

Perbandingan deteksi DNA menggunakan gen *D-loop* dan gen diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT 1) pada susu pasteurisasi

Comparison of DNA detection using D-loop and diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT 1) genes in pasteurized milk

Kamaliah¹

¹Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Ar-Raniry Banda Aceh, email: dyahelmy@gmail.com

Abstract: Detection for halal products or adulteration products using DNA as a genetic marker can be performed. This study was conducted to compare mitochondrial DNA (*D-loop* gene) and nuclear DNA (*Diacylglycerol acyltransferase 1* gene) in pasteurized milk. Amplification *D-loop* and *Diacylglycerol acyltransferase 1* (DGAT 1) genes were performed by *in vitro* using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The result of DNA visualization using Polyacrylamide Gel (Polyrilmide Gel Electrophoresis) technique (PAGE 6%) showed the DNA bands of *D-loop* gene thicker than *Diacylglycerol acyltransferase 1* (DGAT 1) gene.

Keywords: *D-loop* gene, *Diacylglycerol acyltransferase 1* (DGAT 1) gene, Polymerase Chain Reaction (PCR), pateurisasi milk

Abstrak: Deteksi produk halal atau produk campuran menggunakan DNA sebagai *marker* genetik dapat dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan hasil deteksi DNA menggunakan DNA mitokondria (gen *D-loop*) dan DNA inti (gen *Diacylglycerol acyltransferase 1*) pada susu pasteurisasi. Amplifikasi gen *D-loop* dan gen *Diacylglycerol acyltransferase 1* (DGAT 1) dilakukan secara *in vitro* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil visualisasi DNA menggunakan teknik Elektroforesis Gel Poliakrilamid (PAGE 6%) menunjukkan bahwa gen *D-loop* menghasilkan pita DNA lebih tebal dibandingkan dengan gen *Diacylglycerol acyltransferase 1* (DGAT 1).

Kata Kunci: Gen *D-loop*, gen *Diacylglycerol acyltransferase 1* (DGAT 1), *Polymerase Chain Reaction* (PCR), susu pateurisasi

Pendahuluan

Susu merupakan salah satu produk yang sering dikonsumsi dan dikomersialkan. Percampuran susu sapi dengan susu lainnya dapat menimbulkan permasalahan kesehatan dan permasalahan kehalalan produk (Norrakiah *et al.*, 2015). Percampuran susu di dalam produk komersial yang tidak sesuai dengan label dapat menyebabkan alergi atau meningkatkan kolesterol (*Low Density Lipoprotein*) di dalam darah. Produk susu yang mengandung derivat babi merupakan permasalahan haram bagi umat muslim. Beberapa negara muslim menggunakan DNA mitokondria dan DNA inti sebagai *marker* untuk mengidentifikasi spesies di dalam produk komersial halal (Shahilah *et al.*, 2016; Rezazadeh *et al.*, 2014; Farouk *et al.*, 2006; Maskova *et al.*, 2006; Murugaiah *et al.*, 2009; Hamzah *et al.*, 2014).

DNA mitokondria mudah digunakan untuk mendeteksi DNA karena ribuan kopi DNA mitokondria terdapat di dalam sel. *Gen D-loop* merupakan salah satu DNA mitokondria yang berhasil digunakan untuk mendeteksi kehalalan produk daging sapi, abon, nuget ayam, sosis domba, dan bakso (Hamzah *et al.*, 2013; Rahmawati *et al.*, 2016). Primer *D-loop* dapat mengenali semua spesies yang berbeda di dalam produk campuran. Primer *D-loop* mampu menempel pada sekuen DNA babi dan ayam di dalam produk bakso daging campuran (Fatimah, 2013). Deteksi gen *D-loop* di dalam produk susu pasteurisasi belum pernah dilaporkan. DNA di dalam susu berasal dari sel epitel ambing yang ikut keluar bersamaan ketika susu diperah.

