

DETEKSI KANDUNGAN GELATIN BABI PADA PRODUK PERMEN JELLY MENGUNAKAN PENANDA GEN SITOKROM B

Detecting of swine gelatin in jelly candy using cyt b gen marker

Nuraini, H., A. Furqon, S. A. Sari, M. K. Dewi, F. M. Zainatha,
W. T. Novianti dan C. Sumantri¹⁾

¹⁾Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor,
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

ABSTRACT

Halal is an important aspect for moslem consumers which it had to considered by manufacturers and distributors of food products. The research conducted to detect swine gelatin in jelly candies using cytochrome b gene by PCR Multiplex. DNA from seven samples of jelly candies imported products were isolated and amplified by using Polymerase Chain Reaction (PCR) multiplex, using two primer specific for bovine and swine. DNA amplification product of cyt- b gene in candy samples tested showed a fragment of 398 bp target of swine and 274 bp target of bovine. Results showed that mixture of bovine and swine gelatin were detected in jelly candy products.

Key words: jelly candy, swine gelatin, Cyt b gene, PCR-multiplex

PENDAHULUAN

Keamanan pangan merupakan suatu aspek yang penting bagi konsumen dan harus diperhatikan oleh produsen maupun distributor produk pangan yang harus memenuhi aspek aman, sehat, utuh, dan halal (ASUH). Permen merupakan makanan ringan yang digemari oleh masyarakat dari berbagai tingkat umur. Permen adalah sejenis gula-gula (confectionary) yaitu makanan berkalori tinggi yang umumnya berbahan dasar gula, air, dan sirup fruktosa. Salah satu bentuk permen yang populer saat ini adalah permen jelly, yaitu permen yang dibuat dari air atau sari buah dan bahan pembentuk gel, tampilannya transparan dan mempunyai tekstur dengan kekenyalan tertentu. Bahan pembentuk gel yang umum digunakan adalah gelatin yang berfungsi untuk mengatur konsistensi produk, mengatur daya gigit dan kekerasan, tekstur produk, serta mengatur kelembutan dan daya lengket di mulut.

Gelatin tersusun oleh rangkaian molekul polipeptida yang berasal dari kolagen, yaitu komponen primer protein yang terdapat pada kulit dan tulang hewan (Poppe, 1992). Sumber bahan baku gelatin dapat berasal dari sapi (tulang dan kulit jangat), babi (hanya kulit) dan ikan (kulit). Gelatin yang ada di pasaran umumnya diproduksi dari kulit dan tulang sapi atau babi. Gelatin digunakan pada industri makanan, farmasi, obat-obatan dan industri lainnya. Penggunaan pada produk pangan biasanya pada produk permen, cokelat, es krim, hasil olahan susu, dan produk daging. Pada industri pangan, gelatin berfungsi sebagai pembentuk gel, pemantap emulsi, pengental, penjernih, pengikat air dan pelapis.

Penggunaan bahan yang berasal dari babi sebagai bahan pembuat gelatin harus diwaspadai oleh masyarakat muslim di dunia. Oleh karena itu perlu dilakukan analisis untuk mendeteksi penggunaan gelatin babi khususnya pada

produk permen jelly. Banyaknya produk permen tanpa label halal dan lengahnya pengawasan pemerintah terhadap pengujian permen impor akan meresahkan masyarakat terutama akan kehalalan produk permen jelly. Banyak produk permen yang tidak melewati pengujian Badan POM atau LPPOM MUI untuk menjamin penggunaan gelatin yang halal.

Gen sitokrom b merupakan gen yang sering digunakan dalam filogenetik untuk membandingkan beberapa spesies pada genus atau famili yang sama. Wolf *et al.* (1999) menyebutkan bahwa Sitokrom b dengan metoda PCR Multiplex juga dapat dipergunakan untuk identifikasi spesies yang terkandung dalam produk pangan. Panjang fragmen hasil amplifikasi produk PCR menggunakan Cyt b untuk kambing, ayam, sapi, domba, babi dan kuda yaitu berturut-turut 157, 227, 274, 331, 398 dan 439 pb (Matsunaga *et al.*, 1999). Cytochrome b (cyt b) adalah salah satu bagian dari sitokrom yang terlibat dalam transportasi elektron dalam mitokondria. Adanya variasi urutan pada cyt b menyebabkan gen ini banyak digunakan untuk membandingkan spesies dalam genus atau famili yang sama. Keunikan sekuen gen cyt b yaitu terdapat bagian yang bersifat kekal di dalam tingkat spesies (Widayanti, 2006).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi adanya kandungan gelatin babi pada permen jelly menggunakan primer yang berasal dari gen cytochrome b dengan teknik PCR Multipleks.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika Molekuler Ternak, Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan IPB. Pelaksanaan penelitian berlangsung mulai bulan Februari sampai Mei 2012.

mikroba awal (sebelum telur diasinkan) yang rendah, faktor pengasinan dan pemasakan.

