DNA. Dari hasil penelitian terhadap kontrol daging sapi dan babi menghasilkan dua fragmen yaitu sebesar 274 pb untuk sapi dan 389 pb untuk babi. Pengujian multipleks PCR pada sampel bakso menunjukkan bakso yang diujikan kandungan DNA nya 100% positif mengandung sapi dan 0% mengandung babi.

Kata-kata kunci: *Cytochrome b*, DNA, PCR

Abstract

One of the parameters of the halal status of foodstuffs is that they must be free from pork, both from basic ingredients, additives and the manufacturing process. The purpose of this study was to ascertain the halal status in the form of pork content in processed meat (meatballs) circulating in traditional markets in Pandeglang Regency. Multiplex PCR is a PCR technique by using several primers together in one reaction for amplification of several target regions. The genes most often used as markers for animal or meat types include cytochrome b (*cyt b*), the variation in the sequence in *cyt b* causes this gene to be widely used as a marker to distinguish material from different animal types. The results showed that the *cyt b* gene was proven to be successful in amplifying DNA from cows and pigs in the DNA mix of the 2 types of livestock in one reaction to form 2 DNA strands. The results of the research on control of beef and pork produced two fragments, namely 274 pb for cattle and 389 bp for pigs. PCR multiplex testing on meatball samples showed that the tested meatballs contained 100% positive DNA and 0% contained pork.

Keywords: *Cytochrome b*, DNA, PCR

PENDAHULUAN

Peranan protein hewani terutama daging cukup penting dalam rangka mencapai

standar kelayakan gizi. Perubahan pola konsumsi serta selera masyarakat menyebabkan kebutuhan bahan pangan hewani

sebagai kebutuhan primer yang harus dipenuhi karena terbukti mampu menjadikan masyarakat cerdas, aktif dan produktif sehingga peningkatan konsumsi protein hewani tersebut diharapkan dapat meningkatkan kualitas sumber daya manusia.

Keamanan pangan asal hewan juga tentunya tidak bisa lepas dari perhatian. Keamanan pangan didefinisikan sebagai kondisi dan upaya yang diperlukan untuk pencegahan pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia, fisik dan bahan lain yang dapat merugikan dan membahayakan kesehatan manusia (Peraturan Pemerintah Nomor 28 Tahun 2004). Pemerintah telah berupaya melindungi konsumen dengan berbagai Undang-Undang dan Peraturan Pemerintah, namun sampai saat ini pemalsuan akan produk pangan khususnya produk olahan daging masih sering terjadi. Pencampuran daging lain pada produk daging olahan biasanya bertujuan untuk menekan biaya produksi. Banyak kasus penipuan dan kontaminasi dengan penggunaan bahan-bahan yang tidak layak konsumsi dan tidak halal. Kontaminasi bahan tersebut dapat terjadi pada tahap awal atau tahap akhir produksi dan ada juga yang tanpa disengaja. Permasalahan yang muncul adalah apabila pencampuran tersebut menggunakan jenis daging yang tidak boleh dikonsumsi oleh masyarakat tertentu terkait dengan agama dan budaya.

Metode deteksi dan identifikasi jenis daging dan produk olahan terus dikembangkan sebagai suatu upaya perlindungan konsumen dan pelaksanaan pelabelan pangan. Teknik amplifikasi DNA spesifik untuk setiap jenis

