

Laporan Penelitian Individual

**DESAIN PRIMER SITOKROM B (*cyt b*)
SEBAGAI SALAH SATU KOMPONEN PCR (*polymerase chain
reaction*)UNTUK DETEKSI DNA BABI**



Oleh :
Esti W.Widowati, M.Si, *M,Biotech*

**LEMBAGA PENELITIAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA
2013**

PRAKATA

Alhamdulillahirrabil'alamin, puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang selalu melimpahkan rahmat dan karuniaNya sehingga laporan dengan judul Desain Primer Sitokrom b (cyt b) sebagai salah satu komponen PCR untuk Deteksi DNA Babi ini dapat diselesaikan. Laporan ini disusun sebagai hasil penelitian yang dilakukan selama kurang lebih dua bulan.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia, Laboratorium Terpadu UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta. Penulis memperoleh masukan, saran, dan bantuan dari berbagai pihak selama pelaksanaan penelitian ini. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada:

1. Rektor UIN Sunan Kalijaga yang telah memberikan kesempatan untuk dilaksanakannya penelitian ini.
2. Ketua beserta Staf pada Lembaga Penelitian UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta, yang telah memberikan petunjuk teknis, bantuan, saran dan memfasilitasi pelaksanaan penelitian ini.
3. Ketua, Pengelola dan Staf Laboratorium Terpadu UIN Sunan Kalijaga atas segala fasilitas laboratorium yang disediakan.
4. Dekan Fakultas Saintek, Tim Reviewer Fakultas Saintek dan keluarga besar Program Studi Kimia UIN Sunan Kalijaga yang telah memberikan kesempatan serta dukungan dalam pelaksanaan penelitian ini
5. Semua pihak yang dengan ikhlas telah memberikan bantuan dan semangat kepada penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.

Akhir kata, semoga segala bentuk dukungan dan bantuan semua pihak yang telah diberikan kepada penulis dapat menjadi amal baik dan mendapatkan imbalan dari Allah SWT. Harapan penulis, semoga karya kecil ini bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Yogyakarta, Desember 2013

Esti W. Widowati

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	iv
DAFTAR GAMBAR	v
INTISARI.....	vi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan dan Kegunaan Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI.....	5
A. Tinjauan Pustaka	5
B. Landasan Teori	8
a. PCR (Polymerase Chain reaction)	5
b. Desain Primer	24
c. Babi Lokal (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	28
d. Sel dan Bagian-Bagiannya.....	32
e. Sel Hewan dan Bagian-bagiannya	36
f. Organel Mitokondria	37
g. DNA Mitokondria.....	44
h. Gen Sitokrom B	49
BAB III. METODE PENELITIAN	60
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	50
B. Jenis Penelitian	50
C. Tahapan Penelitian.....	50
1. Penelusuran gen sitokrom b	50
2. Pemilihan software	50
3. Penyiapan sekuen gen sitokrom b dari <i>database</i>	50
4. <i>Alignment</i> gen sitokrom b dan pemilihan kandidat primer ..	50
5. Penentuan sifat-sifat primer	51
6. Uji in silico	51
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	52
A. Penelusuran data gen sitokrom c.....	52
B. Kandidat Primer	56
C. Pengujian kandidat primer	57

BAB V. PENUTUP	58
A. Kesimpulan.....	58
B. Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	59

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Pangan merupakan salah satu kebutuhan pokok manusia untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya. Seiring dengan perkembangan pengetahuan dan teknologi, jenis pangan yang dikenal oleh manusia juga semakin beragam. Diversifikasi produk pangan telah memungkinkan pemanfaatan berbagai bahan pangan mentah untuk diolah menjadi produk pangan yang menarik dan menggugah selera. Hal yang sangat menggembirakan ini tentunya juga semakin menuntut kita, sebagai muslim, untuk lebih selektif dan berhati-hati dalam memilih produk olahan pangan. Rasulullah telah memberikan tuntunan supaya kita memilih makanan yang *halal* dan *toyyib*, yang artinya selain memenuhi syariat Islam juga memenuhi kriteria pangan yang bermanfaat bagi tubuh.

Salah satu permasalahan yang dihadapi oleh konsumen muslim adalah kemungkinan adanya kontaminasi daging babi dalam produk pangan olahan, baik disengaja maupun tidak. Deteksi adanya kontaminan ini menjadi hal yang penting untuk menjamin keamanan dan kehalalan pangan. Cara analisis kimiawi yang selama ini dilakukan telah terbukti memiliki akurasi dan presisi tinggi, namun memiliki kekurangan karena dibutuhkan jumlah sampel yang cukup banyak. Widyaninggar *et al.* (2012), menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC) untuk membedakan komposisi asam amino dalam

gelatin sapi dan babi, tetapi analisis khemometri yang dilakukan tidak berhasil menunjukkan perbedaaan signifikan antara kedua gelatin tersebut karena diperoleh dari organ yang berbeda.

Metode deteksi lain yang cukup menjanjikan dan mulai dikembangkan di era bioteknologi saat ini adalah deteksi molekuler dengan menggunakan *polymerase chain reaction*(PCR). Kelebihan deteksi secara molekuler ini selain terletak pada kecepatan deteksi, akurasi, juga spesifitasnya. Penggunaan PCR sebagai metode deteksi yang cepat dan akurat pun telah berkembang pesat, sehingga memungkinkan pengembangan metode yang lebih spesifik. Erwanto *et al.* (2012) menggunakan RFLP-PCR untuk melakukan deteksi kehalalan pada bakso, sedangkan Almira Primasari (2011) memanfaatkan multiplex-PCR untuk mendeteksi kontamian tikus dalam produk daging.

Salah satu kunci keberhasilan deteksi dengan PCR adalah pemilihan primer yang akan digunakan. Primer spesifik akan menempel pada region spesifik pada DNA template yang merupakan target, untuk selanjutnya akan diamplifikasi menjadi untai DNA baru. Desain primer yang tepat sangat diperlukan untuk menghasilkan primer spesifik yang sesuai dengan target amplifikasi. Untuk deteksi DNA babi, salah satu gen yang dapat digunakan sebagai marka (penanda) spesifik adalah gen sitokrom b (*cyt b*). Gen ini dipilih untuk identifikasi species vertebrata karena menunjukkan variasi yang sangat terbatas dalam satu species tetapi variasinya sangat besar antara satu species dengan species lainnya. Sitokrom b merupakan satu dari 37 gen dalam genom sirkuler mitokondria. Sekuen gen *cyt b* memiliki keunikan, yaitu adanya bagian

yang *conserved* di tingkat species, sehingga dapat digunakan untuk deteksi spesifik pada species tertentu.

Dengan di-desain-nya primer sitokrom b ini, diharapkan akan mendukung pengembangan metode deteksi DNA babi pada bahan pangan olahan yang telah dilakukan inisiasinya oleh Halal Research Center UIN Sunan Kalijaga melalui berbagai penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah dikemukakan di atas, maka dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini, yaitu:

1. Bagaimanakah desain primer sitokrom b (*cyt b*) yang dapat digunakan untuk deteksi DNA babi?
2. Bagaimanakah sifat-sifat primer hasil desain tersebut?

C. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mendesain primer sitokrom b (*cyt b*) yang dapat digunakan untuk deteksi DNA babi.
2. Mengetahui sifat-sifat primer hasil desain tersebut.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat antara lain :

1. Manfaat teoritis
 - a. Memberikan sumbangsih di keilmuan biokimia.
 - b. Memberikan referensi terhadap peneliti selanjutnya.
2. Manfaat praktis

Memberi rekomendasi kepada Pimpinan Fakultas dan Halal Research Center dalam pengembangan metode deteksi kontaminan daging babi pada produk pangan olahan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI

A. TINJAUAN PUSTAKA

Penelitian sejenis yang dilakukan untuk deteksi kontaminan pada produk pangan olahan telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Erwanto *et al.* (2012) telah mengembangkan *metode restriction fragment length polymorfism – polymerase chain reaction* (RFLP-PCR) untuk melakukan deteksi kehalalan pada bakso. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa metode PCR ini cukup efektif untuk mendeteksi adanya kontaminan babi dalam bakso. Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan penelitian ini adalah pemilihan primer yang tepat untuk RFLP-PCR, baik *forward*-primer maupun *reverse*-primer.

Almira Primasari (2011) telah memanfaatkan *multiplex-PCR* untuk mendeteksi kontaminan tikus dalam produk daging di pasaran. Penelitiannya diawali dengan mendesain primer yang akan digunakan pada proses *multiplex – PCR* dan disimpulkan bahwa primer tersebut efektif untuk digunakan dalam deteksi adanya daging tikus dalam campuran produk daging yang digunakan sebagai sampel.

B. LANDASAN TEORI

1. PCR (Polimerase Chain Reaction)

PCR (*polimerase chain reaction*) salah satu teknik untuk mempelajari biologi molekuler, merupakan metode enzimatik yang digunakan untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan cara *in vitro*. Metode

ini sangat sensitif, sehingga dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA.

Konsep asli teknologi PCR mensyaratkan bahwa bagian tertentu sekuen DNA yang akan dilipatgandakan harus diketahui terlebih dahulu sebelum proses pelipatgandaan tersebut dapat dilakukan. Sekuen yang diketahui tersebut penting untuk menyediakan primer, yaitu sekuen oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA dalam reaksi berantai polimerase. Pengembangan lebih lanjut metode PCR memungkinkan dilakukannya pelipatgandaan suatu fragmen DNA yang belum diketahui sekuennya, misalnya dengan metode Alu-PCR (Rosenthal, 1992). Alu adalah suatu sekuen DNA (panjangnya kurang lebih 300 bp) yang banyak terdapat sepanjang genom manusia (*repetitive DNA sequence*). Alu-PCR adalah metode PCR yang memanfaatkan sekuen-sekuen Alu sebagai dasar untuk membuat primer untuk melipatgandakan suatu fragmen DNA yang belum diketahui sekuen yang terdapat di antara dua sekuen Alu.

Target PCR yaitu asam nukleat (DNA) untai ganda yang diekstraksi dari sel dan terdenaturasi menjadi asam nukleat beruntai tunggal. Komponen reaksi PCR terdiri atas pasangan primer berupa oligonukleotida spesifik untuk target gen yang dipilih, enzim (umumnya Taq polymerase, enzim *thermostable* dan *thermoactive* yang berasal dari *Thermus aquaticus*) dan *triphosphat deoxynucleoside* (dNTP) digunakan untuk amplifikasi target gen secara eksponensial dengan hasil replikasi ganda dari target awal. Reaksi ini dilakukan dalam suatu mesin pemanas yang diprogram secara otomatis disebut *thermocycler*. Mesin tersebut

menyediakan kondisi termal yang diperlukan untuk proses amplifikasi (Nollet & Toldrá 2011).

Proses yang terjadi dalam mesin PCR meliputi tiga tahap utama yaitu denaturasi (pemisahan untai ganda DNA), annealing (penempelan primer) dan ekstensi (pemanjangan primer). Proses yang dimulai dari denaturasi, penempelan dan ekstensi disebut sebagai satu siklus. Produk PCR dapat langsung divisualisasikan melalui proses elektroforesis dan digunakan untuk analisis lebih lanjut (Weissensteiner *et al.*, 2004). Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel yang diwarnai dengan bromida dan divisualisasikan dengan sinar ultraviolet (Nollet & Toldrá, 2011).

a. Sejarah Penemuan Teknik PCR

Teknik PCR mulai berkembang setelah ditemukannya enzim DNA polimerase, yang dapat mereplikasi DNA. Teknik ini awalnya dikembangkan dengan menggunakan fragmen Klenow DNA polimerase I yang berasal dari *Escherichia coli*. Fragmen klenow merupakan DNA polimerase yang telah dihilangkan aktifitas eksonuklease-nya. Enzim ini ternyata memiliki beberapa kelemahan antara lain tidak tahan panas, laju polimerisasinya sedang, dan prosesivitasnya rendah. Rendahnya prosesivitas ini menunjukkan rendahnya kemampuan enzim polimerase tersebut untuk menggabungkan nukleotida dengan suatu primer secara terus-menerus tanpa mengalami disosiasi dari kompleks primer-DNA *template*.

Metode PCR pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis, seorang peneliti di perusahaan *CETUS Corporation*. Pada awal

perkembangannya metode PCR hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, namun kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitasi molekul mRNA. Saat ini metode PCR telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik.

Metode PCR tersebut sangat sensitif, sehingga dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA. Metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen genom. Dengan menggunakan metode PCR, dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^9 mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit (Mullis dan Fallona, 1989). Hal ini menunjukkan bahwa pelipatgandaan suatu fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat. Kelebihan lain metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, misalnya DNA cetakan (*template*) yang diperlukan hanya sekitar 5 μ g, oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini bisa dilakukan dalam volume 50 – 100 μ L.

b. Prinsip Dasar PCR

Proses PCR melibatkan 4 komponen utama, yaitu (1) DNA template, yaitu fragmen DNA yang akan digandakan, (2) oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang mengawali sintesis rantai DNA, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP)m terdiri dari

dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4) enzim DNA polimerase, yang merupakan katalis reaksi sintesis rantai DNA.