Gen *Diacylglycerol acyltransferase 1* (DGAT 1) merupakan salah satu gen inti yang berpengaruh terhadap variasi komposisi lemak dan protein susu (Koopaei *et al.*, 2012). Perubahan basa nukleotida yang menghasilkan asam amino lisin menyebabkan tingginya komposisi lemak dan protein susu (Abu Sara *et al.*, 2015). Lemak dan protein susu merupakan faktor penghambat teknik *Polymerase Chain Reaction* untuk mendeteksi DNA. Tingkat keberhasilan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ditentukan oleh kualitas DNA dari kontaminasi faktor penghambat PCR (Schrader *et al.*, 2013). Variasi teknik isolasi DNA dari produk susu segar dilakukan untuk memperoleh kualitas DNA yang

tinggi (Volk *et al.*, 2014). Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan deteksi DNA menggunakan gen *D-loop* dan gen *Diacylglycerol acyltransferase 1* (DGAT 1) pada sampel susu pasteurisasi.

Bahan dan metode

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di bagian Fungsi Hayati dan Perilaku Hewan, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

Bahan

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah susu sapi pasteurisasi dari Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

Ekstraksi DNA Sampel Susu Pasteurisasi

Prosedur ekstraksi DNA secara manual dilakukan berdasarkan Sambrook *et al.*, (1989). Sampel susu 500 µl diencerkan menggunakan NaCl 0,9% untuk memisahkan sel dari cairan susu. Proses pengendapan sel dilakukan dengan sentrifugasi 1000 g selama 10 menit. Pengendapan sel dilakukan sebanyak dua kali dengan volume NaCl ditambahkan setengah dari volume awal. Endapan berupa sel epitel ambing. Proses lisis sel menggunakan enzim Proteinase K yang dikubasi pada suhu 55°C selama 1 jam. Kemudian digunakan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfat*) dan STE (*Salt Tris EDTA*). Tahap purifikasi menggunakan NaCl 5M. Perbandingan volume Fenol:Kloroform:Isomilalkohol adalah 25:24:1. Proses presipitasi DNA menggunakan alkohol absolut 2x volume awal dan NaCl 5 M 1/10 volume awal. Pada tahapan presipitasi DNA diendapkan dengan sentrifugasi 1200 g selama 10 menit.

Amplifikasi

Gen *Diacylglycerol-acyltransferase 1* (DGAT 1) dan gen *D-loop* diamplifikasi menggunakan mesin *Polymerase Chain Reaction* (Takara PCR Thermal Cycler MP4). Total volume PCR adalah 20 µl terdiri dari 0,8 µl masing-masing primer (Tabel 1), 2 µl template DNA, dan 10 µl *Taq* DNA polymerase Ready Mix (Kappa 0,05 U/ml, 25 mM Mg

polymerase buffer, dan dNTP 4 mM). Kondisi amplifikasi gen *Diacylglycerol-acyltransferase* 1 (DGAT 1) dilakukan dengan predenaturasi 94°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer 54°C selama 1 menit 30 detik, pemanjangan 72°C

selama 2 menit, diakhiri dengan pemanjangan akhir 72°C selama 7 menit. Untuk gen *D-loop* dilakukan dengan predenaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer 58°C selama 1 menit 30 detik, pemanjangan 72°C selama 2 menit, diakhiri dengan pemanjangan akhir 72°C selama 7 menit.

Table 1. Sekuens Primer Gen *Diacylglycerol-acyltransferase* 1 (DGAT1) and Gen *D-loop*

Gen	Primer	Sequence Primer
DGAT	AF115 (<i>Forward</i>)	5' --TTG GCA GGT TGT AGC ATG AG—3'
	AF116 (<i>Reverse</i>)	3' --GCA AGG CCT CCA GTT TTG TA--- 5'
<i>D-loop</i>	AF22 (<i>Forward</i>)	5' --GCG TAC GCA AAT CCT ACG ATC A- 3'
	AF23 (<i>Reverse</i>)	3' --ATG CAG TTA AGT CCA GCT AC -5'