hewan pada keamanan dan kehalalan pangan dapat digunakan untuk verifikasi, sertifikasi maupun monitoring. Beberapa peneliti telah menggunakan gen *cytochrome b* (*cyt b*) untuk membedakan material yang berasal dari jenis hewan yang berbeda. *gen sitokrom b* (*cyt b*) merupakan DNA asal mitokondria yang jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan DNA nukleus serta keberadaannya yang sangat kekal. Sehingga penggunaan gen ini diharapkan memungkinkan keberhasilan amplifikasi PCR dengan ketersediaan DNA yang berkali-kali lipat lebih banyak dibandingkan dengan DNA nukleus serta hasil ekstraksi yang mencukupi untuk mendeteksi terutama pada sampel yang telah terdegradasi atau dalam jumlah sedikit. Penggunaan primer spesifik untuk babi telah banyak dilakukan oleh beberapa peneliti tahun-tahun terakhir ini (Fatimah, 2013), (Hertanto et al., 2017), (Marlina et al., 2013), (Maryam et al. 2015), (Rahmawati et al, 2016), (Rohman et al., 2017), (Zulfahmi, 2015). Gen-gen yang paling sering digunakan sebagai penanda jenis hewan atau daging diantaranya adalah sitokrom b (*cyt b*), 12S dan 16S subunit ribosom RNA dan daerah *displacement loop* (D-loop). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi cemaran daging babi pada produk olahan pangan asal daging di wilayah kabupaten Pandeglang Banten menggunakan primer spesifik yang berasal dari sekuen *cyt b* pada babi menggunakan teknik multipleks PCR.

BAHAN DAN METODE

Sampel DNA

Sampel DNA yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daging dan produk olahan daging. Sampel terdiri dari kontrol positif berupa daging sapi dan daging babi dan produk olahan daging yang berupa 5 sampel produk bakso yang berbeda. Semua sample dikumpulkan dari wilayah Kabupaten Pandeglang dengan menggunakan metode populasi terjangkau (*accessible source population*) kemudian diberi label dan disimpan pada suhu *freezer* sampai ekstraksi DNA dilakukan

Primer

Primer yang digunakan untuk amplifikasi fragmen DNA spesifik ternak sapi dan babi mengikuti Matsunaga *et al.* (1999). Primer forward yang digunakan untuk kedua jenis ternak yaitu 5'-GACCTCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3'. Sekuen primer reverse yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Sekuen primer spesifik gen *cyt b* dari hewan sapi dan babi

Jenis Hewan	Reverse (5' – 3')	Hasil Amplifikasi
Sapi *	CTA GAAAAG TGT AAG ACC CGT AAT ATA AG	274 bp

Babi *	GCT GAT AGT TTT GTG ATG ACC GTA	398 bp
--------	---------------------------------------	--------

Prosedur

Isolasi dan Ekstraksi DNA

Metode isolasi dan ekstraksi DNA pada penelitian ini berasal dari sampel daging dan produk olahan daging menggunakan kit ekstraksi DNA (QIAGEN).

Pengujian DNA Total

Pengujian DNA hasil ekstraksi secara kualitatif dan kuantitatif dilakukan dengan spektrofotometer. Sampel DNA sebanyak 3 µl dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml ditambah air destilata sebanyak 597 µl. Larutan TE (Tris EDTA) digunakan sebagai blanko dengan cara yang sama yaitu sebanyak 3 µl larutan TE ditambah air destilata, lalu dimasukkan dalam tabung *eppendorf* 1.5 ml. Sampel dan blanko di *spin down* selama 0.5 menit, kemudian dilakukan pengujian dengan spektrofotometer. Pengujian kemurnian DNA dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi dihitung dari A 260 dikalikan faktor pengencer dan konstanta serapan DNA (50 µg/ml)

Amplifikasi Fragmen DNA Spesifik

Amplifikasi ruas gen *cyt b* dilakukan dengan metode multipleks PCR. Sampel DNA sebanyak 2 µl dimasukkan ke dalam tabung PCR 0.2 ml, ditambahkan komponen-komponen PCR yang terdiri atas primer *forward* 10 pmol, primer *reverse* masing-

masing 5 pmol, campuran dNTP 200 µl, MgCl₂ 1 mM, dan 0.5 unit enzim *Taq polymerase* dan bufernya. Proses amplifikasi dilakukan pada mesin *thermocycler* GeneAmp® PCR System (Applied Biosystems TM) dengan suhu *pradenaturasi* 94 °C selama 5 menit, 30 siklus yang terdiri atas *denaturasi* 94 °C selama 30 detik, *annealing* 60 °C selama 45 detik, *elongasi* 72 °C selama 1 menit dan *elongasi* akhir 72 °C selama 5 menit. Setelah proses tersebut selesai, tabung diambil dan disimpan pada suhu ruang atau pada suhu 4 °C sampai akan dianalisis lebih lanjut.