Proses PCR terdiri dari tiga tahap, yakni denaturasi, penempelan (*annealing*), dan amplifikasi. Pada tahap denaturasi, suatu fragmen DNA (*double strand*) dipanaskan pada suhu 95 0C selama 1-2 menit sehingga akan terpisah menjadi rantai tunggal (*singlestrand*). Kemudian dilakukan penempelan (*annealing*) pada suhu 55 0C selama 1-2 menit, yakni oligonukleotida primer menempel pada DNA cetakan yang komplementer dengan sekuen primer. Setelah dilakukan penempelan, suhu dinaikkan menjadi 72 0C selama 1,5 menit. Pada suhu ini, enzim DNA polimerase akan melakukan proses polimerasi, yakni rantai DNA yang baru akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan. Proses ini disebut amplifikasi (Yuwono, 2006).

c. Faktor yang Menentukan Keberhasilan PCR

Keberhasilan PCR ditentukan oleh beberapa faktor, antara lain:(1) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP). Larutan stok dNTP yang akan digunakan dalam PCR sebaiknya dinetralkan menjadi pH 7,0. Untuk menentukan konsentrasinya, dapat digunakan spektrofotometer. Larutan stock tersebut perlu dituang dalam volume kecil (aliquot) dengan konsentrasi 1mM dan disimpan pada suhu -20oC. Konsentrasi masing-masing dNTP yang diperlukan dalam PCR berkisar antara 20-200µM dan keempat dNTP yang digunakan sebaiknya

(2) oligonukleotida primer, (3) DNA template, dan (4) komposisi larutan buffer, (5) jumlah siklus reaksi, (6) enzim yang digunakan, dan (7) faktor teknis dan faktor non teknis lainnya, misalnya kontaminasi.

d. Penggolongan Metode PCR

Berdasarkan pasangan primer yang digunakan dalam teknik PCR, maka ada dua macam teknik PCR yaitu (1) metode yang menggunakan sepasang primer (primer yang ditempatkan di awal dan di akhir unit transkripsi) dimana primer-primer tersebut sangat spesifik urutannya untuk menyambungkan dirinya dengan segmen DNA; dan (2) metode yang menggunakan primer tunggal (primer yang ditempatkan di awal unit transkripsi atau di akhir unit transkripsi) (Triwibowo, 2006).

Metode PCR dengan primer tunggal, meliputi : AP-PCR (*Arbitrary Primed PCR*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), serta DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) yang meliputi proses amplifikasi dari DNA/VNTRs dan Retroposon. Persamaan dari ketiga teknik ini adalah adanya urutan acak dari primer, baik yang bekerja ke arah kanan maupun ke arah kiri dari sejumlah lokus. Perbedaan dari ketiga teknik tersebut terdapat pada panjang-pendeknya primer, dimana untuk AP-PCR sekitar 20 basa nukleotida, RAPD sekitar 10 basa nukleotida dan DAF sekitar 6-8 nukleotida. Hasil visualisasi dari AP-PCR dan RAPD relatif sama, sehingga orang lebih menyukai RAPD karena dengan ukuran primer yang lebih sedikit (~10 basa nukleotida) memberikan hasil yang tidak berbeda dengan AP-PCR yang memiliki ukuran primer lebih besar (~20 basa nukleotida).

Metode PCR dengan menggunakan sepasang primer, meliputi : STSs (*Sequence-Tagged Sites*) dan SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*), DALP (*Direct Amplification of Length Polymorphism*), SSRs (*Simple Sequence Repeats*), IFLP (*Intron Fragment Length Polymorphism*), ESTs (*Expressed Sequence Tags*), RAMP (*Random Amplified Microsatellite Polymorphism*) dan REMAP (*Retroposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) dan modifikasinya, SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*).

e. Perkembangan Teknik PCR

Sejak pertama kali diperkenalkan, teknik PCR telah berkembang sangat pesat dan diaplikasikan untuk bermacam-macam tujuan, baik untuk riset dasar maupun aplikasi praktis. Pada aspek metodologinya, teknik PCR yang pertama kali diperkenalkan memerlukan banyak kondisi khusus untuk menjamin keberhasilannya. Sebagai contoh, pada awalnya teknik PCR hanya digunakan untuk mengamplifikasi molekul DNA dengan menggunakan DNA sebagai bahan awal (*starting material*) yang akan digunakan sebagai cetakan. Dalam hal ini molekul DNA yang akan diamplifikasi harus diisolasi terlebih dahulu dari sel atau jaringan.

Perkembangan lebih lanjut teknik ini memungkinkan para peneliti menggunakan molekul RNA sebagai bahan awal, yaitu dengan berkembangnya teknik *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR). Selain itu, sekarang juga dikembangkan teknik PCR yang tidak memerlukan langkah isolasi molekul DNA terlebih dahulu sebelum diamplifikasi. Dalam hal ini PCR dapat

dilakukan dengan menggunakan sel atau jaringan sebagai bahan awal tanpa harus melakukan isolasi DNA secara khusus. Dengan teknik ini, PCR dapat dilakukan di dalam sel atau jaringan tersebut sehingga teknik ini dikenal sebagai PCR *In Situ*. Selain itu, teknik PCR sekarang juga dapat dilakukan secara efisien untuk amplifikasi molekul DNA yang panjang. Secara ringkas kedua macam teknik ini dijelaskan sebagai berikut:

(1). Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Teknik ini dikembangkan untuk melakukan analisis terhadap molekul RNA hasil transkripsi yang terdapat dalam jumlah sangat sedikit di dalam sel. Sebelum teknik ini dikembangkan, analisis terhadap molekul mRNA biasanya dilakukan dengan metode hibridisasi *In Situ*, *northern blot*, *dot blot*, atau *slot blot*, analisis menggunakan S1 nuklease, atau dengan metode pengujian proteksi RNase (*RNase protection assay*). Teknik RT-PCR dikembangkan untuk mengatasi kelemahan-kelemahan metode PCR yang lain.

RNA tidak dapat digunakan sebagai cetakan pada teknik PCR, oleh karena itu perlu dilakukan proses transkripsi balik (reverse transcription) terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul cDNA (*complementaryDNA*). Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Teknik RT-PCR ini sangat berguna untuk mendeteksi ekspresi gen, untuk amplifikasi RNA sebelum dilakukan cloning dan analisis, maupun untuk diagnosis agensia infeksiif maupun penyakit genetik.

Teknik RT-PCR memerlukan enzim transkriptase balik (DNA polymerase) yang bisa menggunakan molekul DNA (cDNA) sebagai cetakan untuk

menyintesis molekul cDNA yang komplementer dengan molekul RNA tersebut. Beberapa enzim yang bisa digunakan antara lain mesophilic viral *reverse transcriptase* (RTase) yang dikode oleh virus avian myoblastosis (AMV) maupun oleh virus moloney murine leukemia (M-MuLV), dan Tth DNA polymerase. RTase yang dikode oleh AMV maupun M-MuLV bersifat sangat prosesif dan mampu menyintesis cDNA sampai sepanjang 10 kb, sedangkan Tth DNA polymerase mampu menyintesis cDNA sampai sepanjang 1-2 kb.

Berbeda dengan Tth DNA polymerase, enzim RTase AMV dan M-MuLV mempunyai aktivitas RNase H yang akan menyebabkan terjadinya degradasi RNA dalam hybrid RNA-cDNA. Aktivitas semacam ini dapat merugikan jika berkompetisi dengan proses sintesis DNA selama proses produksi untai pertama cDNA. Enzim RTase yang berasal dari M-MuLV mempunyai aktivitas RNase H yang lebih rendah dibanding dengan yang berasal dari AMV.

Enzim M-MuLV mencapai aktivitas maksimum pada suhu 37° C, sedangkan enzim AMV pada suhu 42° C dan Tth DNA polymerase mencapai aktivitas maksimum pada suhu 60-70° C. Penggunaan enzim M-MuLV kurang menguntungkan jika RNA yang digunakan sebagai cetakan mempunyai struktur sekunder yang ekstensif. Di lain pihak, penggunaan Tth DNA polymerase kurang menguntungkan jika ditinjau dari kebutuhan enzim ini terhadap ion Mn karena ion Mn dapat mempengaruhi ketepatan (*fidelity*) sintesis DNA. Meskipun demikian, enzim Tth DNA polymerase mempunyai

keunggulan karena dapat digunakan untuk reaksi transkripsi balik sekaligus proses PCR dalam satu langkah reaksi.

Reaksi transkripsi balik dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa macam primer, yaitu: (1) Oligo(dT) sepanjang 12-18 nukleotida yang akan melekat pada ekor poli (A) pada ujung 3' mRNA mamalia. Primer semacam ini pada umumnya akan menghasilkan cDNA yang lengkap. (2) Heksanukleotida acak yang akan melekat pada cetakan mRNA yang komplementer pada bagian manapun. Primer semacam ini akan menghasilkan cDNA yang tidak lengkap (parsial). (3) Urutan nukleotida spesifik yang dapat digunakan secara selektif untuk menyalin mRNA tertentu.

(2). PCR *In Situ*

Analisis DNA atau RNA hasil transkripsi dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, misalnya hibridisasi DNA : RNA atau DNA : DNA, dengan sistem dot blot atau slot blot. Analisis dapat dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan isolasi DNA atau mRNA dari sel atau jaringan, atau dengan metode yang lebih maju yaitu dengan analisis langsung sel pada jaringan yang bersangkutan tanpa harus melakukan isolasi DNA atau mRNA terlebih dahulu. Teknik semacam ini dikenal sebagai *In Situ* Hybridisation (hibridisasi *In Situ*). Teknik ini memerlukan molekul RNA atau DNA target dalam jumlah paling tidak 20 kopi dalam satu sel agar dapat terdeteksi. Oleh karena itu, teknik hibridisasi *In Situ* paling sering digunakan untuk analisis mRNA karena jumlahnya per sel pada umumnya lebih banyak dibandingkan dengan DNA.

Jumlah genom virus laten yang menginfeksi suatu sel misalnya, seringkali hanya terdiri atas beberapa kopi. Demikian pula mutasi gen, translokasi kromosom dan perubahan patologis awal seringkali hanya melibatkan beberapa kopi sekuen nukleotida sehingga akan sukar dideteksi dengan teknik hibridisasi *In Situ*. Oleh karena itu, untuk analisis molekul DNA yang jumlah kopinya sangat sedikit di dalam sel, harus dilakukan amplifikasi terlebih dahulu secara *In Situ*. Teknik yang mengombinasikan amplifikasi PCR dengan hibridisasi *In Situ* dikenal sebagai teknik PCR *In Situ* (Komminoth dan Long, 1995)

Sebelum dilakukan PCR *In Situ*, sel atau sampel jaringan harus difiksasi dan dipermeabilisasi terlebih dahulu. Fiksasi dilakukan untuk mempertahankan DNA atau RNA dan morfologi sel atau jaringan. Biasanya yang digunakan untuk fiksasi adalah formalin dan paraformaldehid. Jaringan yang masih segar atau sel dengan membrane yang masih utuh merupakan sampel yang ideal. Meskipun demikian, sampel jaringan yang sudah difiksasi dengan formalin juga dapat digunakan untuk PCR *In Situ*. Sel yang masih utuh akan mengalami kerusakan nukleotida yang jauh lebih sedikit dan membrane sel yang ada akan menjadi pelindung terhadap produk amplifikasi.

Permeabilisasi dapat dilakukan dengan menggunakan enzim, misalnya proteinase K, tripsin atau pepsinogen, sehingga primer, enzim DNA polymerase dan nukleotida dapat masuk ke dalam inti sel (nucleus). Setelah permeabilisasi, enzim protease yang digunakan harus dinonaktifkan sebab sisa-

sisia enzim ini dapat menghasncurkan DNA polymerase yang digunakan dalam PCR.

Setelah dilakukan fiksasi dan permeabilisasi, kemudian dilakukan amplifikasi *In Situ* yaitu dengan menambahkan komponen-komponen yang diperlukan untuk PCR. Setelah dilakukan PCR, selanjutnya sel atau jaringan yang digunakan diambil lagi dan dilekatkan pada gelas obyek (*object glass*). Sebagian lisat sel dianalisis dengan elektroforesis gel. Produk PCR hasil amplifikasi *In Situ* yang ada di dalam sel kemudian dianalisis dengan metode hibridisasi *In Situ* atau dengan imunohistokimia. Secara umum teknik PCR *In Situ* dapat dibedakan menjadi dua, yaitu (1) PCR *In Situ* tidak langsung (*Indirect In Situ PCR*), dan (2) PCR *In Situ* langsung (*Direct In Situ PCR*). Pada teknik PCR *In Situ* tidak langsung, dilakukan amplifikasi *In Situ* dna hibridisasi *In Situ*, tetapi pelacak (*probe*) disiapkan tersendiri. Sebaliknya, pada teknik PCR *In Situ* langsung, dilakukan amplifikasi *In Situ* dengan menggunakan pelacak secara khusus. Teknik PCR *In Situ* langsung dianggap merupakan teknik yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik PCR *In Situ* tidak langsung untuk deteksi DNA atau RNA tanpa harus melakukan hibridisasi *In Situ*. Meskipun demikian, teknik PCR *In Situ* langsung memberikan hasil yang kurang meyakinkan, disbandingkan dengan teknik PCR *In Situ* tidak langsung, jika digunakan untuk sampel berupa potongan jaringan.

Dalam penerapan teknik PCR *In Situ* ini ada beberapa variabel penting yang harus diperhatikan, antara lain (1) tipe bahan awal yang digunakan (sel,

potongan jaringan, atau yang lain), (2) tipe dan jumlah kopi urutan nukleotida yang menjadi target (DNA genom, DNA virus, atau RNA), (3) metode amplifikasi cDNA yang digunakan (menggunakan primer tunggal atau lebih dari satu primer), (4) sistem deteksi (langsung atau tidak langsung), (5) penggunaan kontrol dalam eksperimen.

