

## Perbandingan Metode SYBR Green dan Hydrolysis Probe dalam Analisis DNA Gelatin Sapi dan Babi Menggunakan Real Time PCR

(Comparison of SYBR Green and hydrolysis probe in analyzing porcine and bovine gelatin DNA using real time PCR)

Zilhadia<sup>1,2\*</sup>, Afifah Nurul Izzah<sup>1</sup>, & Ofa Suzanti Betha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

<sup>2</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Halal (Puslitbang Halal) UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

### Keywords:

gelatin; SYBR green; hydrolysis probe; real time PCR.

### Kata Kunci:

gelatin; SYBR green; hydrolysis probe; real time PCR.

**ABSTRACT:** Gelatin has a large application in the food, pharmaceutical and cosmetics industries. Gelatin is mostly derived from the skin or bone of porcine and bovine. Porcine gelatin is forbidden for Muslim and Jews. For this reason, analytical methods to detect gelatin are needed to make sure the source of gelatin. One of the analytical techniques that can differentiate bovine and porcine gelatin is Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR). There are two popular methods of fluorescence dye, namely SYBR green and hydrolysis probe. This study was conducted to compare SYBR green and hydrolysis probe method in analyzing porcine and bovine gelatin DNA using Real Time PCR. The DNA was isolated by commercial kit. The obtained porcine and bovine gelatin DNA were 19.38 ng/μl and 13.63 ng/μl with purity were 1,566 and 1,573, respectively. Then, isolated DNA was analyzed by SYBR green and hydrolysis methods. SYBR green methods was done by annealing temperature of 65 °C for bovine primer and 60 °C for porcine primer. Therefore, hydrolysis probe methods were analyzed by annealing temperature of 60 °C for both porcine primer and bovine primer. The result showed that the hydrolysis probe was higher specificity to identify of porcine and bovine gelatin DNA than SYBR green method.

**ABSTRAK:** Pemanfaatan gelatin secara luas menimbulkan kontroversi dan kekhawatiran bagi masyarakat muslim karena pada umumnya gelatin terbuat dari kulit babi dan sapi. Salah satu teknik analisis yang dapat membedakan gelatin sapi dan gelatin babi adalah Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR). Real Time PCR merupakan metode analisis berbasis DNA yang handal, efektif, dan terpercaya. Dalam analisis kualitatif dan kuantitatif, Real Time PCR membutuhkan pewarna fluoresens. Pewarna fluoresens yang umum digunakan adalah SYBR green dan hydrolysis probe. Telah dilakukan perbandingan antara metode SYBR green dan hydrolysis probe dalam analisis DNA gelatin menggunakan Real Time PCR. DNA pada gelatin diisolasi menggunakan kit komersial. Isolat DNA gelatin sapi dan DNA gelatin babi didapatkan sebanyak 19,38 ng/μl dan 13,63 ng/μl dengan kemurnian 1,566 dan 1,573. Isolat DNA yang dianalisis dengan metode SYBR green menggunakan suhu annealing 65 °C untuk primer sapi dan suhu annealing 60 °C untuk primer babi. Isolat DNA yang dianalisis dengan metode hydrolysis probe menggunakan suhu annealing 60 °C untuk primer babi dan primer sapi. Hasil analisis dari kedua metode menunjukkan bahwa metode hydrolysis probe lebih spesifik dalam mengidentifikasi DNA pada gelatin dibandingkan menggunakan metode SYBR green.

Access this article

DOI: [10.29208/jsfk.2017.4.1.194](https://doi.org/10.29208/jsfk.2017.4.1.194)



## PENDAHULUAN

Gelatin adalah polipeptida larut air hasil hidrolisis parsial kolagen dari kulit, tulang dan tulang rawan hewan [1]. Gelatin memiliki sifat yang unik dan berfungsi sebagai zat pembentuk gel, zat pengental, zat pembentuk film, zat pengemulsi, dan zat pensuspensi [2]. Oleh karena itu gelatin

digunakan secara luas dalam berbagai sektor industri yaitu industri farmasi, makanan, kosmetik, produk kedokteran dan fotografi. Dalam industri makanan, gelatin dapat ditemukan dalam produk ice cream, jelly, dan marshmallow. Pada industri farmasi, gelatin digunakan dalam tablet, cangkang kapsul keras dan lunak, tablet salut gula, enkapsulasi vitamin, dan pensubstitusi plasma darah [3].

