

Penggunaan DNA Mitokondria Sebagai Penanda Sumber Gelatin Sediaan *Gummy* Dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* dan Sekuensing DNA

(The Use of Mitochondrial DNA as Source of Gelatin Marker in Gummy Using Polymerase Chain Reaction and DNA Sequencing Technique)

Andzar Fikranus Shofa^{*1}, Hariyanti², & Priyo Wahyudi³

¹Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Prima Indonesia, Jl. Raya Babelan No.KM 9.6, Bekasi, Jawa Barat 17610, Indonesia

²Universitas Muhammadiyah Prof Dr. Hamka, Jl. Limau II, RT.3/RW.3, Daerah Khusus Ibukota Jakarta 12130, Indonesia

³Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jl. M.H Thamrin No. 8 Jakarta Pusat DKI Jakarta 10340, Indonesia

ABSTRACT: Chewable lozenges or gummy is one of the pharmaceutical product that using gelatin as base. The main source of gelatin derived from porcine skin and bovine bone. Polymerase chain reaction and DNA sequencing could be used for material source identification. This study was aimed at ensuring gelatin source in gummy product without halal logo through PCR method and DNA sequencing base on the porcine cytochrome b gene. Genomic DNA of porcine and samples were isolated with GeneJet Kit and subjected to PCR amplification used specific primer that targeted the mitochondrial cytochrome b gene. Electrophoresis and DNA sequencing were used to analyze PCR product. Amplicon of gummy A has similar band to porcine, with size 553 bp and showed homology with *Sus scrofa* breed long lin. PCR and DNA sequencing techniques could be applied to identify gelatin source in gummy.

Keywords: mitochondrial DNA; gelatin; gummy; PCR; DNA sequencing.

ABSTRAK: *Chewable lozenges* atau *gummy* merupakan sediaan berbentuk kenyal yang dapat melepaskan zat aktifnya langsung di dalam mulut atau tenggorokan. Bahan yang berpengaruh dalam konsistensi *gummy* tersebut berasal dari basis. Dalam sediaan *gummy*, gelatin digunakan sebagai basis yang sebagian besar bersumber dari babi dan sapi. Identifikasi sumber bahan dapat dilakukan dengan teknik PCR dan sekuensing DNA. Penelitian ini bertujuan mengetahui sumber gelatin sediaan *gummy* impor tanpa logo halal. Isolasi DNA genom daging babi dan sediaan *gummy* dilakukan dengan *GeneJet* Kit. Isolat DNA kemudian diamplifikasi menggunakan primer spesifik DNA mitokondria sitokrom b. Selanjutnya, amplicon dianalisis dengan elektroforesis dan dilakukan sekuensing DNA. Hasil elektroforesis amplicon daging babi dan sediaan *gummy* A menghasilkan pita DNA dengan ukuran 553 bp. Analisis sekuensing DNA menunjukkan homologi dengan *Sus scrofa* breed long lin. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan gelatin yang digunakan pada sediaan *gummy* A mengandung gelatin yang berasal dari babi *Sus scrofa* breed long lin.

Kata kunci: DNA mitokondria; gelatin; *gummy*; PCR; sekuensing DNA.

Pendahuluan

Chewable lozenges merupakan sediaan padat bertekstur kenyal atau *gummy* yang pembuatannya dilakukan dengan menuangkan sejumlah massa meleleh ke dalam cetakan. Sediaan ini membutuhkan bahan yang dapat membentuk konsistensi menjadi kenyal atau *gummy*. Bahan yang paling berpengaruh dalam konsistensi sediaan adalah basis. Salah satu basis yang digunakan adalah gelatin [1].

Gelatin adalah protein yang diperoleh dari jaringan kolagen hewan yang terdapat pada kulit, tulang dan jaringan ikat. Pada prinsipnya, proses pembuatan gelatin dibagi menjadi dua, yaitu hidrolisis dengan larutan asam atau dengan larutan basa, yang umumnya bersumber dari sapi dan babi [2]. Namun, penggunaan sumber gelatin dari

jenis tertentu lebih dibatasi, sehingga identifikasi sumber penting dilakukan [3].