Teknik PCR *in situ* telah berkembang (Gu,1995) sehingga sekarang terdapat empat variasi, yaitu (1) PCR *in situ langsung*, (2) PCR *in situ tidak langsung*. (3) RT-PCR *in situ*, dan (4) 3SR (*self-sustained sequence replication reaction*). RT-PCR *in situ* adalah PCR *in situ* dengan menambahkan reaksi transkripsi balik (reverse transcription), sedangkan teknik 3SR adalah teknik amplifikasi mRNA *in vitro* dengan menggunakan tiga macam enzim, yaitu transkriptase balik AMV, T7 RNA polimerase, dan Rnase H yang berasal dari *Escherichia coli*. Dengan metode ini dapat dilakukan proses transkripsi balik dan reaksi transkripsi untuk menggandakan RNA melalui hibrid RNA/DNA dan cDNA. Metode ini dikembangkan oleh Ingenborg Zehbe dan kawan-kawan sebagai alternatif terhadap metode RT-PCR untuk deteksi RNA dengan jumlah kopi yang sangat kecil. Metode ini pada dasarnya tidak seperti metode PCR karena semua reaksi dilakukan pada suhu 42°C dan tidak memerlukan alat *thermocycler*.

f. Aplikasi Teknik PCR

Saat ini PCR sudah digunakan secara luas untuk berbagai macam kebutuhan, diantaranya:

(1) Isolasi Gen

DNA makhluk hidup memiliki ukuran yang sangat besar. DNA manusia saja panjangnya sekitar 3 miliar basa, dan di dalamnya mengandung ribuan gen. Sebagaimana kita tahu bahwa fungsi utama DNA adalah sebagai sandi genetik, yaitu sebagai panduan sel dalam memproduksi protein, DNA ditranskrip menghasilkan RNA, RNA kemudian diterjemahkan untuk menghasilkan rantai asam amino atau protein. Dari sekian panjang DNA genom, bagian yang menyandikan protein inilah yang disebut gen, sisanya tidak menyandikan protein atau disebut *junk DNA*, DNA ‘sampah’ yang fungsinya belum diketahui dengan baik.

Kembali ke pembahasan isolasi gen, para ahli seringkali membutuhkan gen tertentu untuk diisolasi. Sebagai contoh, dulu kita harus mengekstrak insulin langsung dari pankreas sapi atau babi, kemudian menjadikannya obat diabetes, proses yang rumit dan tentu saja mahal serta memiliki efek samping karena insulin dari sapi atau babi tidak benar-benar sama dengan insulin manusia. Berkat teknologi rekayasa genetik, kini mereka dapat mengisolasi gen penghasil insulin dari DNA genom manusia, lalu menyisipkannya ke sel bakteri (dalam hal ini *E. coli*) agar bakteri dapat memproduksi insulin juga. Hasilnya insulin yang sama persis dengan yang dihasilkan dalam tubuh manusia, dan sekarang insulin tinggal diekstrak dari bakteri, lebih cepat, mudah, dan tentunya lebih murah ketimbang cara konvensional yang harus ‘mengorbankan’ sapi atau babi. Untuk mengisolasi gen, diperlukan DNA pencari atau dikenal dengan nama *probe* yang memiliki urutan basa nukleotida

sama dengan gen yang kita inginkan. Probe ini bisa dibuat dengan teknik PCR menggunakan primer yang sesuai dengan gen tersebut.

(2) DNA Sequencing

Urutan basa suatu DNA dapat ditentukan dengan teknik DNA Sequencing, metode yang umum digunakan saat ini adalah metode Sanger (chain termination method) yang sudah dimodifikasi menggunakan dye-dideoxy terminator, dimana proses awalnya adalah reaksi PCR dengan pereaksi yang agak berbeda, yaitu hanya menggunakan satu primer (PCR biasa menggunakan 2 primer) dan adanya tambahan dideoxynucleotide yang dilabel fluorescent. Karena warna fluorescent untuk setiap basa berbeda, maka urutan basa suatu DNA yang tidak diketahui bisa ditentukan.

(3)Forensik

Identifikasi seseorang yang terlibat kejahatan (baik pelaku maupun korban), atau korban kecelakaan/bencana kadang sulit dilakukan. Jika identifikasi secara fisik sulit atau tidak mungkin lagi dilakukan, maka pengujian DNA adalah pilihan yang tepat. DNA dapat diambil dari bagian tubuh manapun, kemudian dilakukan analisa PCR untuk mengamplifikasi bagian-bagian tertentu DNA yang disebut fingerprints alias DNA sidik jari, yaitu bagian yang unik bagi setiap orang. Hasilnya dibandingkan dengan DNA sidik jari keluarganya yang memiliki pertalian darah, misalnya ibu atau bapak kandung. Jika memiliki kecocokan yang sangat tinggi maka bisa dipastikan identitas orang yang dimaksud. Konon banyak kalangan tertentu yang

memanfaatkan pengujian ini untuk menelusuri orang tua ‘sesungguhnya’ dari seorang anak jika sang orang tua merasa ragu.

(4)Diagnosa Influenza A (H1N1)

Penyakit Influenza A (H1N1) yang sebelumnya disebut flu babi sedang mewabah saat ini, bahkan satu fase lagi dari fase pandemi. Penyakit berbahaya seperti ini memerlukan diagnosa yang cepat dan akurat. PCR merupakan teknik yang sering digunakan. Teknologi saat ini memungkinkan diagnosa dalam hitungan jam dengan hasil akurat. Disebut akurat karena PCR mengamplifikasi daerah tertentu DNA yang merupakan ciri khas virus Influenza A (H1N1) yang tidak dimiliki oleh virus atau makhluk lainnya.

(5) Deteksi Infeksi Gonore

Gonore merupakan PMS yang paling sering dijumpai, kelainan ini disebabkan oleh *Neisseria gonorrhoeae* termasuk golongan diplokok berbentuk seperti ginjal dengan diameter 0.8 u bersifat tahan asam, secara morfologik terdiri dari empat tipe, yaitu tipe 1 dan 2 mempunyai pili yang bersifat virulen, serta tipe 3 dan 4 tidak mempunyai pili dan bersifat tidak virulen, pili akan melekat pada mukosa epitel dan menyebabkan terjadinya reaksi peradangan.

Gambaran klinis gonore pada wanita asimtomatis, pada umumnya wanita datang berobat jika sudah terjadi komplikasi. Sasaran primer Gonokok adalah endoservik. Diagnosis gonore ditegakkan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan klinis dan pemeriksaan laboratorium baik sediaan langsung maupun kultur dengan sediaan yang diambil dari servik, muara kelenjar bartolini, uretra.¹¹ Untuk mendapatkan spesimen tersebut dibutuhkan seorang

tenaga kesehatan dan juga posisi tertentu yang terkadang membuat penderita kurang nyaman, dengan SOLVS tidak dibutuhkan tenaga kesehatan untuk pengambilan spesimen dan penderita merasa lebih nyaman karena melakukan sendiri.

Pemeriksaan yang lebih sensitif untuk penegakkan diagnosis gonore adalah dengan metoda PCR, dimana pada metoda ini spesimen cukup diambil dari vagina dengan menggunakan metoda SOLVS, *Garrow et al.*, dalam penelitiannya terbukti metoda SOLVS mempunyai sensitivitas dan spesifitas yang tinggi untuk mendiagnosis adanya infeksi yang disebabkan *N.gonorrhoeae*, *Chlamydia* dan *T. vaginalis*. Spesimen pada kapas lidi dilakukan ekstraksi DNA, kemudian dilakukan amplifikasi DNA sebanyak 40 siklus lalu dilakukan analisa dengan elektroforesis gel agaros 2 %, gen target primer untuk Gonokok adalah *23S rRNA*, *nspA* dan *orf1*, pada proses PCR tersebut akan dihasilkan *Hind III* untuk *orf1* dan *HinfI* untuk *23s rRNA*, setelah semua proses amplifikasi selesai, kemudian dilakukan pewarnaan dengan etidium-bromida, hasil positif ditunjukkan dengan adanya pita fragmen DNA pada gel agaros.

Tiga sekuens dari *N.gonorrhoeae* yaitu *orf1* sebagai *frame*, *23S rRNA* sebagai gen sekuens dan *nspA* sebagai kode gen *outer membrane protein*. Gen pasangan primer *orf1* (Ngu1 dan Ngu2) merupakan gen yang khas untuk *N.gonorrhoeae* dan tidak didapatkan pada spesies *Neisseria* lainnya termasuk *N.meningitidis*, pasangan primer ini mempunyai spesifitas yang tinggi untuk *Nesseria Gonorrhoeae*, sementara pasangan primer gen *23S rRNA* (Ngu3 dan Ngu4) merupakan gen yang menunjukkan spesies *Nesseria*.

Berdasarkan referensi WHO untuk pemeriksaan PCR *N.gonorrhoeae* yang optimal jika menggunakan ketiga gen primer tersebut.

(6) Deteksi Infeksi Klamidia

Chlamydia merupakan mikroorganisme parasit obligat seluler yang erat hubungannya dengan kuman gram negatif dan merupakan penyebab infeksi genital non spesifik yang paling sering. Kuman ini dibagi dalam tiga spesies, yaitu: *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, dan *Chlamydia pneumoniae*. Dinding sel bagian luar mirip dengan kuman gram negatif, banyak lipid dan tidak mengandung peptidoglikan kuman yang khas. Pembentukan dinding sel dihambat oleh kuman penisilin, siklosporin dan zat-zat yang menghambat sintesa peptidoglikan. DNA dan RNA terdapat dalam partikel kecil dan besar.

PMS karena *Chlamydia trachomatis* pada wanita menyebabkan servisit, uretritis, salpingitis dan penyakit peradangan pada pelvis, infeksi ini dapat memberikan gejala, tetapi kurang lebih 70 % kelainan ini asimtomatik, dapat ditularkan pada pasangannya. Kurang lebih 50 % uretritis non gonokokus atau uretritis setelah infeksi gonokokus disebabkan klamidia.

Manifestasi klinik berupa disuria, keluarnya cairan yang tidak bernanah, sering buang air kecil, dapat juga menimbulkan konjungtivitis inklusi akibat inokulasi sendiri oleh cairan kelaminnya. Diagnosis ditegakkan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan klinis dan laboratorium dengan pembiakan atau pewarnaan iodine akan didapatkan badan inklusi yang berwarna coklat karena matriks menyerupai glikogen yang terdapat disekitar partikel-partikel atau

pemeriksaan mikroskop langsung dengan pengecatan giemsa akan terlihat bada elementer berwarna ungu.

Lokasi infeksi klamidia paling sering pada endoservik, disamping juga dapat menginfeksi uretra, nasofaring dan anus, sehingga untuk pemeriksaan diperlukan swab dari endoservik dalam jumlah banyak. Pemeriksaa PCR pada klamidia ditujukan untuk melihat *major outer membrane protein* (MOMP) dari *Chlamydia trachomatis*. Target gen yang mengkode MOMP *Chlamydiatrachomatis* adalah *omp1*. Dengan metoda PCR ini sampel yang diambil tidak harus dalam jumlah banyak dan tidak harus dari endoservik, pengambilan spesimen dengan metoda SOLVS mempunyai nilai sensitivitas tinggi dalam mendiagnosis klamidia dengan PCR.

(7) Deteksi Infeksi Trikomoniaisis Vaginal

Trichomonas vaginalis merupakan patogen tersering sebagai penyebab vaginitis, eksoservisititis dan uretritis pada wanita dan biasanya ditularkan melauai hubungan seksual, pada wanita kelainan ini sering asimtomatis, mengingat dampak yang ditimbulkan karena infeksi ini perlu diagnosis secara cepat dan tepat. Pada beberapa dapat juga timbul keluhan berupa adanya discar yang berwarna kehijauan dan berbusa disertai rasa gatal. Pada pemeriksaan servik didapatkan *strawberry cervix* merupakan gambaran khas untuk trikomoniasis. Diagnosis ditegakkan setelah ditemukan *T.vaginalis* pada sediaan langsung spesimen yang diambil dari forniks anterior atau posterior.

Target gen primer *T.vaginalis* dengan PCR gen beta-tubulin dan famili 650 bp merupakan DNA spesifik , adapun prosedur dan pembacaan hasil PCR

sama dengan prosedur pada PMS lainnya. Madico *et al.*, dalam penelitiannya dengan 350 sampel spesimen vagina dan dilakukan kultur untuk *T.vaginalis* ternyata hanya 23 yang positif dari 23 yang positif dilakukan pemeriksaan langsung sediaan basah hanya 12 yang positif, kemudian dilakukan pemeriksaan PCR didapatkan 22 spesimen positif terhadap *T. vaginalis*, hal ini menunjukkan PCR sensitif untuk kelainan ini.

2. DESAIN PRIMER

Tahapan PCR yang paling menentukan adalah penempelan primer. Sepasang primer oligonukleotida (primer maju dan primer mundur) yang akan dipolimerisasi masing-masing harus menempel pada sekuens target, tepatnya pada kedua ujung fragmen yang akan diamplifikasi. Untuk itu urutan basanya harus komplementer atau setidaknya-tidaknya memiliki homologi cukup tinggi dengan urutan basa kedua daerah ujung fragmen yang akan diamplifikasi itu. Padahal, kita belum mengetahui dengan pasti urutan basa sekuens target. Oleh karena itu, diperlukan cara tertentu untuk merancang urutan basa kedua primer yang akan digunakan.