### \*Corresponding Author: Zilhadia

Departemen Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.  
Email: [zilhadia@uinjkt.ac.id](mailto:zilhadia@uinjkt.ac.id)

### Article History:

Received: 18 Nov 2017  
Accepted: 20 Nov 2017  
Published: 30 Nov 2017



### Analisis Isolat DNA dengan Spektrofotometri UV

Pada sistem layar, panel “Nucleic Acid” dipilih untuk sampel dibersihkan dengan tisu steril. Elution buffer digunakan sebagai blangko. Sebanyak 2 µL DNA sampel ditaruh di atas tempat sampel. Kemudian tombol “Measure” diklik. DNA dianalisis pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Hasil instrumentasi akan didapatkan data konsentrasi DNA dalam ng/µl dan kemurnian DNA dengan perbandingan rasio A280 dan A260 [16].

### Amplifikasi DNA menggunakan Real-Time PCR

Amplifikasi DNA menggunakan metode SYBR Green dilakukan dengan cara sebagai berikut. SYBR green mastermix dibuat dengan volume total 20 µL yang terdiri dari 5 µL DNA yang diuji; 3 µL aquabidest; 1 µL primer forward 10 µM; 1 µL primer reverse 10 µM; dan 10 µL LightCycler® 480 SYBR Green.

Sebanyak 5 µL DNA yang akan diuji dan 15 µL SYBR green Mastermix dimasukkan ke dalam multiwell. Campuran selanjutnya, real time PCR dinyalakan, dilakukan pengaturan program, dan alat dijalankan [17].

Amplifikasi DNA menggunakan Hydrolysis Probe dilakukan dengan prosedur sebagai berikut. Hydrolysis Probe mastermix dibuat dengan volume total 20 µL yang terdiri dari 5 µL DNA yang diuji; 1,4 µL aquabidest; 1,6 µL primer forward 10 µM; 1,6 µL primer reverse 10 µM; 0,4 µL probe 10 µM; dan 10 µL LightCycler® 480 Probe master (enzim Taq DNA Polymerase, dNTP mix, dan 6,4 mM MgCl<sub>2</sub>). Sebanyak 5 µL DNA yang akan diuji dan 15 µL mastermix dimasukkan ke dalam multiwell plate. Campuran dihomogenkan. Selanjutnya, real time PCR dinyalakan, dilakukan pengaturan program, dan alat dijalankan [18].

## HASIL DAN DISKUSI

Isolat DNA didapatkan dari proses ekstraksi dan isolasi DNA menggunakan kit komersial High Pure PCR Template Preparation. Prinsip kit ini adalah menggunakan silikon dioksida (SiO<sub>2</sub>) untuk mengabsorpsi DNA sehingga

DNA mudah dipisahkan dari protein dan sel debris hasil pelisisan sel dengan cara sentrifugasi [15]. Reagen yang ditambahkan pada proses ekstraksi dan isolasi DNA meliputi: tissue lysis buffer sebagai pelisis membran sel, proteinase K sebagai enzim pemecah makromolekul protein menjadi molekul lebih kecil dan binding buffer sebagai chaotropic agent agar DNA dapat terabsorpsi kuat dengan silikon dioksida yang terdapat pada filter. Sebagai buffer yang dapat menghilangkan zat pengotor yang mengganggu proses PCR digunakan inhibitor removal buffer, washing buffer sebagai pencuci garam chaotropic dan pengotor lainnya, dan elution buffer sebagai pengelusi DNA dari silikon dioksida [15]. Selanjutnya isolat DNA dianalisis dengan spektrofotometri UV untuk mengetahui konsentrasi dan kemurniannya.

Hasil analisis konsentrasi dan kemurnian isolat DNA menggunakan spektrofotometri UV dapat dilihat pada Tabel 1. Analisis konsentrasi dan kemurnian isolat DNA menggunakan spektrofotometri UV dilakukan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi DNA yang didapatkan pada daging berkisar antara 80 ng/µl – 85 ng/µl dengan kemurnian kisaran 1,8. Sedangkan konsentrasi DNA yang didapatkan pada gelatin berkisar antara 13 ng/µl – 19 ng/µl dengan kemurnian 1,5. DNA dapat dikatakan murni terhadap protein apabila nilai rasio A260/A280 berkisar antara 1,8 sampai 2,0 [19].