Identifikasi sumber gelatin dapat dilakukan dengan analisis protein atau DNA menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) [4]. Analisis PCR menggunakan DNA mitokondria telah banyak dilakukan karena karakteristiknya yang cocok untuk analisis. DNA mitokondria memiliki jumlah copy DNA yang tinggi, sehingga cocok untuk analisis dengan jumlah DNA terbatas atau DNA yang mudah terdegradasi [5]. Setelah selesai proses PCR, salah satu teknik analisis hasil PCR yang sering digunakan adalah elektroforesis [6].

Article history

Received: 13 April 2019

Accepted: 21 Mei 2019

Published: 30 Mei 2019

Access this article



***Corresponding Author:** Andzar Fikranus Shofa

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Prima Indonesia Jl. Raya Babelan No.KM 9,6, Kebalen, Kec. Babelan, Bekasi, Jawa Barat 17610 | Email: andzar_92@yahoo.com

Elektroforesis merupakan suatu teknik pemisahan berdasarkan pergerakan partikel (ion, molekul, makromolekul) dalam medan listrik. Menggunakan cara ini, molekul seperti asam nukleat dan protein dengan ukuran berbeda dapat dipisahkan satu dengan lainnya. Asam nukleat dan protein yang terpisah diurutkan komponen basa-basa nitrogennya. Pengurutan basa-basa nitrogen tersebut lebih dikenal dengan sekuensing [7].

Sekuensing DNA merupakan suatu teknik atau metode pengurutan semua nukleotida DNA atau gen, termasuk pengurutan asam amino yang dikodekan secara tepat dan cepat. Pada prinsipnya, sekuensing DNA terdiri atas preparasi DNA *template*, reaksi *annealing*, reaksi sekuensing, dan reaksi terminasi. Hasil sekuensing dapat dimanfaatkan untuk menentukan tingkat homologi urutan nukleotida DNA dengan berbagai organisme. Pemeriksaan secara menyeluruh dapat menentukan sumber DNA asal bahan yang digunakan [7].

Berdasarkan penelitian sebelumnya, DNA mitokondria babi berhasil diidentifikasi dalam kapsul gelatin lunak dan keras menggunakan teknik PCR. Dari 113 total sampel yang digunakan, ditemukan 37,2% sampel mengandung DNA mitokondria babi [8]. Namun, reliabilitas hasil PCR konvensional hanya sampai tahap komparasi amplicon sampel dengan kontrol, sehingga perlu dilakukan analisis amplicon sampai ke tahap sekuensing DNA. Analisis hasil sekuensing DNA dilakukan untuk menentukan sekuens *query* yang sesuai dengan sekuens pada *database GeneBank*, sehingga diperoleh homologi sumber gelatin sampai pada tingkat spesies.

Metode Penelitian

Alat

Alat yang digunakan meliputi alat *polymerase chain reaction* (MyGene, China), elektroforesis (Mupid-exu, Jepang), *microcentrifuge refrigerator* (Bio-Lion, America), UV-*transilluminator* (Maestrogen, Taiwan).

Bahan

Bahan yang digunakan meliputi sediaan *gummy* yang diperoleh dari toko obat di Bekasi, daging babi sebagai kontrol positif, *GeneJet Genomic DNA Purification Kit* dan *buffer TBE* (ThermoFisher Scientific, Amerika), Agarosa dan etidium bromida (Merck, Germany).

Isolasi DNA Genom dengan *GeneJet Kit*

Isolasi DNA genom daging babi dan sampel *gummy* dilakukan dengan menggunakan *GeneJet Kit*. Sekitar 25 mg daging babi yang telah halus dan 50 µl sampel *gummy* yang telah mencair dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 ml.

Selanjutnya, ditambahkan *digestion solution* dan proteinase K yang berfungsi untuk menghancurkan membran sel dan protein dalam sel. Optimasi kerja *digestion solution* dan proteinase K dilakukan pada suhu 56°C. Kemudian, larutan sampel ditambahkan *RNAse solution*, *lysis solution*, dan etanol yang selanjutnya dihomogenkan dengan *vortex*.

Selanjutnya, larutan sampel dipindahkan ke dalam *purification column* dan dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan DNA dengan kontaminan. Kemudian, ditambahkan *wash buffer 1* dan *wash buffer 2* untuk memurnikan DNA dan dilakukan sentrifugasi. Selanjutnya, ditambahkan *elution buffer* untuk melarutkan DNA dan larutan DNA yang telah murni dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 1,0%.