Dasar yang digunakan adalah urutan basa yang diduga mempunyai kemiripan dengan urutan basa sekuens target. Urutan ini adalah urutan serupa dari sejumlah spesies/strain organisme lainnya yang telah diketahui/dipublikasikan. Sebagai contoh, untuk merancang sepasang primer yang diharapkan dapat mengamplifikasi sebagian gen lipase pada isolat *Bacillus* termofilik tertentu dapat digunakan informasi urutan basa gen

lipase dari strain-strain *Pseudomonas fluorescens*, *P. mendocina*, dan sebagainya, yang sebelumnya telah diketahui.

Urutan-urutan basa fragmen tertentu dari berbagai strain tersebut kemudian dijajarkan dan dicari satu daerah atau lebih yang memperlihatkan homologi tinggi antara satu strain dan lainnya. Daerah ini dinamakan daerah lestari (*conserved area*). Sebagian/seluruh urutan basa pada daerah lestari inilah yang akan menjadi urutan basa primer.

Sebenarnya, daerah lestari juga dapat ditentukan melalui penjajaran urutan asam amino pada tingkat protein. Urutan asam amino ini kemudian diturunkan ke urutan basa DNA. Dari satu urutan asam amino sangat mungkin akan diperoleh lebih dari satu urutan basa DNA karena setiap asam amino dapat disandi oleh lebih dari satu triplet kodon. Dengan demikian, urutan basa primer yang disusun dapat merupakan kombinasi beberapa kemungkinan. Primer dengan urutan basa semacam ini dinamakan primer *degenerate*. Selain itu, primer yang disusun melalui penjajaran urutan basa DNA pun dapat merupakan primer *degenerate* karena urutan basa pada daerah lestari di tingkat DNA pun tidak selamanya memperlihatkan homologi sempurna (100%).

Urutan basa pasangan primer yang telah disusun kemudian dianalisis menggunakan program komputer untuk mengetahui kemungkinan terjadinya primer-dimer akibat homologi sendiri (*self-homology*) atau homologi silang (*cross-homology*). Selain itu, juga perlu dilihat kemungkinan terjadinya salah tempel (*mispriming*), yaitu penempelan primer di luar sekuens target. Analisis juga dilakukan untuk mengetahui titik leleh (T_m) masing-

masing primer dan kandungan GC-nya. Sepasang primer yang baik harus mempunyai T_m yang relatif sama dengan kandungan GC yang cukup tinggi.

Desain primer yang baik sangat penting untuk keberhasilan reaksi PCR. Pertimbangan desain yang penting yang diuraikan di bawah ini sebagai kunci untuk amplifikasi spesifik dengan hasil tinggi. (1) Panjang Primer. Hal ini secara umum diterima bahwa panjang optimal primer PCR adalah 18-22 mer (basa). (2) *Primer Melting Temperature*. *Primer Melting Temperature* (T_m) merupakan temperatur yang diperlukan oleh separoh primer dupleks mengalami disosiasi/lepas ikatan. Primer dengan T_m berkisar antara 52-58°C sangat ideal, sedangkan T_m diatas 65°C akan mengurangi efektifitas anealing sehingga proses amplifikasi DNA kurang berjalan baik. T_m ini sangat ditentukan oleh jumlah basa GC (GC contains). T_m primer dapat dihitung dengan formula: $T_m (^{\circ}\text{C}) = ((\text{G}+\text{C}) \times 4) + ((\text{A}+\text{T}) \times 2)$secara kasar (kurang akurat) atau $T_m(\text{oC}) = \{ \Delta H / \Delta S + R \ln(C) \} - 273.15$secara akurat. (3) *Primer annealing temperatur*. Temperatur annealing (T_a) merupakan suhu yang diperkirakan primer dapat berikatan dengan template (DNA) dengan stabil (DNA-DNA hybrid stability). Jika suhu annealing tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer dengan DNA template sehingga akan menghasilkan produk PCR yang rendah (kurang efisien). Namun jika T_a terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA tempalt yang tidak spesifik. T_a dapat dihitung dengan menggunakan formula: $T_a = 0.3 \times T_m(\text{primer}) + 0.7 T_m (\text{product}) - 14.9$, dengan $T_m(\text{primer}) = T_m$ primer dan $T_m(\text{product}) = T_m$ produk PCR. (4) GC Content. Jumlah Basa G

dan C (GC content) di dalam primer yang ideal sekitar 40-60%. (5) GC Clamp. Jumlah basa G dan C yang terdapat pada 5 basa terakhir (3') disebut dengan GC clamp. GC clamp yang baik sekitar 3 basa G/C dan tidak melebihi 5 basa G/C. keberadaan G/C di ujung 3' primer sangat membantu terjadinya stabilitas iktan antara primer dengan DNA templat yang diperlukan untuk inisiasi polymerase DNA (proses PCR). (6) *Primer Secondary Structures*, yang meliputi: i) Hairpins : terbentuknya struktur loop/hairpin pada primer sebaiknya dihindari, namun sangat sulit untuk memperoleh primer tanpa memiliki struktur hairpin. Hairpin pada ujung 3' dengan ΔG (energy yang diperlukan untuk memecah struktur hairpin) = -2 kcal/mol dan hairpin internal dengan ΔG = -3 kcal/mol masih dapat ditoleransi.ii) *Self Dimer* : primer dapat berikatan dengan primer lainnya yang sejenis disebut dengan *self-dimer*. *Self-dimer* pada ujung 3' dengan ΔG = -5 kcal/mol dan *self-dimer* pada bagian internal dengan ΔG = -6 kcal/mol masih dapat ditoleransi. iii) *Cross Dimer*: Primer dapat berikatan dengan primer pasangannya (reverse dan forward) sehingga disebut *cross dimmers*. Secara optimal, *cross dimer* internal pada ujung 3' dengan ΔG = -5 kcal/mol dan self- dimer pada bagian internal dengan ΔG = -6 kcal/mol masih dapat ditoleransi. (7) *Repeats*. Primer sebaiknya tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa dan maksimum pengulangan 2 basa sebanyak 4 kali masih dapat di toleransi. Misalnya ATATATAT. (8) *Runs*. Primer sebaiknya tidak memiliki urutan basa yang di ulang terus menerus. Pengulangan basa berurutan sampai 4 kali masih dapat di toleransi. Misalnya AGCGGGGATGGGG memiliki urutan basa G diulang 5 kali berturut-turut.

(9) *Avoid Cross homology*. Untuk menghindari cross homologi dapat dilakukan dengan cara menganalisis homologi primer dengan DNA genome melalui BLAST-NCBI. (10) *Amplicon Length*. Panjang PCR produk yang ideal berkisar antara 100-500 pasang basa. (11) *Optimum Annealing temperature* (T_a Opt). Suhu annealing optimum sangat mempengaruhi hasil pcr. T_a Opt ini dapat dihitung dengan cara T_a Opt = $0.3 \times (T_m \text{ of primer}) + 0.7 \times (T_m \text{ of product}) - 25$. (12) *Primer Pair T_m Mismatch*. Perbedaan T_m sepasang primer sebaiknya tidak lebih dari 5°C .

3. BABI LOKAL (*Sus scrofa domestica*)

Babi termasuk dalam family *Suidae*. Nama hog sering digunakan dalam percakapan sehari-hari untuk merujuk babi domestik (*Sus domestica*), namun secara teknis mencakup sejumlah spesies yang berbeda, termasuk babi hutan. *Swine* adalah kata benda kolektif yang umum digunakan untuk menggambarkan babi sebagai grup. Bagaimanapun, *swine* sering digunakan untuk merendahkan secara tidak langsung suatu bentuk kehidupan dengan watak berupa babi. Dengan sekitar dua miliar di planet, babi domestik pasti juga merupakan species babi paling banyak. Babi bersifat omnivora, dan meskipun dikenal luas dalam hal kerakusannya, babi secara umum adalah hewan sosial dan cerdas.

Babi dapat dilatih untuk melakukan berbagai tugas dan trik sederhana. Seekor babi memiliki moncong hidung, mata kecil, dan buntut kecil yang mungkin berombak, kaku, atau lurus. Babi memiliki tubuh yang gempal, kaki

pendek, dan bulu yang kasar. Ada empat jari pada masing-masing kakinya, dengan dua jari tengah yang besar yang digunakan untuk berjalan.

Babi adalah binatang omnivora, yang artinya mereka mengkonsumsi tumbuhan dan hewan. Babi akan mengeruk-ngeruk dan telah dikenal memakan berbagai macam makanan, termasuk serangga mati, ulat, kulit kayu, bangkai yang membusuk, sampah, dan bahkan babi lain. Dalam keadaan liar, babi adalah hewan yang pergi ke sana kemari untuk mencari makanan, utamanya memakan daun, rumput, akar, buah, dan bunga. Kadang-kadang dalam kurungan babi mungkin memakan babi lain yang lebih muda jika stress. Satu tipe babi memiliki kepala besar dengan moncong yang panjang dan diperkuat dengan tulang prenasal tertentu dan dengan cakra *cartilage* di ujung. Moncong babi digunakan untuk menggali tanah untuk mendapatkan makanan dan merupakan organ yang sangat sensitif.

Babi memiliki 44 buah gigi. Gigi taring, yang disebut tusk, tumbuh secara berkesinambungan dan dipertajam oleh gesekan satu sama lain antara taring bawah dan atas. Babi yang dibiarkan pergi kesana-kemari mencari makanan mungkin diawasi oleh kumpulan babi (*swineherd*). Karena kemampuan mereka mencari makan dan indera penciuman yang mengagumkan, babi digunakan untuk menemukan *truffle* di banyak negara Eropa. Babi domestik umumnya dipelihara petani sebagai *livestock* untuk daging (disebut *pork*), dan juga untuk kulit. Buluya yang tegang juga digunakan untuk sikat. Beberapa jenis babi, seperti Asian *pot-bellied pig*, dipelihara sebagai hewan kesayangan (*pet*).

Perkembangbiakan babi terjadi sepanjang tahun di daerah tropis, tapi puncak kelahiran terjadi sekitar musim hujan. Babi betina bisa hamil pada umur sekitar 8-18 bulan. Dia akan mengalami *estrus* setiap 21 hari jika tidak dibiakkan. Babi jantan aktif secara seksual pada usia 8-10 bulan. Seperindukan babi antara 6 dan 12 anak babi (*piglet*). Setelah yang muda disapih, dua atau lebih keluarga mungkin datang bersamaan sampai musim kawin berikutnya. Babi tidak memiliki kelenjar keringat fungsional, jadi babi mendinginkan dirinya sendiri menggunakan air atau lumpur selama cuaca panas. Mereka juga menggunakan lumpur untuk melindungi kulit dari terbakar oleh sinar matahari. Lumpur juga memberikan perlindungan terhadap lalat dan parasit.

Babi telah dijadikan hewan domestik sejak zaman purbakala. Fakta-fakta arkeologi menunjukkan bahwa babi telah dikelola di hutan rimba dengan cara yang serupa dengan pengelolaan babi hutan oleh *New Guinean modern* sekitar 13.000–12.700 BP di *Near East* di lembah sungai Tigris. Sisa-sisa babi telah tercatat sejak permulaan 11.400 BP di Cyprus yang tentu telah diperkenalkan dari tanah daratan yang menunjukkan domestikasi. Domestikasi secara terpisah juga terjadi di China.

Babi dibawa ke bagian tenggara Amerika Utara dari Eropa oleh Hernando de Soto dan penjelajah Spanyol yang lebih awal lainnya. Babi khususnya berharga di Cina dan di pulau-pulau oceania tertentu, dimana kemampuannya untuk memenuhi kebutuhannya sendiri memungkinkan babi dibiarkan bebas berjalan, meskipun praktiknya bukanlah tanpa kekurangan.

Babi domestik (*Sus scrofa domesticus*) selalu diberi nama ilmiah *Sus scrofa*, walaupun sebagian penulis juga menyebutnya *S. domesticus*, dan yang lainnya *S. scrofa* untuk babi hutan. Domestikasi babi kira-kira 5.000 sampai 7.000 tahun lalu. Mantelnya kasar dan tegang. Babi dilahirkan berwarna kecoklatan dan cenderung menjadi abu-abu dengan bertambahnya umurnya. Taring bagian atas membentuk *sharp distinctive tusk* khusus yang tajam yang melengkung keluar dan ke atas. Dibandingkan dengan *artiodactyl*lain, kepala babi relatif panjang, tirus, dan bebas kutil. Panjang kepala dan badannya dalam rentang 900-1.800 mm dan beratnya 50-350 kg.

Dalam pemeliharaan babi, peternak tidak terlampau banyak campur tangan karena babi tidak perlu mandi dan kandang tidak perlu dicuci. Kandang dibersihkan hanya pada waktu membongkar kompos dan mengganti alas kandang. Setiap hari lantai kandang yang berupa tanah harus ditaburi rumput kering agar tidak becek, juga sering ditambah daun jagung kering, daun kubis, dan biomassa limbah pertanian lainnya, dalam jumlah yang tidak tentu tergantung waktu dan tenaga untuk merumput (rata-rata 5 kg /hari). Hal yang paling mendukung untuk terjadinya penyakit adalah kandang yang kotor, udara sekitar kandang lembab dan manajemen pemeliharaan yang tidak higienis. Untuk menjaga kebersihan kandang, kotoran babi harus ada penampungnya yang baik dan jauh dari kandang. Sistem pengairan dalam kandang harus baik dan dialirkan dalam bak penampungan yang jauh dari kandang.

Beberapa penyakit yang sering menyerang ternak babi antara lain : Brucellosis, Kholera, Penyakit Merah/Erisipelas, Anthrax, penyakit Ngorok,

Scabies/Kurap dan Castro Enteritis. Untuk mencegah penyakit dapat dilakukan vaksinasi secara teratur dan pemberian obat sesuai jenis penyakit yang menyerang.

