

Desain primer untuk identifikasi daging katak menggunakan teknik pentaplex PCR

Norman Yoshi Haryono*

Prodi Bioteknologi, Departemen Sains Terapan, FMIPA, Universitas Negeri Malang

Jl. Semarang no 5 Malang 65123, Jawa Timur, Indonesia

*Penulis korespondensi, Surel: norman.haryono.fmipa@um.ac.id

Paper received: 02-05-2022; revised: 16-05-2022; accepted: 31-05-2022

Abstract

Frog is non-halal food source that is vulnerable to be used as halal food replacement or food adulteration. Therefore, this study's purpose was to design the primer for identifying the presence of frog meat in food product using pentaplex PCR technique. The primers were designed based on the sequence of cytochrome b gene from frog (*Rana temporaria*) stored in gene bank NCBI. PrimerBlast was used as the *in silico* tool for primer designing using some parameters such as amplicons length and T_m value of the primer. Ten primer pairs were produced as candidates to be used in the PCR analysis, but the chosen five pairs, namely primer 1, 2, 4, 7, and 10, were based on the amplification region from each primer pair. The region from those 5 primers were expected to boost the sensitivity of pentaplex PCR as the development method for halal food assurance.

Keywords: halal product assurance; *in silico*; frog; PCR primer

Abstrak

Katak merupakan salah satu bahan pangan non-halal yang rentan digunakan untuk pemalsuan atau campuran bahan pangan. Maka dari itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendesain primer yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan daging katak dalam produk olahan pangan menggunakan teknik pentaplex PCR. Primer didesain berdasarkan urutan gen sitokrom b dari katak (*Rana temporaria*) yang dapat diakses pada gen bank NCBI. Desain primer tersebut dilakukan secara *in silico* menggunakan PrimerBlast dengan beberapa parameter seperti panjang amplicon dan nilai T_m dari primer. Dari 10 kandidat primer yang diperoleh, dipilih 5 primer yang akan digunakan sebagai primer untuk pentaplex PCR yakni pasangan primer nomor 1, 2, 4, 7, dan 10 yang didasarkan pada daerah amplifikasi dari masing-masing pasangan primer. Kelima primer tersebut diharapkan tidak hanya mencakup hampir keseluruhan gen sitokrom b katak tetapi juga meningkatkan sensitivitas sebagai upaya penjaminan produk halal.

Kata kunci: jaminan produk halal; *in silico*; katak; primer PCR

1. Pendahuluan

Jaminan produk halal merupakan hal yang penting terutama bagi umat Muslim khususnya di Indonesia. Jaminan tersebut terkait dari bahan baku, bahan tambahan, dan prosedur yang digunakan produsen dalam mengolah produk makanan dan minuman. Hal ini berkaitan dengan pertumbuhan industri halal yang pesat secara global yang menyumbang perekonomian dunia hingga 1,6 milyar USD (Anonim, 2015). Hal tersebut menyebabkan produk makanan dan minuman rentan terhadap pemalsuan dengan penggunaan bahan non-halal yang lebih murah demi mendapatkan keuntungan bagi produsen. Banyak bahan baku non-halal yang digunakan dalam campuran produk makanan halal seperti anjing, babi, dan babi hutan (Montowska dan Pospiech, 2011). Maka dari itu pengembangan metode identifikasi bahan pangan non-halal terus berkembang.

Metode paling berkembang yang digunakan untuk keperluan tersebut adalah analisis terhadap protein dan DNA dari bahan baku. Walaupun analisis yang menggunakan protein

memiliki nilai lebih dalam hal ketersediaan berbagai kit protein dengan harga yang terjangkau, namun memiliki kelemahan utama dengan teknik analisis DNA terutama untuk produk pangan yang telah diolah secara ekstensif karena denaturasi dari protein itu sendiri (Montowska *et al.*, 2014). Gelatin yang merupakan turunan protein dapat diidentifikasi status kehalalan sumbernya menggunakan teknik *Fourier Transfor Infra Red* (FTIR) spektroskopi namun tetap memerlukan konfirmasi dari analisis PCR (Jariyah *et al.*, 2021). Hal tersebut membuat analisis berbasis DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk keperluan identifikasi kehalalan bahan pangan.

Identifikasi keberadaan daging anjing dalam bakso sapi telah berhasil dilakukan menggunakan *Real-Time PCR* dengan primer yang didesain berdasarkan urutan sitokrom b (Rohman *et al.*, 2020). Teknik PCR jenis lain yakni *Two Direct-Triplex PCR* yang berkembang menjadi *Direct Pentaplex* telah digunakan untuk mengidentifikasi berbagai jenis daging yaitu babi, sapi, kuda, ayam, kalkun, anjing, domba, dan kerbau (Thanakiatrai dan Kitpipit, 2017 dan Thanakiatrai *et al.*, 2019). *Pentaplex PCR* atau yang bisa disebut sebagai *multiplex PCR* memiliki kelebihan dibanding teknik PCR biasa yakni dapat mengatasi adanya fenomena *false negative* dan juga memiliki sensitivitas yang lebih tinggi (Kim dan Kim, 2017). *Multiplex PCR* juga dapat mengamplifikasi berbagai target DNA sehingga menambah keakuratan dari target yang dianalisis (Nan, *et al.*, 2021).