Amplifikasi Isolat DNA dengan PCR

Amplifikasi isolat DNA dilakukan menggunakan primer DNA mitokondria. Pada tahap ini, isolat DNA dimasukkan ke dalam mikrotube 0,2 ml, kemudian ditambahkan PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific), primer *forward* dan *reverse* serta ddH₂O. Selanjutnya campuran larutan tersebut di *spin down* [9].

Program PCR dibuat sesuai prosedur yang dilakukan Sahilah et al. (2012) yang telah dimodifikasi. Denaturasi awal dilakukan pada suhu 94°C selama 2 menit untuk memisahkan untai DNA secara sempurna. Selanjutnya diikuti 25 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 15 detik, *annealing* 55°C selama 1 menit, polimerisasi 72°C selama 35 detik dan elongasi akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 2 menit [8]. Kemudian, amplicon DNA dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5% dan divisualisasi menggunakan UV-*transilluminator*.

Sekuensing DNA

Amplicon DNA mitokondria disimpan dalam mikrotube yang ditutup rapat dan dilapisi parafilm, kemudian mikrotube dikirim ke First BASE Laboratories, Malaysia untuk proses sekuensing. Sekuensing DNA dilakukan menggunakan *ABI® PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* dengan metode Sanger yang berlangsung secara otomatis.

Analisis Hasil Sekuensing

Analisis hasil sekuensing DNA mitokondria dilakukan dengan program Bioedit, kemudian dibandingkan dengan data GeneBank menggunakan program Nucleotide Blast (<http://blastn.ncbi.nlm.nih.gov/>). Hasil analisis akan memperlihatkan homologi sekuens DNA mitokondria dari isolat DNA gelatin *chewable lozenges* yang dimiliki dengan

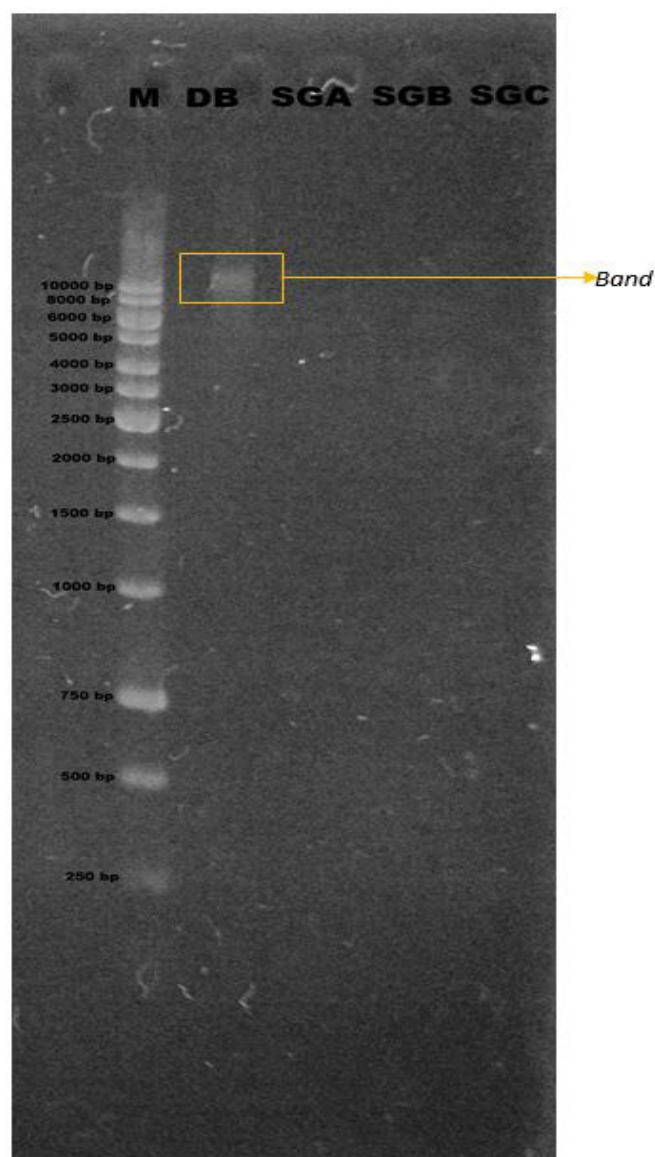
database DNA mitokondria yang ada di dalam GeneBank.

