

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Dendeng**

Dendeng adalah salah satu produk awetan yang berbahan dasar daging yang dikeringkan dalam proses pembuatannya, dan sangat populer di Indonesia. Dendeng sapi adalah produk makanan yang berbentuk lempengan yang terbuat dari irisan atau gilingan daging sapi segar yang telah diberi bumbu dan dikeringkan (SNI, 1992). Dendeng bisa dibuat dari daging sapi, ikan, udang, babi dan bekicot.

#### **B. Babi**

##### 1. Klasifikasi babi

Babi adalah hewan asli dari Eurasia, babi sejenis hewan ungulata yang bermuncung panjang dan berhidung. Familia babi adalah Suidae termasuk spesies *Sus barbatus*, *Sus bucculentus*, *Sus cebifrons*, *Sus celebensis*, *Sus domesticus*, *Sus heureni*, *Sus philippensis*, *Sus salvanius*, *Sus scrofa*, *Sus timoriensis*, *Sus verrucosus*. Babi juga dikenali sebagai khinzir (perkataan Arab). Babi salah satu hewan berjenis omnivora, yang berarti mengkonsumsi baik daging maupun tumbuh-tumbuhan (Wijaya, 2009).

##### 2. Hukum babi menurut syariat islam

Babi merupakan binatang yang diharamkan untuk dimakan maupun dipelihara, hal ini dijelaskan dalam QS. Al-Baqarah ayat 173 :  
”*Sesungguhnya Dia hanya mengharamkan atasmu bangkai, darah, daging babi, dan (daging) hewan yang disembelih dengan (menyebut nama) selain Allah. Tetapi barang siapa terpaksa (memakannya), bukan karena menginginkannya dan tidak (pula) melampaui batas, maka tidak ada dosa baginya. Sesungguhnya Allah Maha Pengampun, Maha Penyayang*”.

Di dalam QS. Al-An'am ayat 145 juga diterangkan tentang diharamkannya daging babi, Katakanlah : "*Tidak kudapati di dalam apa yang telah diwahyukan kepadaku, sesuatu yang diharamkan memakannya, kecuali daging hewan yang mati (bangkai), darah yang mengalir, daging babi, karena semua itu kotor, atau yang disembelih bukan atas (nama) Allah. Tetapi barang siapa terpaksa bukan karena menginginkannya dan tidak melebihi (batas darurat) maka sungguh, Tuhanmu Maha Pengampun, Maha Penyayang*".

Keharaman babi juga dijelaskan dalam QS. Al-Maidah ayat 3 dan QS. An-Nahl ayat 115.

### 3. Bahaya mengkonsumsi babi

Berdasarkan ilmu pengetahuan modern telah mengungkapkan bahwa memakan daging babi akan menyebabkan banyak terkena banyak penyakit. Jika mengkonsumsi daging babi yang terkena cacung babi akan terjadinya peningkatan kolesterol dan perlambatan proses penguraian protein dalam tubuh yang nantinya akan menyebabkan kanker usus, iritasi kulit, eksim dan rematik (Abu Zaid, 1997). Selain itu juga dapat menyebabkan urat nadi akan mengeras, tekanan darah naik, serta angina pektoris (Wijaya, 2009). Penelitian ilmiah di negara Cina dan Swedia, mengungkapkan bahwa daging babi merupakan penyebab utama kanker anus dan kolon (Wijaya, 2009).

## C. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

### 1. Pengertian PCR

PCR adalah suatu teknik amplifikasi potongan DNA pada daerah yang spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida dengan bantuan enzim polimerase yang dilakukan secara *in vitro*. Primer yang digunakan sebagai pembatas daerah yang diamplifikasi adalah DNA untai-tunggal yang urutannya komplemen dengan DNA templatnya. Primer yang berada sebelum daerah target disebut *primer forward* dan yang berada setelah daerah target disebut *primer reverse*.

Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP, dCTP, dGTP dan dTTP. Amplifikasi sekuen DNA target dapat memperoleh  $10^6$ - $10^9$  kali jumlah DNA target awal. Amplifikasi ini dapat menghasilkan lebih dari sejuta kali DNA asli. (Koolman dan Heinrich Röhm, 1995; Muladno, 2010; dan Sudjadi, 2008).