Indonesia telah memiliki panduan dalam analisis bahan pangan menggunakan teknik PCR yang tertuang dalam ISO/TS 20224-3:2020(E) Badan Standardisasi Nasional. Namun demikian, pengembangan metode analisis daging katak sebagai salah satu bahan pangan non-halal masih belum banyak dikembangkan. Analisis dengan FTIR adalah salah satu yang telah digunakan dalam mendeteksi keberadaan katak dalam makanan dengan membandingkan spektrum serapan untuk minyak katak, tetapi tidak didukung dengan perbandingan terhadap profil spektrum serapan minyak hewani lain (Ali *et al.*, 2015). Maka dari itu dalam penelitian ini dikembangkan primer pentaplex untuk analisis identifikasi keberadaan daging katak menggunakan teknik PCR sebagai salah satu upaya dalam jaminan produk halal.

2. Metode

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang dilakukan pada bulan Oktober 2022 di Laboratorium Bioteknologi, FMIPA UM menggunakan teknik *in silico*. Subjek dari penelitian ini adalah urutan gen sitokrom b dari katak (*Rana temporaria*) yang dapat diakses di bank gen NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan nomor akses yaitu NC_042226.1. Prosedur desain primer ini dilakukan dengan menggunakan *online software* PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) dengan parameter yakni: (1) panjang produk 70-1000 pb (2) jumlah primer hasil desain adalah 10 (3) rentang nilai Tm (*primer melting temperature*) adalah 57-60-63 °C. Dari 10 kandidat primer yang dihasilkan, dipilih 5 pasang primer sebagai primer pentaplex berdasarkan daerah amplifikasi masing-masing primer pada urutan gen sitokrom b dari *Rana temporaria*.

3. Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan gen mitokondria sitokrom b dari katak (*Rana temporaria*) sebagai dasar pembuatan primer. Hal ini dikarenakan sitokrom b memiliki ciri khas unik dimana terdapat situs mutasi spesifik bagi tiap spesies sehingga dapat digunakan sebagai *marker* untuk proses investigasi (Sharun *et al.*, 2022). Selain itu, sitokrom b juga bertindak sebagai DNA universal yang dapat membedakan antara banyak spesies hewan (Yacoub *et al.*,

2013). Urutan lengkap nukleotida pengkode sitokrom dari *Rana temporaria* sepanjang 1143 pasang basa (pb) ditampilkan pada Gambar 1,

```

1   atggcccca caatacgtaa atcccacccg atcctcaaaa ttattaacgg ctcatcatt 60
61   gatctcccaa cccctccaa catttccgcc tgatgaaact tcggatcact tctaggcgta 120
121  tgcctaattg cccaaatcgc caccggctta tttttggcta tacactatac agccgatacc 180
181  tccctcgcat tctcatctat cgcccacatc tgcgggatg ttaataacgg ctggctcctt 240
241  cgtaatcttc atgccaacgg tgcattcatt ttctttatct gtatctactt ccatatcgga 300
301  cggggccttt attacggctc atacctctac aaagagacat gaaacatcgg agtaatcctc 360
361  ttattcttag taatagccac agcttttgtc ggctatgttc ttccatgggg gcaaatgtca 420
421  ttttgagggtg ccacagtaat tactaacctt ctctcagccg cccctacatc cggctacgac 480
481  ctggtccaat ggatctgagg ggggttctca gtagacaatg caactcttac ccgattcttc 540
541  acattccact ttatccttcc gtttattatc gctgctgtga gcataattca tcttctatct 600
601  ttgcatcaga cagggtcac taacccaccc ggactcaact ctaatctaga caaagtctca 660
661  ttccacccat acttctctta taaagacctc ttccggtctg ttattttact tgggtgacta 720
721  gcagccctat caaccttctc tcccaatctg ctcggagacc cagacaattt tacaccagct 780
781  aatcccttag ttacaccccc tcacattaaa ccagaatgat atttcttatt tgcctacgct 841
841  attctccgct caatcccca taaactggga ggagtcttag cccttctctt ctccatcctc 900
901  attctcttct taataccctc caccacaccc tccaaacttc gctcccttat gttccgacct 960
961  atcgcgaaaa tctttttttg aaccttaatc gccaacacaa ctatcctcac atgaatcgga 1020
1021 ggacagccag tggaagatcc atttattatc atcggccaaa ttacctcagc cctctacttt 1080
1081 ttaatctttg tcctccttgt tcccacttta ggctctttag agaataaact ccttaaaatc 1140
1141 taa