Pengasinan pada telur menurut Damayanthi dan Mudjajanto (1995) memiliki beberapa manfaat, selain sebagai penambah citarasa juga dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme karena ion Cl dari garam bersifat racun bagi mikroorganisme dan larutan garam dapat mengurangi oksigen yang terlarut, akibatnya pertumbuhan mikroorganisme aerobik dapat terhambat selama pengasinan. Perebusan dan pengovenan selama ≥ 1 jam juga dapat menyeleksi mikroorganisme yang dapat bertahan dalam telur asin, sehingga total mikroba sebelum penyimpanan (H0) cenderung rendah terutama perlakuan yang dioven lebih lama (R+O6) dan jumlahnya tetap berada di bawah batas maksimal TPC selama penyimpanan 30 hari di suhu ruang.

KESIMPULAN

Metode pemasakan telur asin berupa kombinasi antara perebusan dan pengovenan mampu menurunkan kadar air putih telur dan total mikroba sebelum penyimpanan. Telur asin yang direbus lalu dioven selama 6 jam menghasilkan karakteristik kimia dan total mikroba terbaik dari segi rendahnya kadar air putih telur dan total mikroba selama penyimpanan.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrade, R. D. P., R. Lemus, & C. E. Perez.** 2011. Models of sorption isotherms for food: uses and limitations. *Vitae*. 18 (3): 325-334.
- Association of Official Analytical Chemist.** 2006. Official Methode of Analysis. Association of Official Analytical Chemist, Washington DC.
- Badan Standardisasi Nasional.** 2009. Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Pangan. SNI 7388:2009. Standar Nasional Indonesia, Jakarta.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet, & M. Wooton.** 2007. Ilmu Pangan. Terjemahan: H. Purnomo dan Adiono. UI-Press, Jakarta.
- Damayanthi, E. & E. S. Mudjajanto.** 1995. Teknologi Makanan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Jakarta.
- Estiasih, T. & Ahmadi.** 2011. Teknologi Pengolahan Pangan. Ed. 1, Cet.2. PT Bumi Aksara, Jakarta.
- Fardiaz, S.** 1992. Mikrobiologi Pangan. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Jay, J. M.** 2000. Modern Food Microbiology. 6th Ed. Aspen Publishers, Inc., Maryland.
- Kaewmanee, T.** 2010. Impact of salting on chemical compositions, physicochemical and functional properties of duck egg. Thesis. Food Science and Technology. Prince of Songkla University, Southern Thailand.
- Man, J. M. De.** 1999. Principles of Food Chemistry. 3rd Ed. Aspen Publishers, USA.
- Mattjik, A. A. & I. M. Sumertajaya.** 2006. Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab. IPB Press, Bogor.
- Maturin, L. & J. T. Peeler.** 2001. BAM: Aerobic Plate Count. In: Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 8th Ed. Silver Spring, USA.
- Poedjiadi, A. & F. M. T. Supriyanti.** 2005. Dasar-Dasar Biokimia. Edisi Revisi. Universitas Indonesia-Press, Jakarta.
- Ray, Bibek.** 2004. Fundamental Food Microbiology. 3rd Ed. CRC Press, USA.
- Syarief, R. & H. Halid.** 1993. Teknologi Penyimpanan Pangan. Arcan, Jakarta.
- Winarno, F. G.** 2008. Kimia Pangan dan Gizi. M-Brio Press, Bogor.
- Wulandari, Z.** 2004. Sifat fisikokimia dan total mikroba telur itik asin hasil teknik penggaraman dan lama penyimpanan yang berbeda. *Med. Pet.* Vol. 27 (2): 38-45.
- Wulandari, Z.** 2002. Sifat organoleptik, sifat fisikokimia dan total mikroba telur itik asin hasil penggaraman dengan tekanan. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