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

## 2. Prinsip kerja PCR

Prinsip dasar PCR dimulai dengan melakukan denaturasi DNA cetakan sehingga rantai DNA yang berantai ganda akan terpisah menjadi rantai tunggal. Denaturasi DNA dilakukan dengan menggunakan suhu panas ( $95^{\circ}\text{C}$ ) selama 1-2 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi  $55^{\circ}\text{C}$  sehingga primer akan menempel pada cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. Primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Suhu  $55^{\circ}\text{C}$  yang dipergunakan untuk menempelkan primer pada dasarnya merupakan kompromi. Amplifikasi akan lebih efisien jika dilakukan pada suhu yang lebih rendah ( $37^{\circ}\text{C}$ ), tetapi biasanya akan terjadi *mispriming* yaitu penempelan primer pada tempat yang salah. Pada suhu yang lebih tinggi ( $55^{\circ}\text{C}$ ), spesifikasi reaksi amplifikasi akan meningkat, tetapi secara keseluruhan efisiensinya akan menurun (Yuwono, 2006).

## 3. *Real-Time* PCR

### a. Pengertian *Real-Time* PCR

*Real-time* PCR adalah salah satu teknik yang paling banyak digunakan dalam molekuler modern biologi (Vaerman, 2004). *Real-*

*Time* PCR memiliki berbagai keunggulan, yaitu amplifikasi (perbanyak DNA fragmen) dapat diamati secara cepat, dapat menentukan konsentrasi DNA yang terdapat pada sampel. Sehingga teknik ini disebut *Quantitative* PCR (qPCR) (Yepihardi, 2009).

Proses amplifikasi menggunakan *Real-Time* PCR memiliki prinsip yang sama dengan proses amplifikasi PCR secara konvensional. Namun pada *Real-Time* PCR terdapat tambahan komponen PCR yaitu *probe*. *Probe* merupakan primer yang diberi label pewarna *dye* terdiri dari *reporter* dan peredam pewarna (*quencher*). Fluoresensi dari *reporter* hanya dilepaskan ketika dua pewarna secara fisik terpisah melalui hibridisasi atau aktivitas nuklease. Standar posisi label *dye*, yaitu *quencher* berada pada 3' dan *reporter* pada 5' *probe* (Johansson, 2006).

Instrumen *Real-Time* PCR mendeteksi ampikon dengan mengukur peningkatan pewarna (*dye*) fluoresen yang berpendar ketika terikat dengan *double-stranded* DNA. Karena sifat inilah maka pertumbuhan fragmen DNA hasil amplifikasi dapat diikuti secara seketika, semakin banyak DNA yang terbentuk semakin tinggi pula intensitas fluoresen yang dihasilkan. *Quantitative* PCR dimungkinkan dapat mendeteksi secara akurat konsentrasi DNA hingga hitungan pikogram atau setara dengan sel tunggal karena sensitifitas pewarna yang sangat tinggi. Hasil peningkatan fluoresen digambarkan melalui kurva amplifikasi yang menunjukkan tiga fasa yaitu fasa awal, fasa eksponensial atau puncak dan fasa *plateau* atau stabil (Vaerman, 2004).

*Real-Time* PCR menggunakan seperangkat *software* bekerja secara akurat, cepat, sensitif dan fleksibel. *Real-Time* PCR dapat menganalisa hingga 96 sampel menggunakan *multiwell plates*. Alat ini memiliki tiga komponen utama yaitu *thermal block cycler* sebagai akurasi data, *optical system* sebagai deteksi data, dan *software* sebagai analisis data. *Real-Time* PCR dilengkapi dengan analisa kurva

melting, dapat untuk melakukan kuantifikasi secara absolut dan kuantifikasi secara relative (Roche, 2008 *cit* Cahyaningtyas, 2012).