Hasil dan Diskusi

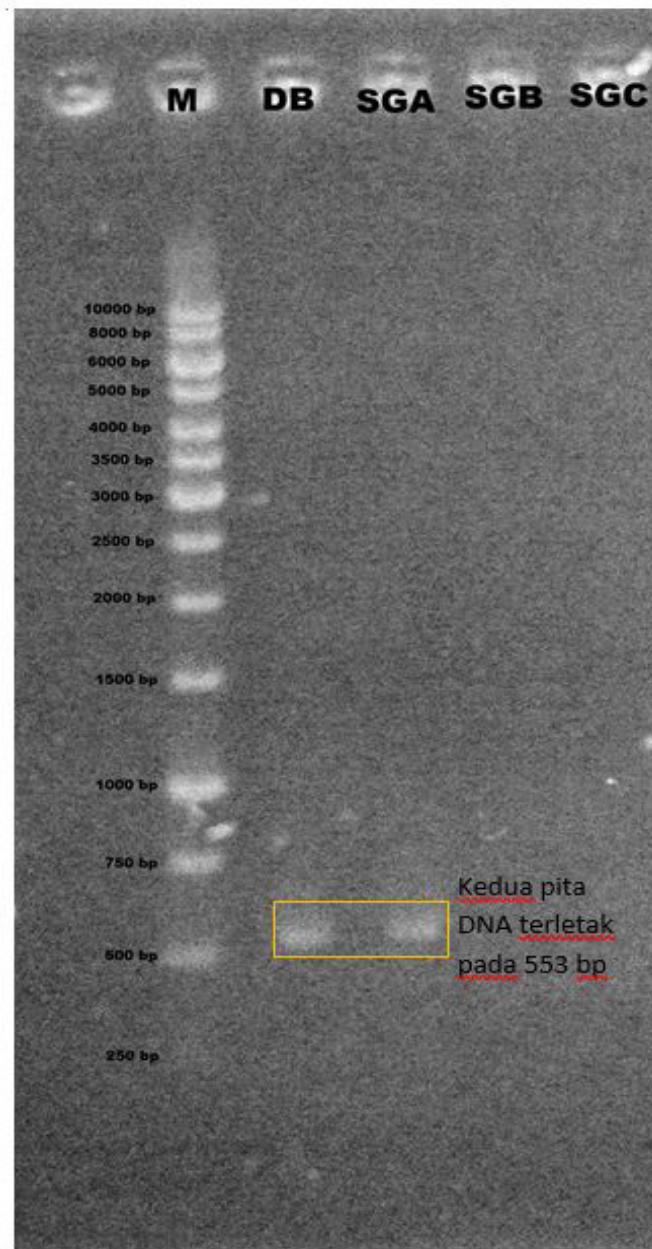
Hasil elektroforesis isolat daging babi pada [gambar 1](#) menunjukkan pita DNA diatas 10000 bp. Hal itu menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi yang terlihat merupakan DNA genom babi. Namun, hasil elektroforesis isolat sampel *gummy* tidak menunjukkan adanya pita DNA. Konsentrasi DNA yang sedikit menjadi penyebab tidak terlihatnya pita DNA. Akan tetapi, hal ini tidak memperlihatkan bahwa proses isolasi DNA tidak berhasil karena isolasi DNA daging babi berhasil dilakukan.

Amplifikasi perlu dilakukan untuk melihat keberadaan DNA mitokondria pada sampel *gummy*.

Elektroforesis amplicon DNA dilakukan menggunakan gel agarosa 1,5 % dengan tegangan 70 volt selama 50 menit. Untuk mengukur jumlah pasang basa amplicon digunakan DNA ladder 1 kb yang memiliki rentang fragmen 250 bp hingga 10000 bp. Pada [gambar 2](#), dari ketiga sampel *gummy*, hanya isolat DNA sampel *gummy* A yang berhasil diampifikasi DNA mitokondria babi dengan terlihatnya pita DNA yang sama dengan kontrol, yaitu daging babi. Pada sampel *gummy* B dan C tidak memunculkan pita DNA mitokondria yang digunakan pada penelitian ini.



Gambar 1. Hasil elektroforesis gel agarosa 1,0% isolat DNA genom dengan 1 kb DNA ladder (M), isolat daging babi (DB), isolat sampel gummy A (SGA), isolat sampel gummy B (SGB) dan isolat sampel gummy C (SGC).