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'-GACCTCCCAGCTCCATCAAA-CATCT CATCTTG ATGAAA-3'. Sekuen primer reverse yang digunakan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Sekuen primer spesifik fragmen DNA sapi dan babi

Jenis Hewan	Reverse (5' - 3')	Hasil Amplifikasi
Sapi*	CTA GAA AAG TGT AAG ACC CGT AAT ATA AG	274 bp
Babi*	GCT GAT AGT AGA TTT GTG ATG ACC GTA	398 bp

Keterangan: * berdasarkan Matsunaga *et al.* (1999)

Bahan yang digunakan ada tujuh sampel permen jelly dengan merk berbeda (tiga diantaranya permen impor). Ekstraksi permen jelly dilakukan dengan dua metode, yaitu metode menurut Sambrook *et al.* (1999) dan dengan menggunakan kit ekstraksi. Proses ekstraksi ini merupakan titik kritis untuk mendapatkan DNA dari sampel permen jelly. DNA yang telah diekstraksi kemudian diuji kualitasnya secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer dan pengujian secara kualitatif dengan elektroforesis pada gel agarose 2 % pada tegangan 100 volt selama 40 menit.

Fragmen DNA spesifik diamplifikasi dengan metode PCR (polymerase chain reaction) yang dijalankan pada GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems™). Komponen reaksi yang digunakan terdiri atas 0,2 µl primer forward, 0,2 µl primer reverse beef, 0,2 µl primer reverse pork, 0,3 µl dNTP, 1 µl MgCl₂, 2,5 µl 10 x Buffer, 5 µl larutan Q, dan 0,2 µl taq polymerase, serta 14,4 µl DW. Kondisi denaturasi awal yaitu pada suhu 95°C selama 5 menit, 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 95°C selama 45 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 60 detik dan pemanjangan DNA baru pada suhu 72°C selama 1 menit, dan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarose 2% (v/v) yang diwarnai dengan EtBr (ethidium bromide), kemudian divisualisasi diatas penyinaran UV transilluminator.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Akhir Konsentrasi DNA Total

Sampel	A230	A260	A280	A260/A280	A260/A230	Konsentrasi
X	0,008	0,01	0,009	1,11	1,25	100
Y	0,005	0,009	0,008	1,125	1,8	90
A	0,032	0,029	0,028	1,036	0,906	290
B	0,126	0,064	0,055	1,164	0,508	640
C	0,054	0,038	0,034	1,118	0,704	380
D	0,069	0,051	0,043	1,186	0,739	510
E	0,119	0,073	0,065	1,123	0,613	730

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA Total

Gelatin adalah produk alami yang diperoleh dari hidrolisis parsial kolagen. Gelatin merupakan protein yang larut dan bersifat sebagai gelling agent (bahan pembuat gel). Sumber bahan baku gelatin dapat berasal dari sapi (tulang dan kulit jangat), babi (hanya kulit) dan ikan (kulit). Penggunaan gelatin dalam produk berkisar antara 5 - 12 % tergantung kekerasan akhir produk yang diinginkan.

Proses ekstraksi sampel menjadi titik kritis dalam penelitian ini untuk mendapatkan DNA. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor antara lain proses pengolahan yang kompleks, beragamnya bahan pada komposisi permen jelly dan sumber DNA yang terbatas. Menurut Nuraini (2004) bahan dan bumbu-bumbu yang ditambahkan dalam produk olahan menyebabkan DNA yang diekstraksi masih tercampur dengan senyawa kontaminan seperti oligopeptida, polisakarida, protein, dan bahan-bahan organik lainnya. Secara umum proses ekstraksi sampel telah berhasil dilakukan dalam penelitian ini. DNA yang didapatkan kemudian diuji kualitas dan kuantitasnya dengan spektrofotometer (Tabel 1).

Hasil ekstraksi permen jelly yang telah mengalami proses pemanasan dengan suhu tinggi pada pembuatannya menunjukkan terjadinya degradasi asam nukleat dan memiliki berat molekul yang lebih rendah dibandingkan dengan sampel DNA yang diekstraksi dari bahan mentah. Hal tersebut ditunjukkan dengan pola pita samar/tidak terang pada gel elektroforesis.