b. Format Sinyal Deteksi pada *Real-Time* PCR

1) Monitor PCR dengan pewarna SYBR *green* I

Pengukuran sinyal fluoresensi SYBR *green* I dapat mendeteksi produk PCR. SYBR *green* I berinterkalasi ke heliks dsDNA (*double strand* DNA). Pewarna (*dye*) SYBR *green* I adalah reagen yang dipilih karena sangat stabil untuk mengukur kuantitas DNA total. Selama proses penempelan, primer PCR berhibridisasi ke untai DNA target dan sedikit daerah dsDNA yang berinterkalasi dengan SYBR *green* I, sinyal fluoresen sedikit meningkat. Pada tahap elongasi, dsDNA lebih terbentuk dan lebih banyak pewarna SYBR *green* I dapat berinterkalasi, sinyal fluoresensi meningkat. Pada akhir fase ekstensi, semua DNA telah berbentuk untai ganda dan jumlah interkalasi SYBR *green* I mencapai maksimum.

2) Monitor PCR dengan *Hydrolysis Probe*

*Hydrolysis Probe* digunakan untuk mendeteksi urutan DNA target spesifik. *Probe* ini berisi dua label, sebuah fluoresen *reporter* dan sebuah *quencher*, dengan jarak yang dekat satu sama lain. Bila *probe* yang utuh, pewarna *quencher* cukup dekat dengan pewarna *reporter* yang bertujuan untuk menekan sinyal fluoresen *reporter*. Selama PCR, aktivitas polimerase 5'-nuklease akan membelah hidrolisis *probe*, dan memisahkan *reporter* dari *quencher*. *Probe* yang terbelah atau terpisah akan menyebabkan sinyal fluoresen *reporter* tidak lagi diredam, sehingga *reporter* akan memancarkan sinyal fluoresen saat tereksitasi.

### 3) Monitor PCR dengan *Hybprobe Probes*

Dalam format deteksi *HybProbe*, *probe* urutan spesifik oligonukleotida berlabel dengan pewarna fluoresen yang berbeda, disebut donor dan akseptor, berhibridisasi ke urutan target pada fragmen DNA diperkuat dalam susunan kepala-ke-ekor, sehingga membawa dua pewarna kepada jarak yang dekat. Pewarna donor (misalnya, fluorescein) sangat tertarik dengan memilih filter eksitasi yang sesuai (483 nm). Ketika dua pewarna yang dekat satu sama lain, energi yang dipancarkan oleh pewarna donor menarik pewarna akseptor melekat pada kedua *HybProbe* oligonukleotida, yang kemudian memancarkan cahaya fluoresensi pada panjang gelombang yang berbeda. Jumlah fluoresensi dipancarkan secara langsung dengan jumlah DNA target yang dihasilkan selama PCR.

### 4. DNA (*Deoxyribonucleic Acid*)

DNA adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan merupakan pembawa informasi genetik yang diturunkan kepada jasad keturunannya (Yuwono, 2009). Asam deoksiribonukleat atau DNA terutama ditemukan di dalam inti sel (Silverstein *et al*, 2009). DNA merupakan polimer dari nukleotida-nukleotida. Setiap nukleotida tersusun oleh tiga komponen, yaitu molekul gula pentosa (*deoxyribose*), gugus fosfat dan basa nitrogen (Muladno, 2010). Basa nitrogen yang menyusun nukleotida dikelompokkan menjadi 2 yaitu:

- a. Purin, yaitu basa nitrogen yang strukturnya berupa dua cincin. Termasuk diantaranya adalah adenin dan guanin.
- b. Pirimidin, yaitu basa nitrogen yang strukturnya berupa satu cincin. Termasuk diantaranya adalah sitosin dan timin (Priyani, 2004).

Untai ganda molekul DNA dapat dipisahkan atau terdenaturasi dengan perlakuan suhu maupun senyawa alkali sehingga konformasinya berubah. Tingkat denaturasi DNA tergantung pada

tingginya suhu. Semakin tinggi suhunya maka semakin banyak bagian DNA yang berubah menjadi struktur untai tunggal. Denaturasi lengkap biasanya terjadi pada suhu 90°C. Selain dapat terdenaturasi, DNA juga dapat ter-renaturasi, yaitu untai-tunggal yang terdenaturasi menjadi untai-ganda kembali dengan adanya ikatan hidrogen. Suhu renaturasi biasanya sekitar 60°C. Faktor lain yang menentukan laju renaturasi adalah konsentrasi DNA. Semakin tinggi konsentrasinya maka probabilitas tumbukan antarmolekul untai tunggal DNA menjadi semakin besar (Yuwono, 2009).