Elektroforesis dan Visualisasi Produk PCR

Produk PCR divisualisasikan dengan teknik elektroforesis gel agarose 1.5%. Gel dibuat dari 0.6 gram agarose dan 30 ml larutan *buffer* (0.5 x TBE) yang dipanaskan. Larutan agarose dibiarkan agak dingin sambil diaduk dengan *stirrer*, lalu ditambahkan 2.5 µl pewarna *ethidium bromide*. Sebanyak 5 µl produk PCR dilarutkan dalam 1 µl *loading dye*. Elektroforesis dilakukan selama 40 menit pada tegangan konstan 100 volt atau sampai pewarna *bromtimol blue* mencapai bagian bawah gel. Setelah elektroforesis selesai, gel diambil untuk dilakukan pemotretan menggunakan UV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas dan kuantitas DNA pada suatu organisme dapat diketahui dengan menggunakan spektrofotometer. Prinsip kerja dari alat ini adalah iradiasi sinar ultraviolet yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Iradiasi sinar ultraviolet oleh

nukleotida secara maksimal dicapai pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan iradiasi sinar ultraviolet maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang 280 nm (Tenrilulo, Suryati, Parenrengi dan Rosmiat, 2017). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi, diperoleh data yang disajikan pada Tabel 2.

Rasio 260/280 nm memiliki sensitifitas yang tinggi untuk menilai kontaminasi DNA oleh protein. Semakin tinggi kandungan asam nukleat dalam sampel, maka semakin rendah rasio nilai absorbansi pada 260/280nm, begitu pula sebaliknya. Nilai negatif dapat terjadi jika pelarut yang digunakan dalam sampel dan blanko berbeda atau karena terdapat pewarna floresens dalam larutan (Tataurov *et al.* 2008). Menurut Fatmawati *et al.* (2015) apabila nilai kemurnian yang diperoleh dibawah 1.8 menunjukkan bahwa DNA masih terdapat kontaminan berupa protein dan polisakarida. Sedangkan jika nilainya diatas 2.0 menunjukkan bahwa DNA masih terkontaminasi fenol. Hal ini dikarenakan fenol memiliki serapan maksimal pada panjang gelombang 260 nm.

Tabel 2. Uji Kemurnian dan Konsentrasi Larutan DNA Pada Daging Sapi, Daging Babi dan Sampel Bakso Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Sampel	Rata Kemurnian (260/280)	Rataan Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)
Kontrol		
Sapi	1,87	558,90
Kontrol		
Babi	2,19	610,65
Bakso 1	1,83	11,85
Bakso 2	1,75	21,35
Bakso 3	1,79	18,15
Bakso 4	1,69	12,90
Bakso 5	1,71	8,60

Hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260/280 nm sangat beragam tergantung pada sumber DNA yang diperoleh. DNA yang diekstraksi dari daging rata-rata memiliki rasio nilai absorbansi yang berada dalam kisaran 1,8 – 2,0 dari pada DNA yang diekstraksi dari produk olahan.. Molekul DNA dikatakan murni jika nilai rasio A_{260}/A_{280} adalah sebesar 1.8 – 2.0 (Fatchiyah, 2011). Hasil tersebut menunjukkan tingkat kemurnian DNA dari sampel daging lebih tinggi dibandingkan DNA yang berasal dari produk olahan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya kontaminasi protein dan bahan campuran lain yang digunakan dalam produk olahan.

Sangat penting untuk mengetahui seberapa banyak konsentrasi DNA yang digunakan dalam penelitian. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi bervariasi. Hal ini disebabkan sampel yang diekstraksi berasal dari sumber yang berbeda ya itu berasal dari daging dan produk olahan bakso. Menurut rekomendasi