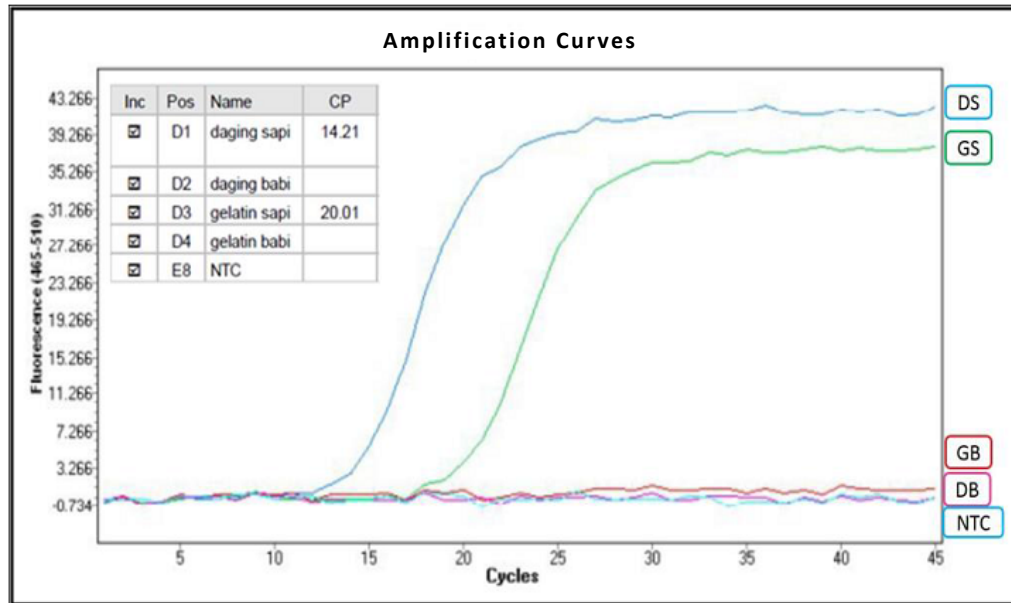
Konsentrasi isolat DNA daging yang didapatkan jauh lebih besar dibandingkan DNA gelatin. Hal tersebut dikarenakan daging memiliki jumlah sel yang banyak, sedangkan gelatin merupakan produk hasil olahan dari kolagen sehingga menyebabkan DNA gelatin yang didapatkan sedikit. Nilai kemurnian hasil isolasi pada gelatin dengan nilai dibawah 1,8 menunjukkan bahwa protein masih ada pada hasil isolat DNA gelatin [19]. Hal ini menunjukkan bahwa kit komersial ekstraksi dan isolasi DNA yang digunakan belum mampu memisahkan DNA gelatin dari pengotor protein dengan sempurna. Walaupun kemurnian DNA yang didapat adalah 1,5, isolat DNA gelatin babi tetap dapat dilanjutkan untuk proses PCR.

Amplifikasi DNA gelatin sapi dan DNA gelatin babi menggunakan Real Time PCR dilakukan dengan dua metode, yaitu metode SYBR Green dan metode Hydrolysis Probe. Hasil amplifikasi dari kedua metode tersebut dibandingkan satu sama lain dengan melihat spesifisitas dalam mengamplifikasi DNA gelatin sapi dan DNA gelatin babi.

Konsentrasi DNA daging sapi, DNA daging babi, DNA gelatin sapi, dan DNA gelatin babi yang digunakan dalam proses amplifikasi masing-masing adalah 8,59; 8,0; 19,38; dan 13,63 ng/µL. Untuk mendapatkan konsentrasi

**Tabel 1.** Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi

No	Sampel	Konsentrasi (ng/µl)	Kemurnian
1	Daging Sapi	85,99	1,804
2	Daging Babi	80,08	1,824
3	Gelatin Sapi	19,38	1,566
4	Gelatin Babi	13,63	1,573