#### 5. Isolasi dan pemurnian DNA

Pada organisme eukariot isolasi DNA dilakukan melalui beberapa proses, yaitu proses penghancuran sel (lisis), pemusnahan protein dan RNA dan pemurnian DNA. Penghancuran sel secara kimiawi dilakukan dengan menggunakan senyawa kimia seperti lisozim, EDTA (*Etilendiamin Tetraasetat*) berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium, di mana ion magnesium berfungsi untuk mempertahankan integritas sel dan mempertahankan aktivitas enzim nuklease yang merusak asam nukleat. Senyawa kimia selanjutnya adalah SDS (*Sodium Dodesil Sulfat*). SDS adalah sejenis deterjen yang digunakan untuk merusak membran sel sehingga sel mengalami lisis. Pengrusakan sel oleh EDTA dan SDS menghasilkan kotoran sel yang dibersihkan dengan larutan, enzim RNase digunakan untuk merusak molekul tersebut. DNA dapat diisolasi secara utuh dengan hilangnya protein dari RNA (Muladno, 2010).

Cara untuk mengisolasi DNA, selain selain dengan cara manual juga dapat menggunakan seperangkat mesin Kit pemurnian DNA yang bekerja secara otomatis, singkat dan efisien. Pemurnian DNA dari darah, sel-sel atau sampel jaringan. Instrumen ini melakukan pemurnian DNA secara magnetik dapat memproses sampai dengan 16 sampel dalam waktu 30-40 menit. DNA yang telah dimurnikan dapat digunakan langsung dalam berbagai aplikasi termasuk PCR, restriksi

oleh enzim endonuklease dan elektroforesis gel agarosa. Mesin purifikasi DNA memurnikan sampel dengan bantuan partikel paramagnetik (PMPs). Sampel cair dan padat dapat diproses dengan menggunakan mesin Kit, mesin ini dilengkapi dengan *cartridge* yang berisi lisis buffer, MagnesiI PMPs, *wash buffer* (Promega, 2007). Cara kerja mesin purifikasi DNA terdiri dari 4 tahapan yaitu proses pemecahan sel (*lysis*), pengikatan DNA atau RNA (*binding*), pencucian (*washing*) dan elusi (*elution*) (Otto, 2002).

#### 6. Primer

Polimerisasi DNA dapat dimulai jika tersedia molekul primer, yaitu molekul yang digunakan untuk mengawali proses polimerisasi untai DNA. Fungsi primer adalah menyediakan ujung 3'-OH yang akan digunakan untuk menempelkan molekul DNA (nukleotida) pertama pada untai DNA baru dalam proses polimerisasi (Yuwono, 2009). PCR memberikan hasil yang baik dengan menggunakan primer berukuran 32 basa, tetapi sebaiknya menggunakan primer atau oligonukleotida berukuran 16 basa.

#### 7. Elektroforesis Gel Agarosa

Gel elektroforesis adalah suatu teknik untuk memisahkan molekul menggunakan medan listrik berdasarkan ukurannya. Didalam medan listrik DNA akan menuju elektroda yang bermuatan positif karena DNA mengandung gugus fosfat yang bermuatan negatif (Marks, Dawn B *et al*, 2000). Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 pb dan dijalankan secara horizontal, sedangkan elektroforesis poliakrilamid dapat memisahkan 1 pb dan dijalankan secara vertikal. Elektroforesis poliakrilamid biasanya digunakan untuk menentukan urutan DNA (Gaffar, 2007).