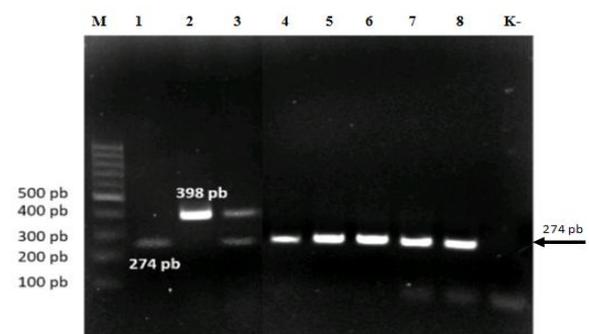
KapaBiosystem tahun 2014 yang dikutip oleh Nugroho *et al.* (2017), konsentrasi DNA template yang dibutuhkan untuk kegiatan PCR berkisar antara 10 – 100 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan menurut Maryam (2014) konsentrasi optimal dalam amplifikasi PCR pada 30 siklus untuk menghasilkan pita tebal adalah konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$ baik pada pembanding daging sapi, daging babi, sampel bakso sapi dan sampel bakso babi. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi DNA pada sampel daging sapi dan daging babi sangat besar yaitu masing 558,90 dan 610,65 $\mu\text{g/ml}$ hal ini dikarenakan sampel yang di ekstraksi merupakan murni jaringan daging tanpa ada campuran dari bahan apapun. Lain halnya pada hasil ekstraksi produk olahan daging bakso yang secara keseluruhan konsentrasi DNA relatif lebih sedikit dikarenakan didalam sampel yang diekstraksi terdapat campuran bahan lain seperti tepung, rempah dan bahan lain yang tidak mengandung DNA. Selain itu beberapa perlakuan dalam pembuatan produk bakso dapat menjadi penyebab kesulitan pada saat isolasi dan ekstraksi DNA. Tahapan penting yang mempengaruhi kesulitan proses isolasi DNA dari bakso yaitu (1) proses pengolahan secara mekanik diantaranya yaitu pencacahan dan penggilingan daging pada bakso dan sosis dapat menyebabkan terjadinya perubahan ukuran partikel, bentuk dan komposisi protein penyusun daging sehingga mempengaruhi keadaan sel yang didalamnya mengandung DNA, (2) perlakuan pemanasan dengan suhu dan tekanan tinggi diantaranya yaitu perebusan dalam air mendidih (100°C) proses tersebut selain mengakibatkan protein terdenaturasi

juga berpengaruh pada stabilitas DNA, (3) pencampuran bahan tambahan dalam bakso berupa tepung tapioka dan bumbu-bumbu lainnya.

Hasil penelitian Matsunaga *et al.* (1999) menunjukkan, bahwa DNA dapat diisolasi dari daging yang sudah mengalami pemanasan pada suhu 100°C dan 120°C selama 30 menit. Nuraini (2004) berhasil mengisolasi dan mengamplifikasi DNA yang berasal dari organ tubuh dan produk olahan daging berupa bakso, sosis, kornet, dendeng dan abon, atau dapat dikatakan bahwa pemanasan tidak merusak DNA (Nuraini 2004). Martín *et al.* (2007) berhasil mengamplifikasi DNA mitokondria daerah 12SrRNA pada sampel DNA daging kucing, anjing dan tikus yang dipanaskan pada suhu 120°C selama 50 menit, 110°C selama 120 menit dan 133°C pada tekanan 300 kPa selama 20 menit. Menurut Kesmen *et al.* (2007), amplifikasi DNA tidak dipengaruhi oleh penambahan rempah-rempah atau proses pemasakan. Berdasarkan data kemurnian dan konsentrasi DNA hasil ekstraksi dan isolasi pada penelitian ini secara keseluruhan baik dan dapat digunakan untuk proses amplifikasi.

Penggunaan gen *cyt b* telah banyak dilakukan dalam penelitian untuk identifikasi jenis daging (Di Pinto *et al.* 2005, Asensio 2007, Hsieh *et al.* 2007., Tanabe *et al.* 2007., dan Lin *et al.* 2008). Selain menggunakan *cyt b* sebagai marker biologi dalam identifikasi spesies dapat juga digunakan gen 12S rRNA (Fajardo *et al.* 2006) dan 16S rDNA (Rastogi *et al.* 2007) yang ketiganya merupakan gen DNA mitokondria.