Visualisasi Produk Amplifikasi

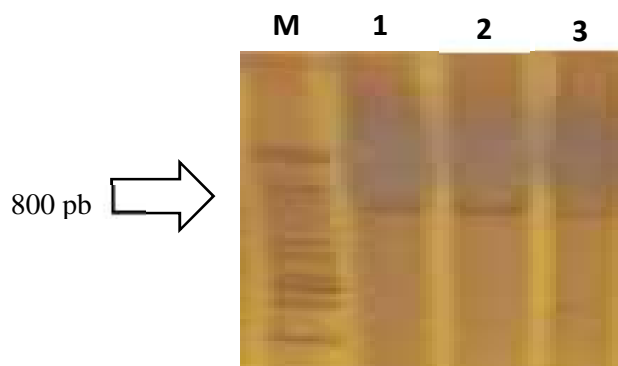
Produk amplifikasi gen *D-loop* dan gen *Diacylglycerol-acyltransferase* 1 (DGAT 1) menggunakan teknik Elektroforesis Gel Poliakrilamid (PAGE 6%) dengan konsentrasi bufer 1 TBE (Tris-HCl 0,5; Asam Borat 0,65; EDTA 0,02 M). Visualisasi DNA dilakukan menggunakan pewarnaan perak berdasarkan Byun *et al.*, (2009).

Hasil

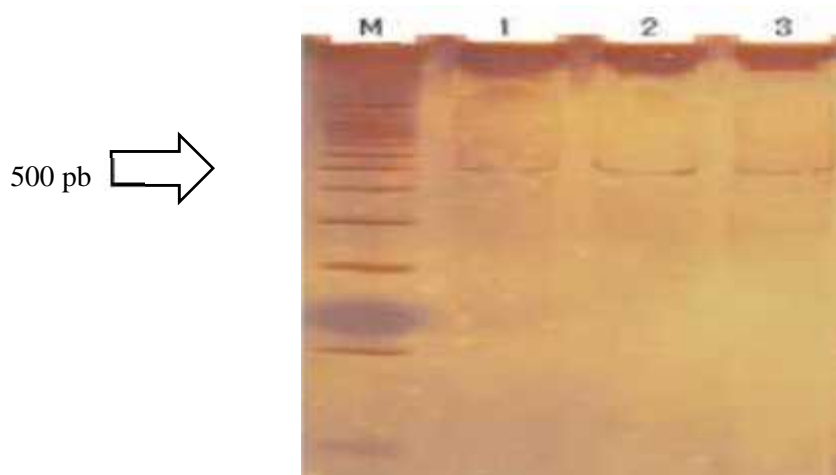
Amplifikasi gen *D-loop* menunjukkan fragmen DNA sebesar 800 pb (Gambar 1). Fragmen DNA

yang dihasilkan tebal dan tunggal. Hal ini kemungkinan karena gen *D-loop* merupakan gen mitokondria yang memiliki cetakan DNA dalam jumlah yang banyak di dalam sel. Namun warna fragmen DNA menunjukkan pita DNA yang kurang terang.

Hasil amplifikasi gen *Diacylglycerol-acyltransferase* 1 (DGAT 1) pada sampel susu menunjukkan ukuran sebesar 500 pb (Gambar 2). Pita DNA yang dihasilkan adalah tunggal, sangat tipis, kurang terang, dan tidak utuh.



Gambar 1. Produk amplifikasi gen *D-loop*. M: Marker, 1: Sampel susu no 1, 2: Sampel susu no 2, 3: Sampel susu no 3.



Gambar 2. Produk amplifikasi gen *Diacylglycerol-acyltransferase 1* (DGAT 1). M: Marker, 1: Sampel susu no 1, 2: Sampel susu no 2, 3: Sampel susu no 3.