```

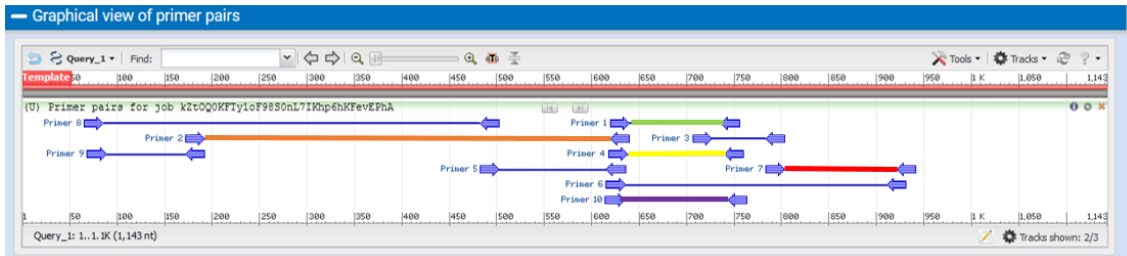
Gambar 1. Urutan Nukleotida Sitokrom b dari Rana Temporaria

Tabel 1. Luaran Desain Kandidat Primer *Pentaplex* untuk Identifikasi Katak

Primer	Urutan (5' → 3')	Panjang (pasang basa)	Start	Stop	T _m (°C)	GC (%)	Panjang produk (pasang basa)
F1	CTAACCCACACCGACTCAAC	20	620	639	60,04	60	137
R1	TCCGAGCAGATTGGGAGAGA	20	756	737	60,03	55	
F2	CCGATACCTCCCTCGCATTC	20	173	192	60,04	60	467
R2	GTTGAGTCCGGTGGGGTTAG	20	639	620	60,04	60	
F3	TACTTGGTGCCTAGCAGCC	20	707	726	60,04	55	97
R3	TGAGGGGGTGTAAGTAGGGG	20	803	784	59,96	60	
F4	ATCTAACCCACACCGACTCA	20	618	637	59,96	55	142
R4	GTCTCCGAGCAGATTGGGAG	20	759	740	59,90	60	
F5	CGTCCAATGGATCTGAGGGG	20	483	502	59,89	60	153
R5	AGTCCGGTGGGGTTAGATGA	20	635	616	59,96	55	
F6	TCATCTAACCCACACCGACT	20	616	635	59,96	55	316
R6	AGGTGTGGGTGAGGGGTATT	20	931	912	60,18	55	
F7	CCCCTAGTTACACCCCTCA	20	784	803	59,96	60	158
R7	CGAAGTTTGGAGGTGTGGGT	20	941	922	60,18	55	
F8	CCCAACCCCTCCAACATTT	20	66	85	60,18	55	437
R8	CCCCTCAGATCCATTGGACG	20	502	483	59,89	60	
F9	AACCCCTCCAACATTTCCG	20	69	88	60,25	55	124
R9	GAATGCGAGGGAGGTATCGG	20	192	173	60,04	60	
F10	GTCATCTAACCCACACCGAC	20	615	634	59,82	60	149
R10	CTGGGTCTCCGAGCAGATTG	20	763	744	60,18	60	

Dari urutan pada Gambar 1, berhasil didesain sepuluh kandidat primer yang akan digunakan sebagai primer *pentaplex PCR* yang disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa semua pasangan primer memiliki nilai T_m yang berdekatan dengan selisih <1 °C dan memiliki konten GC (dalam %) yang hampir sama yakni 55 dan 60%. Nilai T_m pasangan

primer merupakan dasar penentuan suhu penempelan primer saat proses amplifikasi dengan PCR (*annealing*) sehingga nilai T_m yang berdekatan antara primer *forward* dan *reverse* dapat menjaga konsistensi kinerja amplifikasi (Burpo, 2001). Karena sepuluh kandidat pasangan primer memiliki nilai T_m dan %GC yang mirip, maka pemilihan primer sebagai primer *pentaplex* didasarkan pada lokasi amplifikasi dari gen sitokrom b yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Lokasi Amplifikasi Primer 1 (hijau), 2 (oranye), 4 (kuning), 7 (merah), dan 10 (ungu) pada Gen Sitokrom b *Rana Temporaria*

Lokasi amplifikasi dari pasangan primer 1, 4, dan 10 berada pada daerah yang beririsan dengan perbedaan ukuran amplifikasi. Hal ini diperkirakan dapat memperkuat sinyal pita DNA hasil amplifikasi dengan PCR jika sampel mengandung daging katak. Dengan demikian hal ini dapat meningkatkan sensitivitas analisis atau dengan kata lain menurunkan nilai batas deteksi (*limit of detection* atau LoD). Dengan penurunan nilai LoD, maka kontaminasi daging katak dengan konsentrasi kecil dapat diatasi. Primer 2 dan 7 memberikan daerah amplifikasi diluar daerah amplifikasi dari 3 pasangan primer yang telah disebutkan sebelumnya. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan spesifisitas primer yakni mencakup banyak daerah dari gen target. Dengan demikian probabilitas dari kelima pasang primer untuk mengidentifikasi keberadaan daging katak dalam bahan pangan dapat ditingkatkan.