Gambar 2. Hasil elektroforesis gel agarosa 1,5% amplikon gen sitokrom b dengan 1 kb DNA ladder (M), amplikon daging babi (DB), amplikon sampel gummy A (SGA), amplikon sampel gummy B (SGB) dan amplikon sampel gummy C (SGC).

Selanjutnya, untuk mengetahui ukuran molekul fragmen DNA amplikon dilakukan perhitungan intrapolasi berdasarkan *gene ruler* 1 kb. Hasil perhitungan menunjukkan pita DNA terletak pada ukuran 553 pasang basa. Hasil perhitungan intrapolasi mendekati jumlah basa yang tertera pada sekuens DNA mitokondria. Kemudian, dari ketiga sampel *gummy* tersebut, amplikon sampel *gummy* A dianalisis dengan teknik sekuensing untuk memastikan homologi dengan spesies babi tertentu.

Sekuensing DNA atau pengurutan basa DNA merupakan suatu teknik penentuan urutan basa nukleotida

pada molekul DNA [7]. Sekuensing ini digunakan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA. Identitas DNA ditentukan dengan membandingkan sekuens DNA sampel dengan sekuens DNA pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan sistem *basic local alignment* (BLAST). Hasil analisis dengan BLAST menampilkan beberapa data, yaitu data grafik *alignment*, data deskripsi sekuens, dan data *alignment* sekuens [10].

Hasil visualisasi grafik *alignment* gen sitokrom b pada [gambar 3](#) berwarna merah menandakan nilai *alignment*

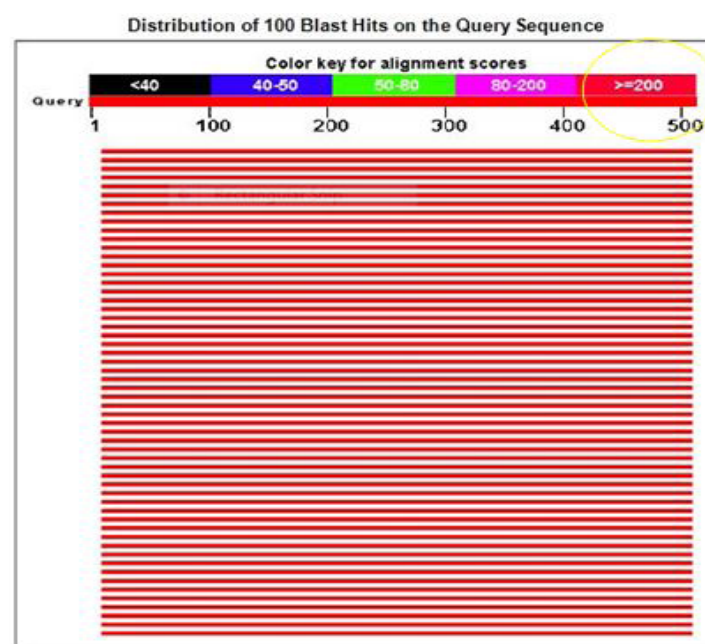
sekuens yang tinggi (≥ 200). Hal ini menunjukkan bahwa tingkat kesamaan antara sekuens *query* dengan sekuens yang ada pada *database GeneBank* cukup tinggi. Pada [gambar 4](#), deskripsi sebagian sekuens hasil *alignment* menunjukkan parameter berupa *max score*, *total score*, *query cover*, *E-value*, *identities*, dan *accession*. Parameter tersebut digunakan untuk menentukan tingkat homologi antara sekuens *query* dengan sekuens organisme tertentu yang terdapat pada *GeneBank* [11].

Parameter *identities* digunakan untuk menentukan tingkat kemiripan antara sekuens *query* dengan organisme tertentu pada *GeneBank* [12]. Hasil deskripsi pada [gambar 4](#) memperlihatkan hasil analisis identik dengan spesies babi tertentu, yakni *Sus scrofa breed long lin* yang memiliki tingkat kemiripan 99% dengan gen sitokrom b. Persentase kemiripan $\geq 99\%$ menunjukkan bahwa sekuens *query* yang dibandingkan dengan database merupakan sekuens yang sama dan memiliki kemiripan pada tingkat spesies [13]. Persentase tingkat kemiripan $\geq 95 - 98\%$ menunjukkan bahwa sekuens yang dibandingkan memiliki kemiripan pada tingkat genus [14].