Pembahasan

Label komposisi dan kehalalan produk dibutuhkan untuk meningkatkan keamanan dan kualitas pangan. Identifikasi spesies di dalam susu pasteurisasi dengan menggunakan teknik PCR dapat dilakukan. Penelitian ini dibandingkan cara deteksi DNA dari produk susu pasteurisasi menggunakan DNA mitokondria dan DNA inti. Gen *D-loop* berhasil teramplifikasi dengan ukuran pita DNA sebesar 800 pb. Hasil visualisasi gen *D-loop* secara elektroforesis menunjukkan fragmen DNA yang tebal. Hal ini kemungkinan karena gen *D-loop* merupakan gen mitokondria yang memiliki cetakan DNA dengan jumlah yang banyak di dalam sel. Hasil visualisasi gel elektroforesis gen *Diacylglycerol-acyltransferase 1* (DGAT 1) menunjukkan fragmen DNA yang sangat tipis jika dibandingkan dengan gen *D-loop*. Namun primer gen *Diacylglycerol-acyltransferase 1* (DGAT 1) dapat teramplifikasi pada gen target dengan ukuran fragmen DNA sebesar 500 pb.

Keberhasilan amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR tidak hanya dipengaruhi oleh desain primer. Namun, keberhasilan amplifikasi juga ditentukan oleh metode ekstraksi DNA yang digunakan. Susu memiliki lemak dan protein yang sangat banyak (Murphy *et al.*, 2002). Lemak dan protein merupakan faktor penghambat PCR (Nooratiny *et al.*, 2013). Lemak dan protein dapat

menghambat kerja enzim polimerase. Visualisasi pita DNA tunggal dan tidak utuh pada gen *Diacylglycerol-acyltransferase 1* (DGAT 1) diduga dipengaruhi oleh metode ekstraksi DNA yang digunakan. Selain itu, fragmen DNA yang dihasilkan pada kedua gen menunjukkan warna pita DNA yang kurang terang. Hal ini kemungkinan karena masih terdapat protein di dalam sampel. Ekstraksi DNA menggunakan metode *Phenol-Chloroform* yang digunakan pada sampel susu menghasilkan pita DNA yang kurang terang dan tidak utuh (Usman *et al.*, 2014).

Susu sangat tepat digunakan sebagai sumber DNA karena mudah diperoleh tanpa membuat stres pada hewan (Prokorska *et al.*, 2016). DNA di dalam susu berasal dari sel epitel ambing yang ikut keluar ketika susu diperah. Di dalam susu pasteurisasi masih terkandung DNA meskipun sudah mengalami beberapa kali proses hingga produk dihasilkan. Kesadaran konsumen terhadap label keamanan dan kehalalan pangan semakin meningkat. Susu pasteurisasi dapat digunakan sebagai sumber DNA untuk mendeteksi produk minuman halal.

Kesimpulan

Deteksi DNA menggunakan gen *D-loop* memperlihatkan pita DNA yang lebih jelas dibandingkan dengan gen *Diacylglycerol-acyltransferase 1* (DGAT 1). Ekstraksi DNA menggunakan metode *Phenol-Chloroform* dapat

digunakan untuk isolasi DNA dari sampel susu pasteurisasi. Susu pasteurisasi dapat digunakan sebagai sumber DNA untuk mendeteksi produk minuman halal.