4. SEL DAN BAGIAN-BAGIANNYA

Sel adalah unit terkecil dari makhluk hidup. Setiap Organisme di dunia ini tersusun atas sel-sel yang saling berintegrasi membentuk suatu fungsi tertentu dalam tubuh makhluk hidup. Baik organisme tingkat seluler (Uniseluler) maupun organisme Multiseluler. Sel pertama kali dikenalkan oleh Robert Hooke pada tahun 1665 yang mengamati jaringan gabus pada tumbuhan dengan menggunakan lensa pembesar. Gabus merupakan bangunan yang berlubang-lubang kecil seperti susunan sarang lebah yang dipisahkan oleh "diafragma". Bangunan seperti sarang lebah ini selanjutnya disebut dengan *Cell* (sel). Nama sel diambilnya dari bahasa Yunani "Kytos" yang berarti ruang kosong, sedangkan bahasa latin ruang kosong adalah "cella".

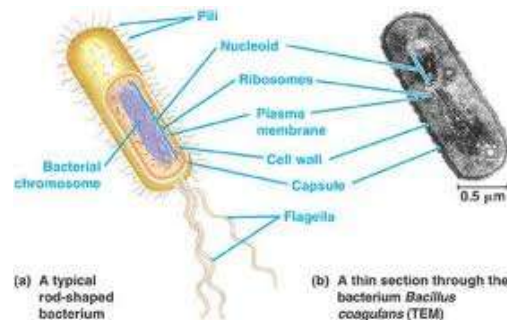
Perkembangan teori tentang sel dimulai pada tahun 1839 sampai akhir abad XIX. Berbagai teori tentang sel, antara lain dikemukakan oleh: (1) Schleiden dan T. Schwann, yang menyatakan bahwa sel merupakan unit struktural terkecil makhluk hidup. Teori ini menjelaskan bahwa setiap makhluk hidup disusun atas sel-sel. Sel adalah bagian terkecil makhluk hidup yang menyusun makhluk hidup. (2) Max Schultze, yang menegaskan bahwa sel sebagai unit fungsional terkecil makhluk hidup. Teori ini menjelaskan bahwa sel adalah bagian terkecil dari makhluk hidup yang melakukan fungsi kehidupan. Fungsi-fungsi kehidupan di dalam sel dapat ditunjukkan dengan

adanya metabolisme sel dan pengaturan sel oleh nukleus. (3) Rudolf Virchow, merumuskan sel sebagai unit pertumbuhan terkecil makhluk hidup. Sel sebagai penyusun terkecil makhluk hidup selain menjalankan suatu fungsi kehidupan juga mengalami pertumbuhan. sel dapat mengalami perpanjangan ukuran maupun perbesaran volume sel.

Sel sebagai unit hereditas terkecil makhluk hidup memiliki struktur yang dinamakan dengan nukleus (inti sel). Nukleus memiliki peranan sebagai pembawa materi genetik (tersimpan sebagai molekul DNA) yang memiliki sifat diwariskan ke generasi sel selanjutnya. Sel dapat digolongkan menjadi dua berdasarkan ada tidaknya membran nukleus (membran inti), yaitu sel prokariot, jenis sel yang tidak dilengkapi dengan membran inti contohnya bakteri dan ganggang alga biru (*Cyanophita*); dan sel eukariot, yaitu jenis sel yang memiliki membran inti contohnya sel hewan, tumbuhan, fungi.

a. Sel Prokaryot

Bakteri sebagai organisme prokariotik yang merupakan organisme uniseluler memiliki struktur sel yang tidak memiliki membran inti. Struktur sel secara umum yang dimiliki oleh sel prokariot dapat kita lihat pada sel bakteri sebagaimana disajikan pada gambar berikut ini:



Gambar 1 Struktur Sel Bakteri

Bagian-bagian sel bakteri meliputi: (1) Nukleoid atau inti sel, yang berfungsi sebagai pengendali dan pengatur sel. seluruh aktifitas sel diatur oleh nukleus. Nukleus juga berfungsi sebagai pembawa informasi genetik yaitu kromosom, yang diwariskan ke generasi selanjutnya. Kromosom adalah struktur yang tersusun oleh molekul DNA dan protein (histon). Nukleus sel bakteri terpapar atau kontak langsung dengan sitoplasma karena tidak memiliki membran inti. (2) Sitoplasma, yaitu bagian sel yang berisi cairan tempat berlangsungnya metabolisme sel. Kandungan terbesar dalam sitoplasma adalah air (80-90%).(3) Ribosom, merupakan struktur berupa butiran-butiran kecil yaang merupakan tempat sintesis protein. Protein disintesis atau dibuat dengan menggabungkan beberapa asam amino yang sesuai informasi genetik yang ada di molekul DNA. Ribosom berada di sitoplasma. (4) Membran Plasma, yaitu lapisan di luar sitoplasma yang tersusun atas. Fungsi membran plasma adalah sebagai pelindung dan mengatur transportasisel. Pengaturan transportasi sel dimaksudkan untuk mengatur keluar masuknya substansi ke dalam dan ke luar sel. Membran plasma juga berperan dalam penerima rangsang yang datang dari luar sel.Membran sel pada sel prokariot mengalami pelebaran ke arah dalam membentuk struktur yang disebut mesosom. Mesosom berfungsi sebagai tempat terjadinya respirasi sel sehingga dihasilkan energi yang akan digunakan untuk aktifitas di dalam sel. (5) Dinding sel, merupakan struktur pelindung kedua setelah membran plasma. (6) Kapsul, merupakan struktur pelindung sel ketiga setelah membran plasma dan dinding sel. (7) Pili (bulu

rambut), berfungsi sebagai alat pelekatan sel bakteri pada suatu permukaan substrat atau benda. (8) Flagella (Flagel), berfungsi dalam pergerakan sel. Baik flagel dan pili disusun oleh mikrotubulus.

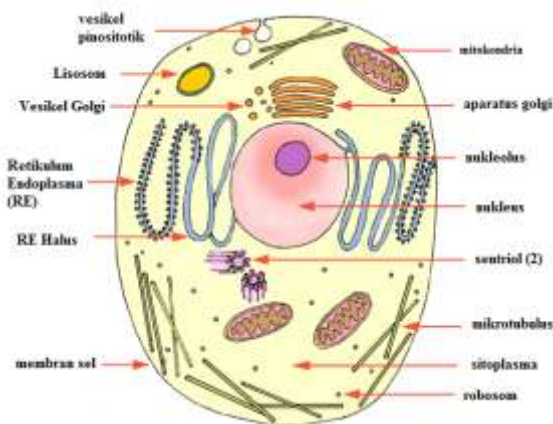
b. Sel Eukaryot

Sel Eukariot memiliki struktur yang lebih kompleks dibandingkan dengan sel prokariot. Sel eukariot memiliki membran inti yang memisahkan Nukleus dengan sitoplasma. Sel ini juga memiliki struktur endomembran yang disebut dengan Organel. Organel-organel sel eukariot memiliki fungsi-fungsi tertentu yang menunjang kehidupan sel eukariot. Macam organel yang dimiliki Sel eukariot antara lain : (1) *Lisosom*. Organel yang berperan dalam pencernaan sel. Organel ini mengandung enzimlisozim yang akan melisis bagain sel yang telah mati, rusak atau sudah tua. (2) *Mitokondria*. Organel yang berperan dalam respirasi sel. Respirasi sel bertujuan untuk menghasilkan energi yang akan digunakan dalam aktivitas sel. (3) *Aparatus Golgi*. Organel yang berperan dalam sekresi produk, baik protein,polisakarida maupun lemak. (4) *Retikulum Endoplasma (RE)*, organel yang berperan dalam sintesis produk. Ada dua jenis RE, yaitu RE kasar (RE yang di bagian permukaannya terdapat butiran ribosom) dan RE halus (RE yang tidak memiliki ribosom). RE kasar berfungsi untuk mensintesis protein, sedangkan RE halus berfungsi dalam sintesis lemak dan sterol. (4) *Plastida*. Organel yang mengandung pigmen (warna). (5) *Vakuola*, organel yang berfungsi dalam penyimpanan cadangan makanan, minyak atsiridan sisa metabolisme sel. (6) *Mikrotubulus*, organel yang memiliki struktur tabung. contohnya flagela (untuk

pergerakan sel), silia (alat pelekatan sel) dan spindle (untuk pembelahan sel). (7) *Mikrofilamen*, organel yang memiliki struktur filamen (benang). berfungsi dalam pergerakan sitoplasma dan kontraksi otot. (8) *Badan Mikro*, terdapat dua macam badan mikro, yaitu Peroksisom (mengandung enzimkatalase) dan glioksisom (mengandung enzim katalase dan oksidase). (9) *Dinding Sel*, merupakan struktur selulolitik dan kitin yang berfungsi memberi bentuk sel dan sebagai pelindung sel. (10) *Sentriol*, organel yang berperan dalam pembelahan sel. Sentriol berfungsi menarik kromosom ke arah kutub yang berlawanan. Sel Eukariot dibedakan atas sel hewan dan sel tumbuhan. Perbedaan yang mendasar antara kedua jenis sel tersebut adalah adanya beberapa bagian sel yang hanya dimiliki sel hewan (sentrosom dan lisosom) dan yang hanya dimiliki oleh sel tumbuhan (plastida dan dinding sel).

5. SEL HEWAN DAN BAGIAN-BAGIANNYA

Sel hewan memiliki bagian-bagian yang berbeda dengan sel tumbuhan, diantaranya:



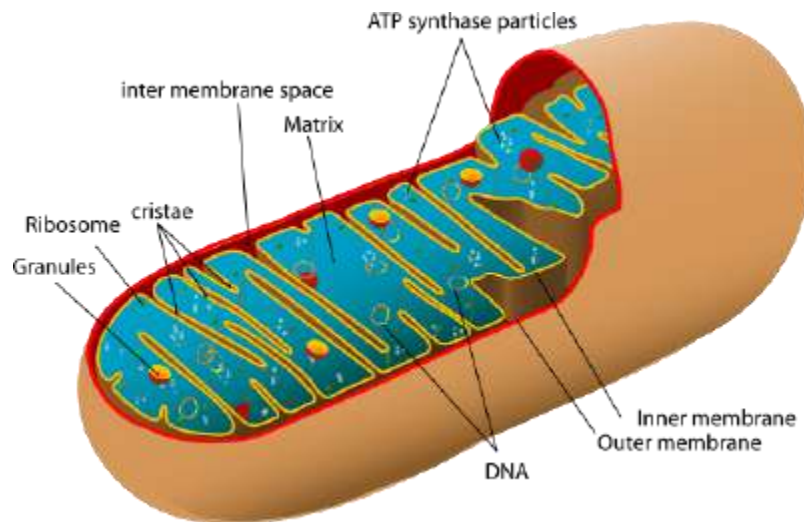
Gambar 2 Struktur Sel Hewan

6. ORGANEL MITOKONDRIA

Mitokondria adalah organel sel eukariot yang berfungsi sebagai organ respirasi pembangkit energi dengan menghasilkan adenosin triphosphat (ATP). Jumlah mitokondria tiap sel tergantung jenis sel dan organisme. Mitokondria ditemukan dalam jumlah banyak pada sel yang aktivitas metabolismenya tinggi yaitu sel-sel kontraktil seperti sperma pada bagian ekornya, sel otot jantung, dan sel yang aktif membelah seperti pitelium, akar rambut, dan epidermis kulit. Mitokondria diduga berasal dari bakteri serupa Rickettsia yang hidup bebas, kemudian ditelan nenek-moyang sel eukariot dan membentuk endosimbiosis satu setengah miliar tahun lalu. Sel inang menyediakan nutrisi kaya energi bagi mitokondria sedangkan mitokondria mengubah nutrisi menjadi energi menggunakan oksigen. Ketika komposisi atmosfer purba bergeser dari kaya hidrogen menjadi kaya oksigen lewat fotosintesis, sistem simbiosis ini menjadi paling efektif. Mitokondria memiliki perangkat genetik sendiri yang disebut DNA mitokondria (mtDNA), terletak pada matriks semi cair di bagian paling dalam mitokondria. Satu mitokondria dapat mengandung puluhan mtDNA. Sistem genetik mitokondria mirip dengan bakteri, berupa molekul sirkuler yang tahan eksonuklease.

Mitokondria terdapat pada sel tumbuhan dan hewan, merupakan struktur berbentuk batang yang tertutup dalam dua membran - membran luar dan membran dalam. Membran terdiri dari fosfolipid dan protein. Ruang di antara dua membran disebut ruang antar-membran yang memiliki komposisi yang sama seperti sitoplasma sel. Namun, kandungan protein dalam ruang ini

berbeda dari yang di sitoplasma. Struktur berbagai komponen mitokondria disajikan pada gambar 3 berikut ini:



Gambar 3 Komponen dalam mitokondria

Membran luar memiliki struktur halus seperti membran dalam dengan jumlah fosfolipid yang hampir sama sebagai protein. Membran ini memiliki sejumlah besar protein khusus yang disebut porins, sehingga memungkinkan molekul dalam berat 5000 dalton atau kurang untuk melewatinya. Membran luar bersifat permeabel terhadap molekul nutrisi, ion, dan molekul ATP ADP.

Membran dalam memiliki struktur yang lebih kompleks jika dibandingkan dengan membran luar, karena mengandung kompleks rantai transpor elektron dan kompleks sintetase ATP. Membran ini hanya permeabel untuk oksigen, karbon dioksida dan air. Strukturnya terdiri dari sejumlah besar protein yang memainkan peran penting dalam memproduksi ATP, dan juga membantu dalam mengatur transfer metabolit melintasi membran. Membran dalam memiliki infoldings disebut krista yang meningkatkan luas permukaan

untuk kompleks dan protein yang membantu dalam produksi ATP, molekul yang kaya energi.