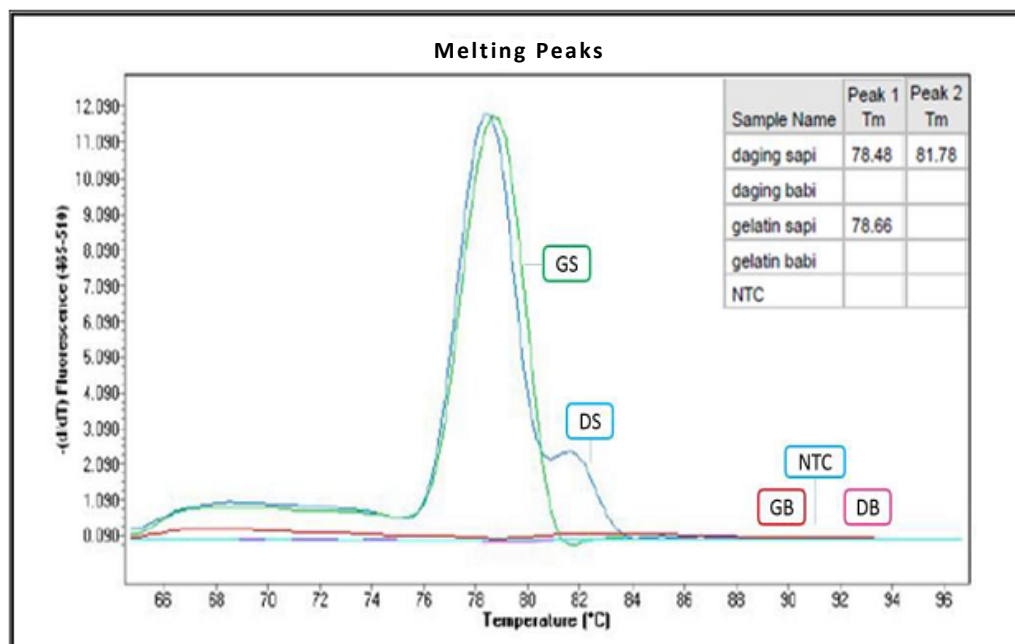


**Gambar 1.** Kurva amplifikasi dengan metode SYBR Green menggunakan primer sapi. Keterangan: DS = daging sapi, GS = gelatin sapi, GB = gelatin babi, DB = daging babi, NTC = not template control dan CP = crossing point

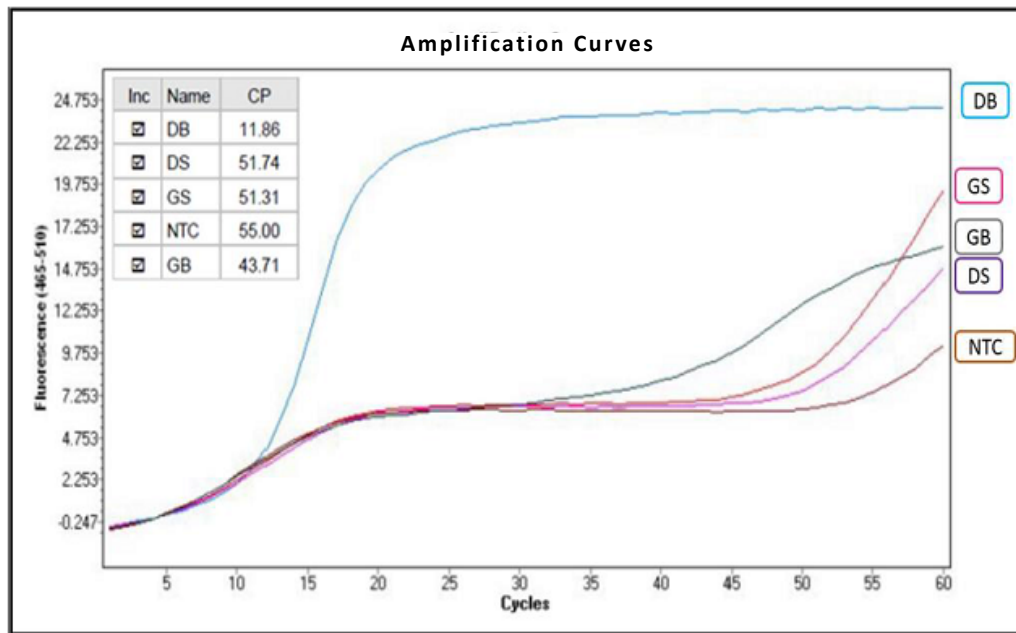
tersebut, isolat DNA daging sapi dan daging babi diencerkan agar konsentrasi DNA untuk proses amplifikasi tidak terlalu tinggi sehingga didapatkan kurva amplifikasi yang optimal. Kurva dianggap optimal apabila tidak terlalu cepat mencapai fase plateau pada awal siklus [18]. Analisis kurva amplifikasi dilihat melalui kenaikan kurva dan nilai CP (Crossing Point) pada kurva amplifikasi. Spesifisitas

hasil amplifikasi dapat dilihat melalui nilai  $T_m$  (Melting Temperature) pada melt curve.