Dengan adanya 3 daerah amplifikasi dari kelima pasang primer maka diprediksi akan munculnya lebih dari satu pita DNA hasil amplifikasi. Hal ini tidak menjadi masalah jika digunakan teknik PCR konvensional dimana visualisasi hasil amplifikasi dilakukan menggunakan metode elektroforesis gel agarosa. Namun demikian untuk penggunaan teknik PCR yang lebih maju seperti *Real-Time PCR (RT-PCR)* maka spesifisitas primer terhadap hewan lain harus diuji terlebih dahulu. Penggunaan 5 primer dalam *pentaplex PCR* juga menimbulkan probabilitas penempelan primer bukan dengan pasangan yang seharusnya sehingga amplifikasi pita DNA menjadi lebih sulit diprediksi dan dapat menghasilkan banyak pita DNA. Namun demikian, identifikasi spesies dengan ada *multiple DNA band* bukanlah krusial dimana penggunaan primer mikrosatelit dalam identifikasi spesies katak yang menghasilkan banyak pita DNA pada berbagai daerah dalam satu gen telah berhasil dilakukan dengan menghasilkan pola amplifikasi yang berbeda antar spesies (Rowe dan Beebe, 2001).

4. Simpulan

Lima pasang primer telah berhasil didesain untuk pengembangan teknik *pentaplex PCR* dalam upaya pemenuhan jaminan produk halal, yakni pasangan primer nomor 1, 2, 4, 7, dan 10 berdasarkan gen sitokrom b dari *Rana temporaria*. Kedepannya, kelima pasang primer ini diujikan terhadap sampel isolat DNA daging katak untuk menentukan spesifisitas dan nilai batas deteksinya.

Daftar Rujukan

- Ali, M. E., Naquiah, A. N. N., Mustafaz, S. & Hamid, S. B. A. (2015). Differentiation of frog fats from vegetable and marine oils by fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis. *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 7, 18.
- Anonim. (2015). *State of the global islamic economy 2014-2015 report*, Dubai: Thomson Reuters.
- Jariyah, Yulistiani, R., Afdilah, S.W. & Mas'udah, K. W. (2021). Detection of pork gelatin in jelly candy using fourier transform infrared (FTIR) and polymerase chain reaction (PCR). *E3S Web of Conference*, 328, 1-8.
- Kim, M. J. & Kim, H. Y. (2017). Species identification of commercial jerky products in food and feed using direct pentaplex PCR assay. *Food Control.*, 78, 1-6.
- Montowska, M. & Pospiech, E. (2011). Authenticity determination of meat and meat products on the protein and DNA basis. *Food Rev. Int.*, 27, 84-100.
- Montowska, M., Rao, W., Alexander, M. R., Tucker, G. A. & Barrett, D. A. (2014). Tryptic digestion coupled with ambient desorption electrospray ionization and liquid extraction surface analysis mass spectrometry enabling identification of skeletal muscle proteins in mixtures and distinguishing between beef, pork, horse, chicken, and turkey meat. *Anal. Chem.*, 6, 4479-4487.
- Nan, P., Wen, D., Opriessnig, T., Zhang, Q., Yu, X. & Jiang, Y. (2021). Novel universal primer-pentaplex PCR assay based on chimeric primers for simultaneous detection of five common viruses associated with diarrhea. *Mol. Cell. Probes.*, 58, 1-12.
- Rohman, A., Pebriyanti, N. W., Sismindari, Windarsih, A., Ramadhani, D., Larasati, R. & Yulisa, H. (2021). Real-time polymerase chain reaction for identification of dog meat in adulterated beef meatball using specific primer targeting on cytochrome-b for halal authentication. *Int. J. Food Prop.*, 23, 2231-2241.
- Thanakiatkrai, P. & Kitpipit, T. (2017). Meat species identification by two direct- triplex real-time PCR assays using low resolution melting. *Food Chem.*, 23, 144-150.
- Thanakiatkrai, P., Dechnakarin, J., Ngasaman, R. & Kitpipit, T. (2019). Direct pentaplex pcr assay: an adjunct panel for meat species identification in asian food products. *Food Chem.*, 271, 767-772.