Proses amplifikasi fragmen DNA *cyt b* menggunakan primer spesifik mengacu pada Matsunaga *et al.* (1999), dengan primer *forward* yang sama digunakan untuk semua jenis hewan yaitu 5'-GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA-3', dan primer *reverse* untuk sapi yaitu 5'-CTA GAA AAG TGT AAG ACC CGT AAT ATA AG-3' dan babi yaitu 5'-GCT GAT AGT AGA TTT GTG ATG ACC GTA-3'. Hasil amplifikasi fragmen *cyt b* pada sampel bakso dalam menentukan ada tidaknya cemaran DNA babi disajikan dalam Gambar 1 dibawah ini



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi fragmen DNA *cyt b* sampel bakso pada gel agarose 1.5%, (M) Marker 100 bp, sampel kontrol daging sapi (1), kontrol daging babi (2), kontrol campuran daging sapi dan babi (3), sampel bakso (4 -8) dan K- kontrol negatif berupa (air)

Dari Gambar 1 memperlihatkan bahwa hasil amplifikasi gen *cyt b* dalam gel agarose menghasilkan dua fragmen yang berbeda dimana terdapat fragmen DNA 274 bp yang merupakan amplifikasi gen *cyt b* sapi dan fragmen DNA 398 bp yang merupakan amplifikasi *cyt b* hewan babi hal ini sesuai

dengan penelitian Primasari (2011) dan Irine (2013) yang berhasil amplifikasi fragmen sapi dan babi masing-masing sepanjang 274 bp dan 398 bp. Hasil analisa DNA menunjukkan bahwa untuk semua sampel bakso positif mengandung DNA sapi dan negatif mengandung DNA babi. Hal ini mengindikasikan bahwa sampel bakso sapi di wilayah kabupaten Pandeglang aman dikonsumsi dan tidak mengandung cemaran DNA babi.

Fontanesi *et al.* (2008) dan Langen *et al.* (2010) melakukan deteksi daging babi berdasarkan jenis kelamin babi yang beredar dipasaran. Mereka menemukan bahwa daging babi yang dipasarkan baik dalam keadaan segar maupun hasil olahan dapat diidentifikasi bahkan dapat diketahui apakah babi tersebut jantan atau betina. Metode deteksi dengan primer spesifik tersebut menunjukkan hasil positif pada babi dan tidak mengamplifikasi pada gen yang sama dari hewan jenis yang lain yaitu sapi, ayam, kalkun dan beberapa jenis mikroba yang sering mengkontaminasi daging.

Kesmen *et al.* (2007) menggunakan *species-specific primers* untuk mendeteksi spesies daging pada produk sosis dengan beberapa variasi campuran daging (kuda, sapi, keledai dan babi) dan menunjukkan hasil dapat terdeteksi sampai level 1% dengan menghasilkan amplicon yang berbeda-beda. Desain *species-specific primers* didapat dari gen ATPase8 (*ATP synthase subunit 8*), ATPase6 (*ATP synthase subunit 6*), ND2=NADH (*dehydrogenase subunits 2*) dan ND5=NADH (*dehydrogenase subunit 5*). Hasil penelitian untuk mengidentifikasi spesies

dengan primer spesifik juga telah dikembangkan oleh Martin *et al.* (2007) yang mampu mendeteksi keberadaan daging sapi, kambing dan domba sampai dengan level 1.0% pada campuran tepung dan bahan nabati lainnya. Penelitian tersebut juga menjelaskan bahwa pemasakan sampai suhu 120°C sampai 50 menit masih dapat digunakan untuk reaksi PCR dengan primer spesifik yang didesain dari gen 12S rRNA.

Teknik deteksi dan identifikasi asal hewan terutama dalam produk pangan sangat penting karena terkait dengan kesehatan, ekonomi dan agama. Daging yang aman dan halal menjadi perhatian utama khususnya bagi masyarakat Indonesia yang mayoritas muslim. Metode deteksi dan identifikasi jenis daging biasanya menggunakan analisis protein, namun metode tersebut memiliki kelemahan hanya bisa dilakukan dalam bentuk segar (mentah) dan memerlukan sampel yang banyak serta keakuratan sangat rendah bila dilakukan pada sampel yang matang (daging olahan).