Faktor-faktor yang menentukan kecepatan migrasi DNA (Muladno, 2010):

- a. Ukuran molekul DNA. Ukuran panjang dan bentuk DNA mempengaruhi migrasi DNA. Fragmen DNA yang berukuran besar akan bermigrasi lebih lambat dibandingkan dengan fragmen DNA yang berukuran lebih kecil. Sehingga elektroforesis dapat memisahkan fragmen berdasarkan ukuran panjang DNA.
- b. Konsentrasi agarosa. Migrasi molekul DNA pada gel berkonsentrasi lebih tinggi lebih lama daripada migrasi molekul DNA yang sama pada gel berkonsentrasi rendah.

**Tabel 1. Konsentrasi gel yang diperlukan untuk separasi DNA (Promega cit sriati, 2011)**

% Agarosa	Resolusi optimal untuk DNA Linear
0.5	1.000-30.000 pb
0.7	800-12.000 pb
1.0	500-10.000 pb
1.2	400-7.000 pb
1.5	200-3.000 pb
2.0	500-2.000 pb

- c. Konformasi DNA. Konformasi rangkaian molekul DNA yang berukuran sama akan bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda.
- d. Voltase yang digunakan. Pada voltase rendah, kecepatan migrasi DNA sebanding dengan tingginya voltase yang digunakan. Tetapi, jika penggunaan voltase dinaikkan, mobilitas molekul DNA meningkat secara tajam. Ini mengakibatkan pemisahan molekul DNA di dalam sel menurun dengan meningkatnya voltase yang digunakan. Penggunaan voltase yang ideal untuk mendapatkan separasi molekul DNA berukuran lebih besar 2 kb adalah tidak lebih dari 5 Volt per cm.

- e. Etidium bromida di dalam gel. Menyebabkan tingkat kecepatan migrasi molekul DNA linear berkurang sebesar 15%.
- f. Komposisi larutan buffer. Aliran listrik akan sangat minimal dan migrasi DNA sangat lambat, jika tidak ada kekuatan ion di dalam larutan. Larutan buffer berkekuatan ion tinggi akan meningkatkan panas, sehingga aliran listrik menjadi maksimal.

Ada kemungkinan gel akan meleleh dan DNA dapat mengalami denaturasi. Larutan buffer yang digunakan adalah TAE (*Tris Acetic Acid*) dan TBE (*Tris Boric Acid*). Larutan etidium bromide digunakan untuk visualisasi, larutan tersebut akan masuk di antara ikatan hydrogen yang terletak pada DNA, sehingga di bawah lampu UV pita fragmen DNA akan terlihat (Gaffar, 2007).

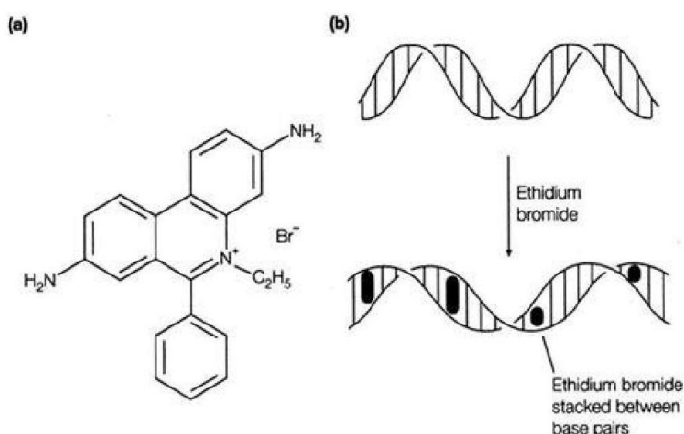


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.

**Gambar 1. Proses interkalasi etidium bromida pada DNA Larutan etidium bromida sangat berbahaya dan bersifat karsinogen (Nottebaum, 1999 cit Sriati, 2011)**

Semua larutan yang mengandung etidium bromida harus didekontaminasi sebelum dibuang (Muladno, 2010). Untuk menghindari bahaya yang ditimbulkan oleh etidium bromida, maka

sebagai gantinya dapat menggunakan larutan SYBR *safe*, pewarna SYBR *safe* di bawah sinar UV dapat membuat DNA berpendar. Pada gel agarosa menunjukkan hasil positif bahwa terdapat DNA pada setiap lajur jika pita pada DNA berpendar (Sambrook dan Russel tahun, 2001 *cit* Sriati, 2011).