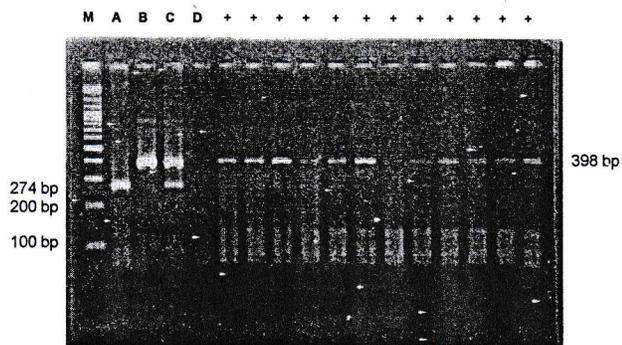
Secara kuantitatif hasil pengukuran konsentrasi dilakukan dengan spektrofotometer. Pengukuran jumlah DNA dengan spektrofotometer didasarkan pada prinsip iradiasi sinar ultraviolet yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi bervariasi antara 90 sampai 730 µg/ml. Hal ini disebabkan sampel yang diekstraksi berasal dari permen yang berbeda. Adanya bahan campuran yang berbeda pada produk mempengaruhi konsentrasi DNA yang diperoleh. Rasio absorbansi pada 260 nm dan 280 nm umumnya digunakan untuk menilai kontaminasi DNA oleh protein karena protein menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm. Nilai absorbansi pada 260/280 nm DNA murni adalah sekitar 1,8. Nilai absorbansi 260/A280 nm pada penelitian ini berkisar antara 1,036 hingga 1,186. Perbedaan ini mungkin disebabkan

oleh adanya kontaminasi protein dan bahan campuran lain yang digunakan dalam produk olahan seperti permen jelly, namun secara umum DNA hasil ekstraksi dari seluruh sampel dapat digunakan untuk proses amplifikasi.

Amplifikasi Fragmen DNA Cyt b Spesifik pada Permen Jelly

Teknik PCR merupakan metode yang sangat praktis dan akurat, mempunyai kelebihan dapat mendeteksi protein yang sudah terdegradasi (matang atau produk olahan) dalam kandungan yang sangat sedikit (μg) (Nuraini, 2004). PCR memiliki sensitivitas deteksi dan spesifisitas tinggi sehingga berpotensi untuk digunakan dalam deteksi jenis hewan. Penggunaan teknik PCR untuk identifikasi produk pangan yang telah dilakukan yaitu analisis PCR-RAPD, PCR-RFLP dan hibridisasi DNA. Penelitian ini menggunakan teknik PCR Multipleks. PCR multipleks merupakan salah satu variasi dari teknik PCR dengan beberapa primer yang digunakan bersama-sama untuk amplifikasi pada beberapa daerah target (Jain *et al.* 2007).

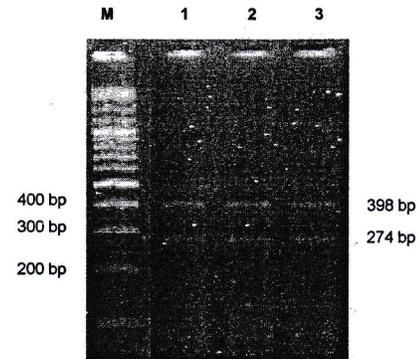
Penggunaan PCR Multipleks dan gen Cyt b dalam penelitian ini terbukti berhasil untuk deteksi dan identifikasi jenis atau sumber gelatin secara cepat, tepat, dan akurat. Primer yang digunakan terdiri atas satu primer forward untuk kedua jenis hewan dan dua primer reverse yang disusun pada daerah spesifik ternak babi dan sapi. Kespesifikan gen Cyt b terbukti dengan teramplifikasinya DNA babi dan sapi dengan panjang fragmen yang berbeda-beda dan campuran DNA (DNA mix) dari kedua ternak dapat diamplifikasi dalam satu reaksi, sehingga kedua pita dapat divisualisasi dalam satu sumur gel elektroforesis (Gambar 1).