Penggunaan multipleks PCR dan keunggulan variasi gen *cyt b* dalam penelitian ini terbukti berhasil mendeteksi dan identifikasi jenis atau sumber daging secara cepat, tepat dan akurat. Primer yang digunakan yaitu satu primer *forward* dan 2 primer *reverse* yang disusun pada daerah spesifik pada setiap hewan. Kespesifikan gen *cyt b* terbukti dengan teramplifikasinya DNA dari hewan sapi dan babi dengan panjang fragmen yang berbeda-beda dan campuran DNA (DNA mix) dari 2 jenis hewan ternak tersebut dapat diamplifikasi dalam satu reaksi sehingga terbentuk 2 pita DNA dengan panjang berbeda

sesuai dengan panjang fragmen masing-masing hewan. Sehingga keunggulan dari teknik multipleks PCR yaitu dapat menghemat waktu dan biaya analisis karena untuk mendeteksi sampel dengan sumber DNA yang berbeda-beda dapat dilakukan dalam satu reaksi sekaligus sehingga dalam penggunaannya dapat lebih efisien

KESIMPULAN

Amplifikasi gen *cyt b* pada daging sapi, daging babi dan produk olahan daging menghasilkan dua fragmen DNA yang berbeda yaitu 274 pb untuk DNA sapi dan 398 pb untuk DNA babi menunjukkan kespesifikan sekuen gen *cyt* diantara jenis hewan. Cemaran daging jenis lain pada produk olahan daging masih bisa dianalisa DNA nya menggunakan teknik multipleks PCR meskipun produk olahan daging tersebut sudah mengalami perlakuan mekanik, perlakuan suhu dan juga penambahan bahan baku penunjang lainnya. Hasil analisa terhadap produk olahan daging yang beredar di wilayah Kabupaten Pandeglang menunjukkan sampel bakso yang diamati negatif mengandung DNA babi dan 100% merupakan bakso daging sapi ditunjukkan dari pita DNA hasil visualisasi elektroforesis pada gel agarose 1.5%.

DAFTAR PUSTAKA

Asensio, G.L. (2007). PCR-based methods for fish and fishery product authentication. *Food Control & Technology* **18**:558-566.

Di Pinto, A., Forte, V.T., Conversano, M.C. dan Tantillo, G.M. 2005. Duplex polymerase chain reaction for

detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control* **16**: 391–394.

- Fajardo, V., Gonzales, I., Lopez-Calleja, I., Martin, I., Hernández, P.E., Garcia, T. dan Martin, R. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 1144-1150.
- Fatchiyah, Arumingtyas, E.L., Widyarti, S., & Rahayu, S. 2011. Biologi Molekuler-Prinsip Dasar Analisis. Erlangga, Malang.
- Fatimah, S. (2013). Deteksi Cemaran Daging Babi dalam Campuran Bakso Ayam dengan *Real-Time* PCR dan Spektrofotometri FTIR, [Tesis], Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Fontanesi, L., Scotti, E. dan Russo, V. (2008). Differences of the Porcine Amelogenin X and Y chromosome genes (AMELX and AMELY) and their application for sex determination in pigs. *Molecular Reproduction and Development*
- Fatmawati, D.A., Wirajana, N., & Yowani, S.C. 2015. Perbandingan Kualitas DNA dengan menggunakan Metode Boom *Original* dan Boom Modifikasi pada Isolat *Mycobacterium tuberculosis* 151. *KIMIA*, vol. q, pp. 41-45. *lopment* **75**:1662–1668.
- Hertanto, B.S., Fitra, R.A., Kartikasari, L.R., & Cahyadi, M. (2017). Authentication of Raw Chicken Mear from Pork Contamination using Gene CYT-B with Duplex-Polymerase Chain Reaction Analysis, *Buletin Peternakan*, vol. 41, pp. 113–118
- Hsieh, H.S., Tuu-jyi, C. dan Deng-Fwu, H. (2007). Using the PCR–RFLP method to identify the species of different processed products of billfi sh meats. *Food Control* **18**: 369-374.
- Kesmen Z, Sahin F, Yetim H. 2007. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Sci* **77**:649–653.
- Langen, M., Peters, U., Körner, U., Gissel, C., Stanislawski, D. dan Klein, G. (2010). Detection of male pork tissue in meat