Bagian lain dari mitokondria adalah matriks, yaitu campuran kompleks enzim yang penting untuk sintesis molekul ATP, ribosom mitokondria khusus, tRNA dan DNA mitokondria. Selain itu, matriks juga memiliki oksigen, karbon dioksida dan intermediet daur ulang lainnya. Meskipun sebagian besar materi genetik sel terkandung dalam inti, mitokondria memiliki DNA sendiri. Mereka memiliki mesin sendiri untuk sintesis protein dan berkembang biak dengan proses fisi seperti yang dilakukan bakteri. Karena kemerdekaan mereka dari DNA nuklir dan kesamaan dengan bakteri, diyakini bahwa mitokondria berasal dari bakteri dengan endosimbiosis.

Fungsi mitokondria bervariasi sesuai dengan jenis sel di mana mereka berada. Fungsi yang paling penting dari mitokondria adalah untuk menghasilkan energi. Makanan yang kita makan dipecah menjadi molekul sederhana seperti karbohidrat, lemak, dll, dalam tubuh kita. Ini dikirim ke mitokondria di mana mereka akan diproses lebih lanjut untuk menghasilkan molekul bermuatan yang bergabung dengan oksigen dan menghasilkan molekul ATP. Seluruh proses ini dikenal sebagai fosforilasi oksidatif. Fungsi yang kedua yaitu membantu sel-sel untuk menjaga konsentrasi ion kalsium yang tepat dalam berbagai kompartemennya. Mitokondria berfungsi sebagai tangki penyimpanan ion kalsium. Mereka juga membantu dalam membangun bagian-bagian tertentu dari darah, dan hormon seperti testosteron dan estrogen. Mitokondria dalam sel-sel hati memiliki enzim yang mendetoksifikasi

amonia. Mereka memainkan peran penting dalam proses kematian sel terprogram. Sel yang tidak diinginkan dan kelebihan dipangkas selama perkembangan organisme. Proses ini dikenal sebagai apoptosis. Kematian sel abnormal akibat disfungsi mitokondria dapat mempengaruhi fungsi organ.

Mitokondria merupakan organel yang berfungsi menyediakan energi selular (ATP). Makanan dioksidasi untuk menghasilkan elektron berenergi tinggi yang dikonversi menjadi energi yang tersimpan. Energi ini disimpan dalam bentuk ikatan fosfat kaya energi dalam molekul yang disebut adenosine triphosphate, atau ATP. Tahap-tahap yang terjadi di dalam mitokondria untuk menghasilkan energi, antara lain: glikolisis, transpor elektron, siklus kreb's, dan fosforilasi oksidatif.

Tahap glikolisis meliputi perubahan makanan menjadi energi (dalam bentuk ATP) dan air. Makanan yang menyediakan energi mengandung gula dan karbohidrat. Gula dipecah dengan bantuan enzim yang memecahnya menjadi bentuk yang paling sederhana dari gula yaitu glukosa. Selanjutnya glukosa memasuki sel dengan molekul khusus pada membrane yang disebut *glucose transporter*. Saat dalam sel, glukosa dipecah menjadi ATP melalui dua lintasan. Lintasan pertama tidak memerlukan oksigen dan disebut anaerobic metabolism. Lintasan ini disebut glikolisis dan terjadi dalam sitoplasma diluar mitokondria. Selama glikolisis, gula dipecah menjadi piruvat. Makanan lain seperti lemak dapat juga dipecah untuk digunakan sebagai bahan bakar. Setiap reaksi didesain untuk menghasilkan beberapa ion hydrogen (elektron) yang dapat digunakan untuk membuat paket energi (ATP). Tetapi hanya 4 molekul

ATP dapat dibuat oleh satu molekul glukosa melalui lintasan ini. Oleh karena itu mitokondria dan oksigen menjadi penting. Proses pemecahan perlu dilanjutkan dengan siklus Krebs di dalam mitokondria untuk memperoleh cukup ATP untuk melangsungkan fungsi-fungsi sel. Piruvat dibawa ke dalam mitokondria dan dikonversikan menjadi Acetyl Co-A yang memasuki siklus Krebs. Reaksi pertama ini menghasilkan karbon dioksida karena melibatkan pengeluaran satu karbon dari piruvat.

Siklus Krebs, yang juga disebut sebagai *citric acid cycle*, berfungsi untuk mendapatkan sebanyak-banyaknya elektron dari makanan yang dimakan. Elektron ini (dalam bentuk ion hidrogen) digunakan untuk mengendalikan pompa yang menghasilkan ATP. Energi yang dibawa ATP selanjutnya digunakan untuk semua macam fungsi selular seperti pergerakan, transport, keluar dan masuknya produk, pembelahan, dan lain-lain. Untuk melakukan siklus Krebs, beberapa molekul penting diperlukan. Pertama, diperlukan piruvat yang dibuat melalui glikolisis dari glukosa. Kemudian diperlukan molekul carrier untuk electron. Terdapat dua tipe molekul yaitu nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) dan flavin adenine dinucleotide (FAD⁺). Molekul ketiga yang diperlukan adalah oxygen. Piruvat adalah molekul dengan 3 karbon. Setelah memasuki mitokondria, piruvat dipecah menjadi molekul dengan 2 karbon oleh enzim khusus. Reaksi ini melepaskan karbon dioksida. Molekul dengan 2 karbon disebut acetyl CoA dan molekul ini memasuki siklus Krebs dengan cara bergabung dengan molekul 4 karbon yang disebut oxaloacetate. Ketika dua molekul ini bergabung, menghasilkan molekul 6

karbon yang disebut citric acid (2 karbon + 4 karbon = 6 karbon). Hal inilah yang menyebabkan siklus Krebs juga disebut siklus *citric acid*. *Citric acid* kemudian dipecah dan dimodifikasi, dan melepaskan ion hidrogen dan molekul karbon. Molekul karbon digunakan untuk membuat karbon dioksida dan ion hidrogen ditangkap oleh NAD dan FAD. Proses ini kembali menghasilkan oksaloasetat.

Transport elektron terjadi pada saat ion hidrogen atau elektron diambil dari sebuah molekul, maka molekul dikatakan dioksidasi. Ketika ion hidrogen atau elektron diberikan kepada sebuah molekul maka molekul tersebut direduksi. Saat molekul fosfat ditambahkan kepada sebuah molekul, maka molekul tersebut dikatakan difosforilasi. Jadi fosforilasi oksidatif berarti proses yang melibatkan penghilangan ion hidrogen dari satu molekul dan penambahan molekul fosfat ke molekul lainnya. Pada siklus Krebs, ion hidrogen atau elektron diberikan kepada dua molekul carrier. Mereka ditangkap oleh NAD atau FAD dan molekul pembawa ini akan menjadi NADH dan FADH (karena membawa ion hidrogen).

Elektron-elektron ini dibawa secara kimia ke sistem respirasi atau rantai transport electron yang terdapat di Krista mitokondria. NADH dan FADH secara esensial berfungsi sebagai pengangkut dari satu kompleks ke kompleks yang lain. Di setiap situs sebuah pompa proton mentransfer hidrogen dari satu sisi membrane ke yang lainnya. Hal ini menghasilkan sebuah gradient melintasi membrane dalam dengan konsentrasi hydrogen yang lebih tinggi pada ruang interkrista (ruang antara membran dalam dan membran luar).

Elektron dibawa dari satu kompleks ke kompleks yang lain oleh ubiquinone dan sitokrom C.

Cytochrome oxidase kompleks mengkatalisis transfer elektron ke oksigen menjadi air. Pompa chemiosmotic menghasilkan gradient proton electrochemical melewati membrane yang digunakan untuk menjalankan *energy producing machine* yaitu ATP synthase. Proses ini memerlukan oksigen sehingga disebut “aerobic metabolism”. ATP synthase menggunakan energy dari gradient ion hydrogen (juga disebut proton) untuk membentuk ATP dari ADP dan fosfat. Juga menghasilkan air, hidrogen dan oksigen.

Dari penjelasan diatas dapat dikatakan bahwa peran mitokondria sangat penting dalam menjaga kelestarian kehidupan sel yaitu dengan menghasilkan energi yang akan digunakan untuk menyelenggarakan/menjalankan fungsi sel.

Lebih dari 50 juta orang di AS memiliki gangguan degeneratif kronis yang melibatkan disfungsi mitokondria. Disfungsi mitokondria dapat mempengaruhi produksi produk sel-spesifik yang penting untuk fungsi sel yang tepat dan produksi energi. Hal ini pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel dan kegagalan sistem organ. Hal ini bahkan dapat membuktikan menjadi fatal dalam beberapa kasus. Ketika kemampuan mitokondria untuk menghasilkan energi berkurang karena cacat tertentu (mutasi genetik baik dalam DNA mitokondria atau DNA inti), kondisi ini digambarkan sebagai 'penyakit mitokondria. Mengurangi produksi energi dapat menyebabkan disfungsi otak, gangguan penglihatan, lemah otot, gerakan terbatas anggota badan, dll penyakit

mitokondria dapat menghancurkan kesehatan dari setiap sistem atau organ tubuh. Hal ini dapat merusak kesehatan jantung, kesehatan pencernaan orang tersebut. Setiap orang pada usia berapa pun dapat memiliki penyakit mitokondria. Namun, gejala dapat bervariasi dari orang ke orang, dan sering progresif. Beberapa gejala adalah infeksi berulang (sistem kekebalan tubuh yang lemah), mengurangi kapasitas jantung, stroke, kejang, kelelahan otot, masalah pencernaan, masalah hati, diabetes, obesitas, kebutaan dan tuli. Berbagai faktor lingkungan atau obat-obatan tertentu dapat mempengaruhi fungsi mitokondria negatif.

Studi menunjukkan bahwa disfungsi mitokondria adalah penyebab akar dari banyak penyakit umum. Beberapa kondisi kronis dewasa juga berasal dari dalam disfungsi mitokondria, misalnya, penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson, diabetes, hipertensi, penyakit jantung, osteoporosis, kanker, penyakit autoimun seperti multiple sclerosis, lupus dan rheumatoid arthritis. Disfungsi mitokondria memegang peran penting dalam gejala penuaan dini. Seperti mitokondria mengatur metabolisme seluler, lebih banyak penelitian tentang struktur dan fungsi mereka akan menguntungkan jutaan orang.

7. DNA MITOKONDRIA

Di dalam sel eukariot ada 2 jenis genom, yaitu DNA inti dan DNA sitoplasmik. DNA sitoplasmik berupa DNA mitokondria (mtDNA) untuk sel-sel hewan. Sedangkan pada sel tumbuhan, selain ada mtDNA juga ada DNA kloroplas (cpDNA). Genom sitoplasmik pada hewan berukuran kecil (sekitar 16000 bp), berbentuk sirkular dan berjumlah banyak (multikopi). Disebut

multikopi karena jumlah genom tsb di dalam matriks mitokondria berjumlah lebih dari satu. Selain itu, karena jumlah organel mitokondria dalam setiap sel juga lebih dari satu. Jumlah organel mitokondria dalam setiap sel sangat beragam, tergantung aktifitas sel. Pada vertebrata, sel-sel jantung, ginjal dan gonad dilaporkan mempunyai jumlah mitokondria mencapai 30000 organel per sel. Organel mitokondria bisa memperbanyak diri tergantung tingkat aktifitas sel. Mekanisme pembelahannya setara dengan pembelahan biner yang dilakukan oleh prokariot. Begitu juga, mtDNA bisa bereplikasi sehingga dalam satu organel bisa berjumlah lebih dari satu. Sebagaimana pembelahan biner prokariot yang tidak mengalami rekombinasi, maka pembelahan mtDNA juga tidak mengalami rekombinasi. Hal ini berarti antar kopi mtDNA dalam satu organel mitokondria adalah sama persis. Begitu juga, mtDNA yang jumlahnya mencapai ribuan dalam satu sel adalah sama persis.

Dalam kondisi tertentu, bisa jadi mtDNA saling berbeda. Ada beberapa bukti bahwa perbedaan tersebut kemudian menghilang karena efek pengenceran dan efek seleksi yang terjadi di dalam sitoplasma. Dengan kata lain, organel atau sel yang mengandung mtDNA yang berubah maka akan mati. Kalau perbedaan tsb terus ada di dalam satu organel ataupun di dalam satu sel, maka disebut kondisi heteromorfisme. Kondisi ini akan menyebabkan kelainan fungsi genom mitokondria yang menyebabkan beragam jenis penyakit degeneratif.

Pola pewarisan genom (satuan organisasi gen) mitokondria pada tingkat individu dilakukan melalui garis uniparental. Pada taksa yang jenis kelaminnya

ditentukan oleh kromosom seks maka ada diferensiasi jenis kelamin yang jelas. Dalam hal ini, pola pewarisan mtDNA dilakukan melalui garis maternal atau ibu. Dalam hal manusia (termasuk mamalia), pembentukan sel-sel telur (oogenesis) sudah dimulai sejak masa-masa awal embrio. Sel telur primer yang sudah terbentuk pada sekitar usia kandungan 4 bulan kemudian akan dorman. Aktifasi sel telur primer yang dorman dilakukan oleh hipotalamus (hipofisa) yang ditandai dengan pubertas sekitar umur 10 tahun. Sejak itu, secara periodik setiap 28 hari sekali ada telur yang keluar dari masa dorman untuk menjadi matang dan diovulasikan. Ketika seorang wanita mengovulasikan ovum pada usia 25 tahun, maka waktu yang 25 tahun tsb di-bypass oleh ovum. Ovum yang dibuat ketika ybs berumur 4 bulan di dalam kandungan tidak terpengaruh oleh lifestyle dari kehidupan anak-anak, remaja sampai dewasa dari si wanita. Dengan mode bypass ini, mitokondria ovum persis sama dengan ibu, nenek dst. Walaupun nantinya ada perbedaan maka semata-mata akibat adanya mutasi ketika replikasi selama oogenesis.