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi fragmen DNA Cyt b spesifik dari permen jelly pada gel agarose 2%. M: marker 100 pb, A: kontrol DNA sapi, B: kontrol DNA babi, C: kontrol DNA campuran babi dan sapi, D: kontrol Destilasi Water, +: DNA permen jelly

Amplifikasi fragmen DNA sapi dan babi telah berhasil dilakukan dengan munculnya pita pada target 274 pb (sapi) dan 398 pb (babi). Pada kontrol Destilasi Water tidak menunjukkan pita DNA yang muncul, hal ini menandakan tidak terjadinya kontaminasi pada saat persiapan sampel maupun pembuatan premix PCR. Hasil amplifikasi fragmen DNA Cyt b pada sampel permen jelly menunjukkan bahwa gelatin yang digunakan pada komposisi permen tersebut adalah gelatin babi dengan muncul pita DNA babi pada target 398 pb. Selain itu, pada sampel C telah berhasil teramplifikasi DNA sapi dan babi pada pita 274 pb dan 398 pb yang

berarti bahwa sampel C menggunakan gelatin yang berasal dari babi dan sapi (Gambar 2).



Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi fragmen DNA Cyt b spesifik pada sampel C pada gel agarose 2%. M: marker 100 pb, 1-3: DNA permen jelly sampel C

Identifikasi jenis hewan pada produk pangan dengan teknik PCR multipleks memperlihatkan hasil yang sangat baik untuk mendeteksi cemaran gelatin babi pada permen jelly sehingga teknik ini berpotensi handal dan tepat dalam analisis keamanan pangan khususnya untuk sertifikasi aman dan halal. Kedepannya diharapkan metode ini dapat dijadikan alternatif pengujian keamanan dan kehalalan produk pangan yang menggunakan gelatin dalam komposisinya seperti ice cream, edible film, kapsul dan lain-lain.

KESIMPULAN

Kombinasi gen Cyt b dengan teknik PCR multipleks dapat mendeteksi adanya kandungan gelatin babi pada produk pangan permen jelly. Selain itu dapat mendeteksi adanya campuran bahan pembuat gelatin pada permen jelly.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh kegiatan Program Kreativitas Mahasiswa bidang Penelitian (PKM-P), Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) Kementerian Pendidikan Nasional tahun anggaran 2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Cole, G. B. 2001. Gelatine : It's Properties And It's Application In Dairy Product. Presented at The Dairy Symposium. Gordon Bay, South Africa.
- Jain S, Brahmabhai M.N, Rank D.N, Joshi C.G & Solank J.V. 2007 Use of cytochrome b gene variability in detecting meat species by multiplex PCR assay. *Ind J. Anim Sci.* 77(9):880-881.
- Matsunaga, T., K. Chikuni, R. Tanabe, S. Muroya, K. Shibata, J. Yamamda & Y. Shinmura, 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* 51: 143-148.
- Meyer, R., U. Candrian & J. Luthy, 1994. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *J. AOAC Int.* 77 (3):617-622.
- Minarovic, T., A. Trakovicka, A. Rafayova & Z. Lieskovska, 2010. Animal species identification by PCR-

- RFLP of cytochrome b. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*. 43 (1) : 296.
- Nuraini H.** 2004. Pengembangan sekuens Porcine Repetitive Element (PRE-1) sebagai penanda molekuler untuk mendeteksi material babi pada produk daging olahan. [Disertasi]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Nuraini, H., A. Primasari, E. Andreas & C. Sumantri,** 2011. The cytochrome b gene as a specific markers for the rat meat (*Rattus norvegicus*) on raw meat and processed meat product. *Journal of Animal Science & Technology*. Vol. 35.1.15. Page : 15 – 20.
- Pfeiffer, I., J. Burger & B. Brenig,** 2004. Diagnostic polymorphism in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR-RFLP. *BMC Genet.* 5:30.
- Poppe, Y.** 1992. *Thickening and Gelling Agents for Food*. Edited by Imeson Blackie. Academic and Professional. London.
- Price, J. F. & B.S. Schweigert,** 1987. *The Science of Meat and Meat Products*. Third Edition. Food & Nutrition Press, Inc. Westport, Connecticut. USA.
- Reich, J.G., H. Drabsch & A. Daumler,** 1984. On the statistical assessment of similarities in DNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 12 (13): 5529 – 43.
- Sambrook, J. & D. Russell,** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United State of America.
- Wolf, C., J. Rentsch & P. Hübner,** 1999. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1350–1355.
- Widayanti R.** 2006. Kajian penanda genetik gen cytochrome b dan daerah D-Loop pada *Tarsius* sp [disertasi]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.