Selanjutnya, parameter *max score* memperlihatkan seberapa bagus hasil *alignment* sekuens DNA *query* dengan sekuens pada *database GeneBank*. Semakin tinggi nilai *max score*, semakin bagus hasil *alignment*, sehingga memberikan gambaran bahwa sekuens *query* dan sekuens database memiliki kemiripan yang tinggi [15]. Pada [gambar 4](#) memperlihatkan *max score* antara isolat sampel *gummy A* dengan *Sus scrofa breed long lin* mencapai 904

yang merupakan nilai tertinggi hasil *alignment* sekuens *query* dengan sekuens *database GeneBank*. Polimorfisme DNA menjadi faktor penentu spesies *Sus scrofa breed long lin* berada di posisi teratas pada [gambar 4](#), sehingga memperlihatkan homologi yang tinggi antara sekuens *query* dengan sekuens database. *E-value* yang semakin rendah (mendekati 0) memperlihatkan tingkat kepercayaan yang semakin tinggi bahwa sekuens *query* memiliki tingkat homologi tinggi dengan *database GeneBank*. *E-value* antara isolat sampel *gummy A* dengan *Sus scrofa breed long lin* mencapai 0,0 menandakan isolat sampel *gummy A* memiliki tingkat homologi yang tinggi dengan *Sus scrofa breed long lin*.

Hasil analisis dengan program Nucleotide BLAST menunjukkan bahwa hasil sekuensing isolate sampel *gummy A* memiliki kemiripan tinggi dengan sekuens DNA mitokondria pembanding yang digunakan, yaitu DNA mitokondria dari spesies *Sus scrofa breed Long lin*. Kesimpulan tersebut didapat setelah melihat beberapa parameter, yaitu *max score*, *E-value*, dan *identities*. Selain itu, parameter lainnya yang digunakan dalam mengambil kesimpulan terkait dengan polimorfisme DNA. Polimorfisme DNA diartikan sebagai selisih urutan basa nukleotida DNA pada suatu organisme yang memungkinkan analisis keterkaitan DNA. Variasi urutan basa disebabkan oleh mutasi gen-gen dalam DNA. Mutasi gen tersebut menjadikan organisme satu dengan lainnya berbeda, namun masih dalam satu tingkat genus, sehingga dapat disimpulkan bahwa hasil analisis dengan program Nucleotide BLAST isolat sampel *gummy A* identik dengan spesies *Sus scrofa breed long lin*.



Gambar 3. Grafik alignment sekuens query amplikon gen sitokrom b isolat sediaan *gummy A* dengan Nucleotide BLAST.

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Sus scrofa breed Long lin mitochondrion, complete genome | 904 | 904 | 97% | 0.0 | 99% | KJ737422.1 |
| Sus scrofa mitochondrial DNA, D-loop region, partial sequence, isolate: Arafu6 | 904 | 904 | 97% | 0.0 | 99% | AB900775.1 |
| Sus scrofa breed Wuzhishan mitochondrion, complete genome | 904 | 904 | 97% | 0.0 | 99% | KF767443.1 |
| Sus scrofa isolate QB12 D-loop, complete sequence; mitochondrial | 904 | 904 | 97% | 0.0 | 99% | KF913287.1 |
| Sus scrofa isolate QB6 D-loop, complete sequence; mitochondrial | 904 | 904 | 97% | 0.0 | 99% | KF913282.1 |
| Sus scrofa isolate CJ13 D-loop, complete sequence; mitochondrial | 904 | 904 | 97% | 0.0 | 99% | KF913276.1 |
| Sus scrofa isolate CJ12 D-loop, complete sequence; mitochondrial | 904 | 904 | 97% | 0.0 | 99% | KF913275.1 |
| Sus scrofa isolate CJ7 D-loop, complete sequence; mitochondrial | 904 | 904 | 97% | 0.0 | 99% | KF913271.1 |
| Sus scrofa isolate BX5 D-loop, complete sequence; mitochondrial | 904 | 904 | 97% | 0.0 | 99% | KF913253.1 |
| Sus scrofa isolate BX2 D-loop, complete sequence; mitochondrial | 904 | 904 | 97% | 0.0 | 99% | KF913252.1 |

Gambar 4. Deskripsi sebagian hasil alignment sekuens query ampikon gen sitokrom b isolat sediaan gummy A dengan Nucleotide BLAST.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan sekuensing DNA terhadap tiga sediaan *gummy* yang diuji dapat disimpulkan bahwa sediaan *gummy* A mengandung DNA mitokondria babi yang menunjukkan homologi tinggi dengan spesies *Sus scrofa breed long lin*.