Oogenesis dilakukan melalui mekanisme pembelahan meiosis. Dalam hal ini material inti (nDNA) mengalami reduksi, dari diploid (berpasangan) menjadi haploid (tidak berpasangan). Sedangkan porsi sitoplasmanya terbagi asimetrik, yaitu tahap akhir dari pembelahan meiosis adalah sitokinesis yang tidakimbang. Hanya satu ovum yang dilengkapi dengan sitoplasma lengkap, sedangkan yang lain tidak normal yang disebut dengan benda kutub. Mitokondria ovum adalah persis sama dengan mitokondria ibu. Di lain pihak, spermatogenesis yang dilakukan dengan mekanisme meiosis yang sama dengan

oogenesis diakhiri dengan sitokinesis yang simetris sehingga menghasilkan 4 sel sperma yang normal. Mitokondria sperma persis sama dengan mitokondria bapak.

Ketika spermatozoa membuahi ovum, maka yang masuk ke sitoplasma telur hanya inti sperma. Inti diploid zigot merupakan inti diploid hasil rekombinasi dari inti telur dan inti sperma. Sedangkan sitoplasma zigot adalah persis sama dengan sitoplasma ovum. Jadi, melacak mutasi genom mitokondria bagaikan melacak garis keturunan ibu. Kalaupun ada perbedaan maka perbedaan tsb dihasilkan oleh semata-mata mutasi. Berbagai laporan menyebutkan bahwa mutasi berkorelasi dengan jumlah replikasi; dan jumlah replikasi setara dengan waktu.

DNA mitokondria memiliki perbedaan jika dibandingkan dengan DNA nukleus, yaitu: (1) DNA mitokondria memiliki laju mutasi lebih tinggi sekitar 10-17 kali DNA inti. Hal ini dikarenakan mtDNA tidak memiliki mekanisme reparasi yang efisien [Bogehagen, 1999], tidak memiliki protein histon, dan terletak berdekatan dengan membran dalam mitokondria tempat berlangsungnya reaksi fosforilasi oksidatif yang menghasilkan radikal oksigen sebagai produk samping [Richter, 1988]. Selain itu, DNA polimerase yang dimiliki oleh mitokondria adalah DNA polimerase γ yang tidak mempunyai aktivitas proofreading (suatu proses perbaikan dan pengakuratan dalam replikasi DNA). Tidak adanya aktivitas ini menyebabkan mtDNA tidak memiliki sistem perbaikan yang dapat menghilangkan kesalahan replikasi.

Replikasi mtDNA yang tidak akurat ini akan menyebabkan mutasi mudah terjadi.

(2) DNA mitokondria mempunyai jumlah lebih banyak jika dibandingkan DNA inti. (3) DNA mitokondria diwariskan hanya dari ibu, sedangkan DNA inti dari kedua orang tua. Dari segi ukuran genom, genom DNA mitokondria relatif lebih kecil. (4) DNA mitokondria berbentuk lingkaran, berpilin ganda, sirkular, dan tidak terlindungi membran (prokariotik). (5) DNA mitokondria terdapat di matriks mitokondria. (6) DNA mitokondria tidak memiliki intron dan semua gen pengkode terletak berdampingan. (7) DNA mitokondria mempunyai daerah yang tidak mengode dari mtDNA. Daerah ini mengandung daerah yang memiliki variasi tinggi yang disebut displacement loop (D-loop). D-loop merupakan daerah beruntai tiga (*triple stranded*) untai ketiga lebih dikenal sebagai 7S DNA. D-loop memiliki dua daerah dengan laju polymorphism yang tinggi sehingga urutannya sangat bervariasi antar individu, yaitu Hypervariable I (HVSI) dan Hypervariable II (HVSII). Daerah *non-coding* juga mengandung daerah pengontrol karena mempunyai *origin of replication* untuk untai H (OH) dan promoter transkripsi untuk untai H dan L (PL dan PH) [Anderson et al., 1981]. Selain itu, daerah non-coding juga mengandung tiga daerah lestari yang disebut dengan conserved sequence block (CSB) I, II, III. Daerah yang lestari ini diduga memiliki peranan penting dalam replikasi mtDNA. (8) DNA mitokondria bersifat haploid karena hanya berasal dari ibu. Perbedaan lainnya dari mitokondria adalah perbedaan kode genetik mitokondria menunjukkan perbedaan dalam hal pengenalan kodon universal.

UGA tidak dibaca sebagai “berhenti” (stop) melainkan sebagai tryptofan, AGA dan AGG tidak dibaca sebagai arginin melainkan sebagai “berhenti”, AUA dibaca sebagai methionin [Anderson et al., 1981].

8. GEN SITOKROM B

Sitokrom b (*cyt b*) adalah salah satu bagian dari sitokrom yang terlibat dalam transportasi elektron dalam mitokondria. *Cyt b* berisi delapan transmembran heliks yang dihubungkan oleh intramembran atau domain ekstrasembran. Gen *cyt b* dikodekan oleh DNA 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, sehingga dapat digunakan untuk pengelompokan berdasarkan jenis hewan atau untuk penentuan hubungan kekerabatan antar jenis hewan (Widayanti 2006).

Sekuen gen *cyt b* yang berasal dari tikus spesies *Rattus norvegicus* mempunyai panjang sekuen 1143 pb (Naidu et al. 2010), runutan genom *cyt b* *Capra hircus* sepanjang 1140 pb (Liu et al. 2007), *Gallus gallus* sepanjang 1143 pb, *Bos taurus* sepanjang 1140 pb (Geng & Chang 2008), *Ovis aries* sepanjang 1140 pb, *Sus scrofa* 1140 pb (Han et al. 2004), *Equus caballus* sepanjang 1139 pb dan *Cavia porcellus* sepanjang 1140 pb (Dunnum & Salazar 2010).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Terpadu UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta. Penelitian berlangsung dari bulan Oktober sampai dengan November 2013.

B. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium bidang biokimia molekuler dan modelling.

C. Tahapan Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi beberapa tahap, yaitu:

a. Penelusuran data gen Sitokrom b

Sekuen gen sitokrom b diperoleh dari database NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

b. Pemilihan Software

Software yang digunakan untuk desain primer, meliputi: BIOEDIT, OLIGO ANALYZER, FastPCR, SEQ SCANNER 2, dan SEQMAN-DNASTAR

c. Penyiapan sekuen gen sitokrom b dari database

Sekuen gen sitokrom b diperoleh dari database NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

d. *Alignment* sekuen gen sitokrom b dan pemilihan kandidiat primer

Alignment sekuen gen sitokrom b dilakukan dengan Blastp dengan database protein/nukleotida dari NCBI. Hasil *alignment* tersebut kemudian dimasukkan dalam program Bioedit dan dilakukan penyejajaran kembali. Analisis lebih lanjut dilakukan dengan Bioedit untuk mendapatkan region yang *conserved* dari sekuen gen sitokrom b. Conserved region tersebut merupakan kandidat primer (*reverse* maupun *forward*) yang kemudian diterjemahkan lebih lanjut menjadi urutan asam amino. Urutan-urutan asam amino yang diperoleh tersebut kemudian dianalisis untuk menentukan panjang basa, T_m ($^{\circ}\text{C}$) %GC, *cross homology*, dan *hairpin* dan didapatkan kandidat primer.

e. Penentuan sifat-sifat primer

Kandidat primer yang diperoleh, kemudian dianalisis sifat-sifatnya menggunakan Oligoanalyzer untuk mengetahui *misspriming*, heterodimer, struktur sekunder, dan *selfpriming*.

f. Uji *in silico*

Kandidat primer terpilih diuji lebih dulu secara *in silico* dengan menggunakan *FastPCR*. *FastPCR* merupakan tool untuk memprediksi keberhasilan primer yang telah di-desain jika di-*running* dalam thermal cycler PCR. Melalui uji *in silico* ini, kita dapat menentukan posisi penempelan primer pada sekuen gen sitokrom b.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. PENELUSURAN DATA GEN SITOKROM B

Sekuen gen sitokrom b diperoleh dari database NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Langkah pertama yang dilakukan adalah mengakses laman NCBI melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, sebagaimana tampilan yang disajikan pada gambar 4 berikut ini.



Gambar 4 Laman NCBI

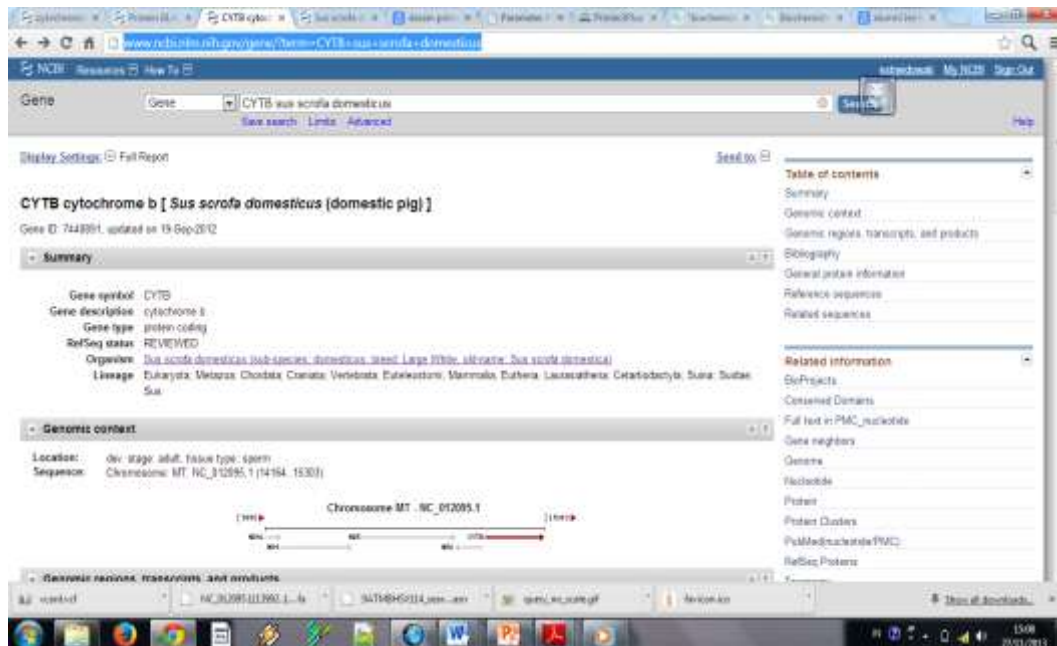
NCBI merupakan sumber informasi bagi perkembangan biologi molekuler, yang membuat database bagi data genomik, proteomik maupun metabolomik dari berbagai organisme. Data sekuen nukleotida yang disajikan dalam NCBI dapat berupa bentuk fasta maupun bentuk sekuen seperti lazimnya. Untuk mencari gen sitokrom b pada babi domestik, pada kolom search, kursor diarahkan ke 'gene' kemudian dimasukkan kata kunci *cyt b Sus scrofa*

domesticus. Disarankan untuk menggunakan nama ilmiah organisme yang spesifik (sampai level sub species) , supaya data yang diperoleh sesuai dengan target yang diharapkan. Adapun tampilan data search yang dimaksudkan disajikan pada gambar 5.