- and meat products by PCR. *Meat Science* **86**: 821-824.
- Lin, W. dan Deng-Fwu, H. (2008). Application of species-specific PCR for the identification of dried bonito product (Katsuoobushi). *Food Chemistry* **106**: 390-396.6.
- Marlina, Mutalib, S.A., Islami, Sari, H.K., & Fitria, A. (2013). Pengembangan Metode PCR dan Southern Hybridization untuk Deteksi Gen Babi pada Cangkang Kapsul. *Pros. Semin. Nas. Perkemb. Terkini Sains Farm. Dan Klin. III*, pp. 116-121
- Martín *et al.* 2007. Technical note: detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction. *J Anim Sci* **85**:2734-2739.
- Martin, I., Garcí'a, T., Fajardo, V., Pez-Calleja, I., Hernández, P.E., González, I. dan Martí'n, R. (2007). Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Science* **75**: 120-127.)
- Maryam, S. 2014. Analisis Cemar DNA Babi Pada Dendeng menggunakan primer mitokondria D-Loop686 dan gen cyt b dengan menggunakan Real time polymerase chain reaction (real time PCR), [Tesis], Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Maryam, S., Sismindari, Raharjo, T.J., Sudjadi, Rohman, A. (2015). Determination of Porcine Contamination in Laboratory Prepared *dendeng* Using Mitochondrial D-Loop686 and *cyt b* Gene Primers by Real Time Polymerase Chain Reaction, *International Journal of Food Properties*, vol.19, no. 11, pp. 187-195.
2017, <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1020434>
- Matsunaga T *et al.* 1999. A quick and simple method for the identification of meat species. *Meat Sci* **51**:143-148.)
- Nugroho, K., Terryana, R.T., dan Lestari, P. 2017. Metode Ekstraksi DNA Cabai (*Capsicum annuum* L.) menggunakan Modifikasi Buffer CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide) tanpa Nitrogen Cair, *Scripta Biologi*, vol. 4, no. 2, pp. 91-94
- Nuraini H. 2004. Pengembangan sekuen *Porcine Repetitive Element* (PRE-1) sebagai penanda molekuler untuk mendeteksi material babi pada produk daging olahan. [disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- PP RI. 2004. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan. Jakarta.
- Primasari A. 2011. Sensitifitas gen sitokrom b *cyt b(sebagai marka spesifik pada genus Rattus dan Mus untuk menjamin keamanan pangan produk asal daging. [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Rastogi, G., Mahesh S. Dharne, Sandeep W., Ashutosh K., M.S. Patole dan Yogesh S.S. (2007). Species identification and authentication of tissues of animal origin mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science* **76**: 666-674.
- Rahmawati, Sisimindari, Raharjo, T.J., Sudjadi, & Rohman, A. (2016). Analysis of Pork Contamination in *Abon* using Mitochondrial D-Loop 22 primer Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Method, *International Food Research Journal*, vol. 23, pp. 370-374.
- Rohman, A., Himawati, A., Triyana, K., Sismindari, & Fatimah, S. (2017). Identification of Pork in Beef Meatballs using Fourier Transform Infrared Spectrophotometry and Real-time Polymerase Chain Reaction, *International Journal of Food Properties*, vol. 20, pp. 654-661.
- Tanabe, S., Eiji, M., Akemi, M. dan Kazuhiro, M. (2007). PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredient in processed foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **71**: 1-5.
- Tataurov AV, You Y, Owczarzy R. 2008. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophys Chem* **133** (1-3):66-70.
- Tenriulo, A., Suryati, E., Parenrengi, A., & Rosmiati. (2001). Ekstraksi DNA Rumput Laut *Rappaphycus alvarezii* dengan metode Fenol Kloroform',

Marina Chimica Acta, vol. 2, no. 2,
pp. 6-10

Zulfahmi. (2015). Deteksi Kontaminan Babi
Pada Produk Makanan Menggunakan
Teknologi DNA Molekuler,
*Kutubkhanah: J. Penelit. Sos. Keagam
aan*, vol. 18, no. 1, pp.