Ucapan Terimakasih

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada bapak Dr. Priyo Wahyudi, M.Si dan ibu Hariyanti, M.Si., Apt., dan Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka yang telah membantu dalam, sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

Referensi

- [1] Sulaiman TS, Aryani D, Murti YB. Chewable Lozenges of Legundi Leaf Extract (*Vitex trifolia* L.) With Variations in The Proportion of Base Glycerine-Gelatin. *Majalah Obat Tradisional (Traditional Medicine Journal)*. 2015; 20(2): 103-9.

- [2] Hjelmgard T, Thorsen PA, Bøtner JA, Kaurin J, Schmücker CM, Nærnum L. Towards Greener Stone Shot and Stone Wool Materials: Binder Systems Based on Gelatine Modified With Tannin or Transglutaminase. *Green Chemistry*. 2018; 20(17): 4102-11.
- [3] Fitriani NF, Rohman A. Primer rRNA-12S for Detection of Bovine Gelatine DNA in Capsule Shells Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *International Food Research Journal*. 2018; 25(5): 1870-1875.
- [4] Amqizal HI, Al-Kahtani HA, Ismail EA, Hayat K, Jaswir I. Identification and Verification of Porcine DNA in Commercial Gelatin and Gelatin Containing Processed Foods. *Food control*. 2017; 78: 297-303.
- [5] Ni'mah A, Kartikasari Y, Pratama AD, Kartikasari LR, Hertanto BS, Cahyadi M. Detection Of Pork Contamination In Fresh And Cooked Beef Using Genetic Marker Mitochondrial-DNA Cytochrome B By Duplex-PCR. *Journal Of Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 2016; 41(1): 7-12.
- [6] Westermeier R. *Electrophoresis in Practice: A Guide To Methods And Applications of DNA And Protein Separations*. John Wiley & Sons; 2016.
- [7] Mitra M. *DNA Sequencing Basics and Its Applications*. *SCIOL Genet Sci*. 2018;1:80-4.
- [8] Sahilah AM, Fadly ML, Norrakiah AS, Aminah A, Aida WW, Ma'aruf AG, Khan MA. Halal Market Surveillance of Soft and Hard Gel Capsules in Pharmaceutical Products Using PCR and Southern-Hybridization on The Biochip Analysis. *International Food Research Journal*. 2012;19(1): 371.
- [9] Montiel-Sosa JF, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Roncales P, Lopez-Perez MJ, Pérez-Martos A. Direct And Highly Species-Specific Detection of Pork Meat and Fat in Meat Products by PCR Amplification of Mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(7): 2829-32.

- [10] Muir P, Li S, Lou S, Wang D, Spakowicz DJ, Salichos L, Zhang J, Weinstock GM, Isaacs F, Rozowsky J, Gerstein M. The Real Cost of Sequencing: Scaling Computation to Keep Pace With Data Generation. *Genome Biology*. 2016; 17(1): 53.
- [11] Cock PJ, Chilton JM, Grüning B, Johnson JE, Soranzo N. NCBI BLAST+ Integrated Into Galaxy. *Gigascience*. 2015; 4(1): 39.
- [12] González-Pech RA, Stephens TG, Chan CX. Commonly Misunderstood Parameters of NCBI BLAST and Important Considerations for Users. *Bioinformatics*. 2018; 35(9): 1613-1614.
- [13] Stover NA, Cavalcanti AR. Using NCBI BLAST. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2017; 14(1): 11.1 – 11.1.34.
- [14] Clarridge JE. Impact Of 16S Rrna Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17(4): 840-62.
- [15] Gupta OP. Study And Analysis of Various Bioinformatics Applications Using Protein BLAST: an Overview. *Advances in Computational Sciences and Technology*. 2017;10(8):2587-601



Copyright © 2019 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)