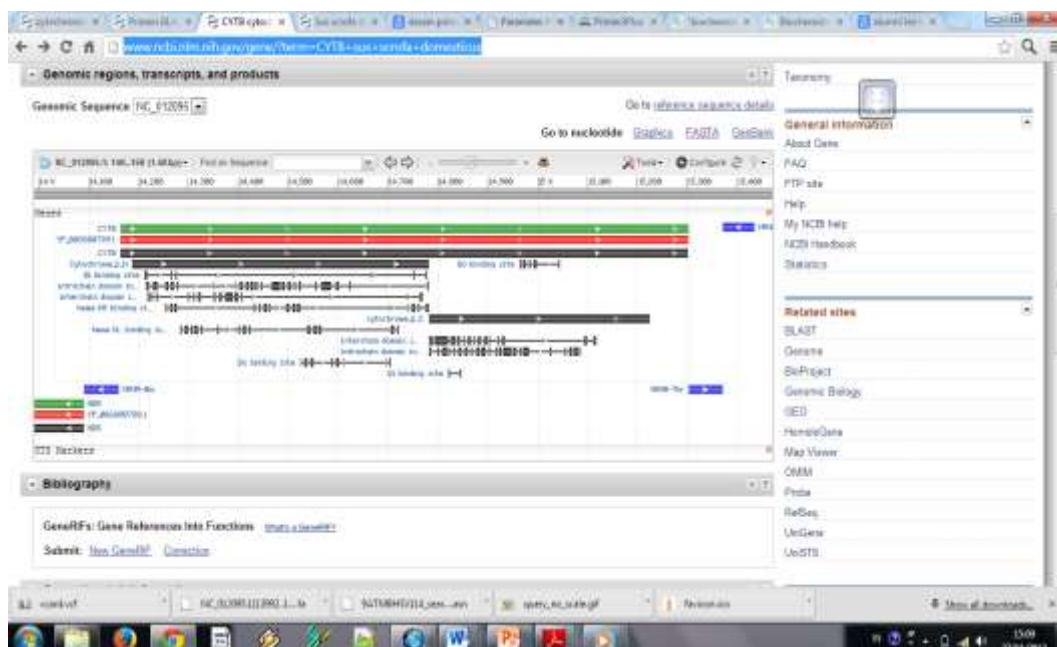


Gambar 5 Laman pencarian gen sitokrom b pada NCBI

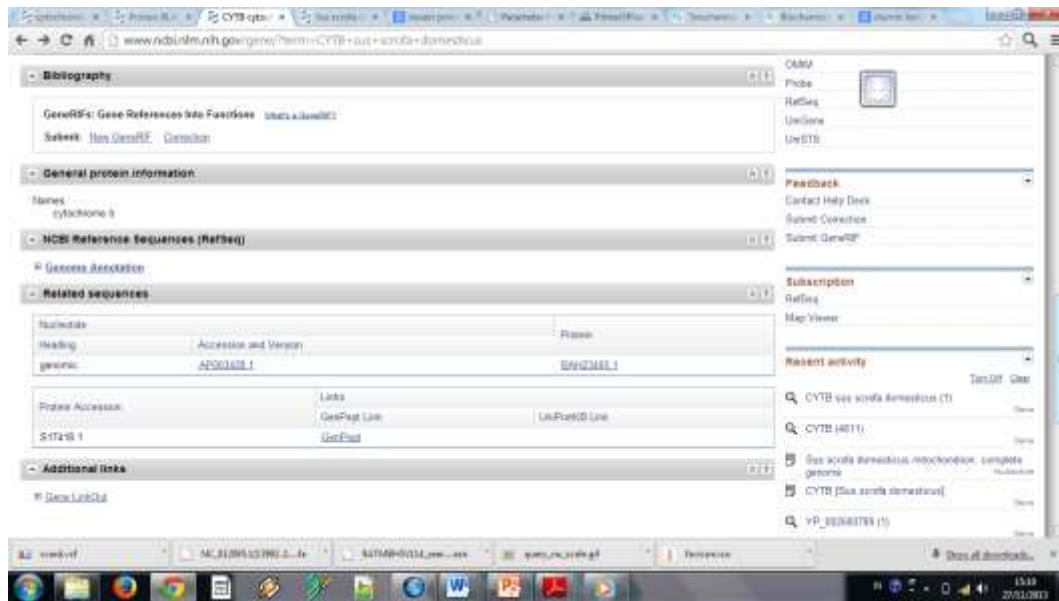
Running pencarian gen sitokrom akan membutuhkan waktu beberapa saat, kemudian akan diperoleh data yang berupa nomor identitas gen, lokasi sekuen yang dimaksud, dan data lain yang berhubungan dengan gen sitokrom b, sebagaimana terlihat pada gambar 6, gambar 7, dan gambar 8.



Gambar 6 Laman hasil pencarian gen sitokrom b pada NCBI



Gambar 7 Laman hasil pencarian gen sitokrom b pada NCBI



Gambar 8 Laman hasil pencarian gen sitokrom b pada NCBI

Tampilan laman hasil pencarian gen sitokrom pada gambar 6 menunjukkan informasi detail tentang gen sitokrom b pada point *genomic region, transcripts and product*. Sekuen sitokrom b ditunjukkan dengan warna hijau, disertai juga dengan *accession number* untuk gen tersebut. Pada gambar 6 diklik menu fasta pada bagian *go to nucleotide*, untuk mendapatkan data nukleotida sitokrom b dalam bentuk fasta-nya. Adapun hasil/tampilan selanjutnya disajikan pada gambar 8. s



Gambar 9 Laman pencarian nukleotida sitokrom b dalam bentuk fasta

Data Fasta yang dimaksud disajikan selengkapnya pada tabel 1 berikut ini.

Tabel 1 Nukleotida sitokrom b dalam bentuk fasta

1	CAACCCAAGT CCACCATAAA TAGGAGAGGG CTTAGAAGAA AAACCAACAA
51	ACCCAATAAC AAAAATAGTA CTTAAAATAA ATGCAATATA CATTGTCATT
101	ATTCTCACAT GGAATTTAAC CACGACCAAT GACATGAAAA ATCATCGTTG
151	TACTTCAACT ACAAGAACCT TAATGACCAA CATCCGAAAA TCACACCCAC
201	TAATAAAAAT TATCAACAAC GCATTTCATTG ACCTCCCAGC CCCCTCAAAC
251	ATCTCATCAT GATGAAACTT CGGTTCCCTC TTAGGCATCT GCCTAATCTT
301	GCAAACTCTA ACAGGCCTGT TCTTAGCAAT ACATTACACA TCAGACACAA
351	CAACAGCTTT CTCATCAGTT ACACACATTT GTCGAGACGT AAATTACGGA
401	TGAGTTATTC GCTATCTACA TGCAAACGGA GCATCCATAT TCTTTATTTG
451	CCTATTCATC CACGTAGGCC GAGGTCTATA CTACGGATCC TATATATTCC
501	TAGAAACATG AAACATTGGA GTAGTCTAC TATTTACCGT TATAGCAACA
551	GCCTTCATAG GCTACGTCCT GCCCTGAGGA CAAATATCAT TCTGAGGAGC
601	TACGGTCATC ACAAATCTAC TATCAGCTAT CCCTTATATC GGAACAGACC
651	TCGTAGAATG AATCTGAGGG GGCTTTTCCG TCGACAAAGC AACCTCACA
701	CGATTCTTCG CCTTCCACTT TATCCTGCCA TTCATCATT CCGCCCTCGC
751	AGCCGTACAT CTCATATTCC TGCACGAAAC CGGATCCAAC AACCTACCG
801	GAATCTCATC AGACATAGAC AAAATTCCAT TTCACCCATA CTACACTATT
851	AAAGACATTC TAGGAGCCTT ATTTATAATA CTAATCCTAC TAATCCTGT
901	ACTATTCTCA CCAGACCTAC TAGGAGACCC AGACAACTAC ACCCCAGCAA
951	ACCCACTAAA CACCCACCC CATATTAAC CAGAATGATA TTTCTTATTC
1001	GCCTACGCTA TTCTACGTTT AATTCTAAT AAAGTAGGTG GAGTGTGGC
1051	CCTAGTAGCC TCCATCCTAA TCCTAATTTT AATGCCATA CTGCACACAT
1101	CCAAACAACG AGGCATAATA TTTGACCAC TAAGTCAATG CCTATTCTGA
1151	ATACTAGTAG CAGACCTCAT TACACTAACA TGAATTGGAG GACAACCCGT
1201	AGAACACCCG TTCATCATCA TCGGCCAACT AGCCTCCATC TTATACTTCC
1251	TAATCATTCT AGTATTGATA CCAATCACTA GCATCATCGA AAACAACCTA
1301	TTAAAATGAA GAGTCTTCGT AGTATATAAA ATACCCTGGT CTTGTAACC
1351	AGAAAAGGAG GGCCACCCCT CCCCAAGACT CAAGGAAGGA GACTAACTCC
1401	GCCATCAGCA CCCAAAGCTG AAATTCTAAC TAACTATT CCGCAACCA
1451	AAACAAGCAT TCCATTCGTA TGCAAACCAA AA

B. KANDIDAT PRIMER

Data fasta yang diperoleh sebagaimana ditunjukkan pada gambar 9 di atas, kemudian digunakan untuk merancang kandidat primer. Data tersebut kemudian dimasukkan dalam Primer3Plus untuk mendapatkan beberapa kandidat primer. Setiap primer tersusun atas sekitar 20 basa nukleotida, disertai dengan sifatnya masing-masing, yaitu kandidat primer yang telah tersusun kemudian dianalisis masing-masing sekuennya berdasarkan urutan kodon yang menyusunnya.

Nukleotida yang merupakan penyusun kandidat primer dipisahkan menjadi setiap kodon-nya (urutan tiga basa yang mengkode asam amino). Kandidat primer yang diperoleh dari pengolahan data gen sitokrom B terdiri dari forward primer dan reverse primer, sebagaimana disajikan pada tabel 1 dan 2 di bawah ini.

Tabel 2 Kandidat forward primer

Kode	Panjang	Urutan nukleotida	Tm	% GC
FP-1	20 bp	CAACAACGCATTCATTGACC	60.0 °C	45.0 %
FP-2	20 bp	TCA TCA TCA TCG GCC AAC TA	60.0 °C	45.0 %
FP-3	20 bp	GGA GGA CAA CCC GTA GAA CA	60.0 °C	55.0 %
FP-4	20 bp	TGG AGG ACA ACC CGT AGA AC	60.0 °C	55.0 %
FP-5	20 bp	ATC ATC ATC GGC CAA CTA GC	60.1 °C	50.0 %

Tabel 3 Kandidat reversed primer

Kode	Panjang	Urutan nukleotida	Tm	% GC
RP-1	20 bp	AAT ATG GAT GCT CCG TTT GC	59.9 °C	45.0 %
RP-2	20 bp	GGC GGA GTT AGT CTC CTT CC	60.2 °C	60.0 %
RP-3	20 bp	GGC GGA GTT AGT CTC CTT CC	60.2 °C	60.0 %
RP-4	20 bp	GGC GGA GTT AGT CTC CTT CC	60.2 °C	60.0 %
RP-5	20 bp	GGC GGA GTT AGT CTC CTT CC	60.2 °C	60.0 %

C. PENGUJIAN KANDIDAT PRIMER

Masing-masing kandidat primer sebagaimana tercantum dalam tabel 1 dan 2 diuji secara *in silico* untuk memilih primer yang tepat untuk deteksi gen sitokrom b pada *Sus scrofa domesticus*. Pengujian tersebut dilakukan dengan fast PCR, untuk memilih primer yang paling tepat di antara kelima kandidat primer. Berdasarkan pengujian primer secara *in silico*, diperoleh data bahwa primer yang terbaik adalah primer 1 dengan urutan basa sebagai berikut: 5'-caacaacgcattcattgaccaatatggatgctccgtttgc, dengan persentase kesesuaian sebesar 62% dan Tm 35,4°C.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Primer cyt b yang dapat digunakan untuk mendeteksi cemaran daging babi telah berhasil disintesis. Terdapat 5 kandidat primer yang dapat dipilih untuk dibuat dalam skala laboratorium.
2. Satu primer yang terbaik berdasarkan hasil analisis in silico adalah primer dengan sekuen basa 5'-caacaacgcattcattgaccaatatggatgctccgtttgc.

B. SARAN

Penelitian ini sebaiknya dilanjutkan pada tahap sintesis dalam skala laboratorium, untuk menguji lebih lanjut apakah desain primer yang disintesis berhasil digunakan dalam proses PCR.

DAFTAR PUSTAKA

- Almira Primasari, 2011, Sensitivitas Gen Sitokrom B (Cyt B) Sebagai Marka Spesifik Pada Genus Rattus Dan Mus Untuk Menjamin Keamanan Pangan Produk Asal Daging, Tesis, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Erwanto, Y., Abidin, M.Z., Sismindari, and Rohman, A., 2012, Pig species identification in meatballs using polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism for Halal authentication, *International Food Research Journal*, 19 (3), p.901-906.
- Buzdin A, Lukyanov S. 2007. *Nucleic Acids Hybridization Modern Applications*. Netherlands: Springer.
- Chaundry U, Ray K, Bala M, Saluja D. Multiplex PCR assay for the detection of *N.Gonorrhoeae* in urogenital specimens. *Current science*, 2002,83 : 634-640
- Cheville, N.F., 1999, Introduction to Veterinary Pathology, Second Edition, Iowa State University Press
- Dunnum JL, Salazar BJ. 2010. Molecular systematics, taxonomy and biogeography of the genus *Cavia* (Rodentia: Caviidae). *J Zool Syst Evol Res* 48 (4):376-388.
- Garrow C, Smith D, Harnett G., 2002, The diagnosis of *C.Trachomatis*, gonorrhoeae, and *Trichomonas* infection by SOLVS, in remote northern australian clinical practice, *Sexually transmitted infection* , 78 : 278-281
- Geng RQ, Chang H. 2008. Genetic diversity and origin of Menggu cattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/193297018>.
- Giuffra E, Kijas JM, Amarger V, Carlborg O, Jeon JT, Andersson L. (2000). The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*. 154(4):1785-91. PMID 10747069
- Han S *et al.* 2004a. Polymorphism of the mtDNA cytochrome b and NADH dehydrogenase 6 genes in Tsushima and Jeju native horses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Naidu A, Fitak RR, Munguia-Vega A, Culver M. 2010. Novel PCR primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals.
- Nollet LML, Toldrá F. 2011. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*. New York: CRC Press.

- RL Maria, Sudarmono P, Ibrahim F. Sensitivitas metode PCR dalam mendeteksi isolat klinis *M.tuberculosis*, *J kedokteran Trisakti* 2002, 21 :7-14
- R.Rene, O.Gerrie, J Arjan *et al.*, Evaluation of an in house PCR for detection of *N. Gonorrhoeae* in urogenital samples. *J Clin Pathol* 1999, 52 : 411-414
- Syukur, D.A., Beternak Babi, Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Propinsi Lampung
- Taylor RW, Turnbull DM. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Natl Rev Gen* 6:389-402.
- Weissensteiner T, Griffin HG, Griffin A. 2004. *PCR Technology Current Innovations*. Ed ke-2. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC.
- Widyaninggar, A., Triwahyudi, Triyana, K. and Rohman, A., 2012, Differentiation Between Porcine And Bovine Gelatin In Commercial