Daftar pustaka

- Abu Sara, S.M., Said Ahmed, A., Ahmed, M.K.A., Reissmann, M., Brockmann, G.A., and Rahmatalla, S.A. 2015. Variants of the Diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT 1) Gene in Sudanese Dairy Cattle (Kenana and Butana). *Jurnal of Molecular Genetics* 7 (1-4): 5-9.
- Byun, S.O., Fang, Q., Zhou H, and Hickford, J.GH. 2009. An Effective Method for Silver-staining DNA in Large Numbers of polyacrilamid gels. *Anal Biochem* 385:174-175.
- Farouk, A.E., Batcha, M.F., Greiner, R., Salleh, H.M., Salleh, M.R., and Sirajudin, A.R. 2006. The Use of a Molecular Technique for the Detection of Porcine Ingredients in the Malaysian Food Market. *Saudi Med J* 2006 27 (9): 1397-1400.
- Fatimah, S. 2013. Deteksi Cemaran Daging Babi dalam Campuran Bakso Ayam dengan real-time Polymerase Chain Reaction dan Spektrofotometri Fourier Transform Infrared. *Tesis*. Gadjah Mada University.
- Hamzah, A., Muthalib, S.A., and Babji, A.S. 2013. Comparison Between Mt-DNA D-Loop and Cyt B Primers for porcine DNA Detection in Meat Products. *AIP Conference Proceedings* 1571, 669.
- Hamzah, A., Mutalib, S.A., and Babji, A.S. 2014. Porcine DNA Detection in Finished Meat Products Using Different Mitochondrial DNA (mt-DNA) on Polymerase Chain reaction 1. *J Nutr Food Scil* 4: 4-6.
- Koopaei, H.K., Mahyari, S.A., Tarang, A.R., Abadi, M.R.M., Koshkoiyeh, A.E., and Potki, P. 2012. Effect of *DGAT1* variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. *Animal Science Papers and Reports* 30 (3) : 231-239.
- Maskova, E. and Paulickova, I. 2006. PCR-Based Detection of Cow's Milk in Goat and Sheep Cheeses Marketed in the Czech Republic. *Czech J. Food Sci* 24(3): 127-132.
- Murphy, M.A., Shariflou, M.R., and Moran, C. 2002. High Quality Genomic DNA Extraction from Large Milk Samples. *Journal of Dairy Research* 69: 645-649.
- Murugaiah, C., Noor, Z.M., Mastakim, M., Bilung, L.M., Selamat, J., and Radu, S. 2009. Meat Species Identification and Halal Authentication Analysis Using Mitochondrial DNA. *Meat Science* 83 :57-61.
- Nooratiny, I., Sahilah, A.M., Alif Alfie, A. R., and Farouk, M. Y. 2013. DNA Extraction From Ghee and Beef Species Identification Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay. *International Food Research Journal* 20(5): 2959-2961.
- Norrakiah, A.S., Shahrul Azim, M.G., Sahilah, A.M. and Abdul Salam, B. 2015. Halal Analysis of Raw Materials, Ingredients and Finished Bakery Products Using PCR and Gene Chip Southern-hybridization for Detection of Porcine DNA. *International Food Research Journal* 22(5): 1883-1887.
- Pokorska, J., Kulaj, D., Dusza, M., ZychlinskaBuczek, J., and Makulska, J. 2016. New Rapid Method of DNA Isolation from Milk Somatic Cells. *Animal Biotechnology* 27(2) : 113-117.
- Rahmawati, Sismindari, Raharjo, T.J., Sudjadi, and Rohman, A. 2016. Analysis of Pork Contamination in *Abon* Using Mitochondrial D-Loop22 Primers Using Real Time Polymerase Chain Reaction Method. *International Food Research Journal* 23(1): 370-374.
- Rezazadeh, T., Aghaiypour, K., and Heidari, Z. 2014. Significance of Authenticity in Meat and Meat Products in Iran. *Iranian Journal of Health, Safety & Environment* 1(2):.83-88.
- Sahilah, A.M., Laila Liyana, M.N., Aravindran, S., Aminah, A, and Mohd Khan, A. 2016. Halal Authentication in Malaysia Context: Potential Adulteration of NonHalal Ingredients in Eatballs

- and Surimi Products. *International Food Research Journal* 23(5): 1832-1838.
- Sambrook, J, Fritsch, E.F., and Miniatis, T. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and Johne, R. 2012. PCR Inhibitors – Occurrence, Properties and Removal. *Journal of Applied Microbiology* 113:1014-1026.
- Usman, T., Yu, Y., Liu, C., Fan, Z., and Wang, Y. 2014. Comparison of Methods for High Quantity and Quality Genomic DNA Extraction from Raw Cow Milk. *Genetics and Molecular Research* 13 (2): 3319-3328.
- Volk, H., Piskernik, S., Kurincic, M., Klancnik, A., Toplak, N., and Jersek, B. 2014. Evaluation of Different Methods for DNA Extraction from Milk. *Journal of Food and Nutrition Research* 53(2): 97–104.