CP adalah jumlah siklus dimana sampel mulai terbaca di atas Arbitrary Fluorescence Level (AFL) yang menunjukkan awal mulainya fase pertumbuhan eksponensial. Oleh karena itu, semakin rendah nilai CP semakin tinggi jumlah DNA target.  $T_m$  adalah suhu



**Gambar 2.** Nilai  $T_m$  (Melting Temperature) hasil amplifikasi dengan metode SYBR Green menggunakan primer sapi. Keterangan : DS=daging sapi, GS= gelatin sapi, GB=gelatin babi, DB = daging babi, NTC = not Template control

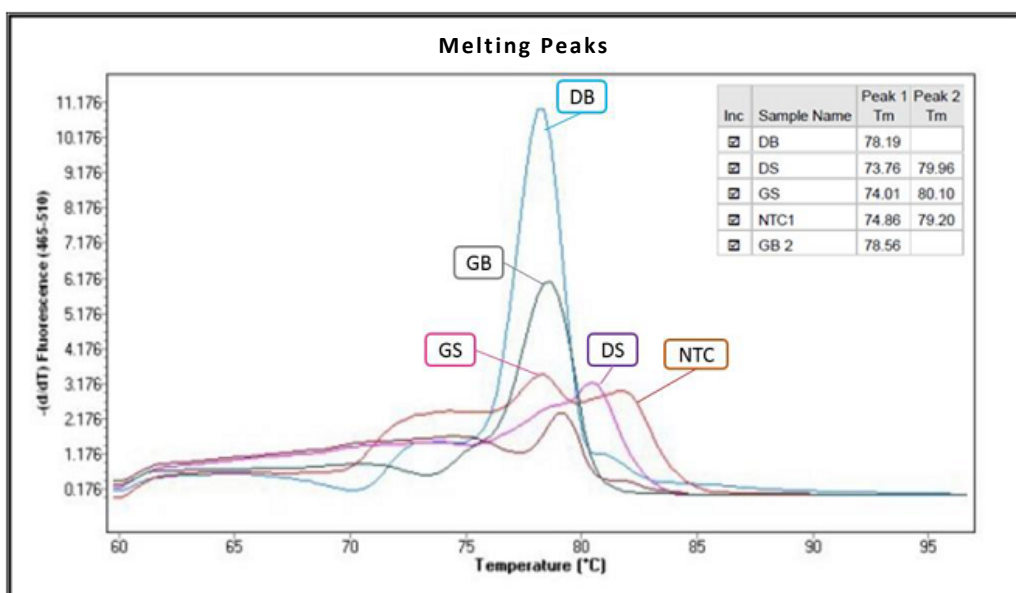


**Gambar 3.** Kurva amplifikasi dengan metode SYBR Green menggunakan primer babi. Keterangan: DS = daging sapi, GS = gelatin sapi, GB = gelatin babi, DB = daging babi, NTC = no template control; dan CP = Crossing Point

dimana 50% bagian dari DNA telah terbuka menjadi untai tunggal. Nilai  $T_m$  tergantung dari jumlah basa A, G, T, dan C. Primer yang spesifik akan menghasilkan satu puncak  $T_m$  pada DNA target [19].

Amplifikasi DNA dilakukan dengan beberapa percobaan dengan memodifikasi program proses amplifikasi yang bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimal dalam amplifikasi. Pada penelitian ini dilakukan

modifikasi suhu annealing yaitu pada suhu 60°C, 62°C, 64°C, dan 65°C. Dari percobaan tersebut didapatkan hasil amplifikasi DNA yang terbaik yaitu pada suhu 65°C. Hasil amplifikasi DNA menggunakan primer sapi metode SYBR green dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA daging sapi dan gelatin sapi mempunyai CP 14,21 dan 20,01. Secara teoritis, seharusnya nilai CP pada DNA gelatin sapi lebih kecil dibandingkan DNA



**Gambar 4.** Nilai  $T_m$  (melting temperature) hasil amplifikasi dengan metode SYBR Green menggunakan primer babi. Keterangan: DS = daging sapi, GS = gelatin sapi, GB = gelatin babi, DB = daging babi, NTC = no template control

daging sapi karena konsentrasi DNA gelatin sapi yang digunakan lebih tinggi dibanding DNA daging sapi. Hal ini dapat dikarenakan DNA pada gelatin memiliki nilai kemurnian yang rendah yaitu 1,5 dimana masih ada protein pada isolat DNA gelatin. Oleh karena itu jumlah DNA yang teramplifikasi pada DNA gelatin sapi lebih sedikit dibandingkan pada DNA daging sapi. Selain itu, pada gelatin banyak DNA yang terfragmentasi. Fragmentasi DNA dapat terjadi dikarenakan gelatin merupakan produk olahan dari kolagen. Semakin banyak jumlah DNA yang terfragmentasi, semakin kecil situs DNA target yang teramplifikasi [20].

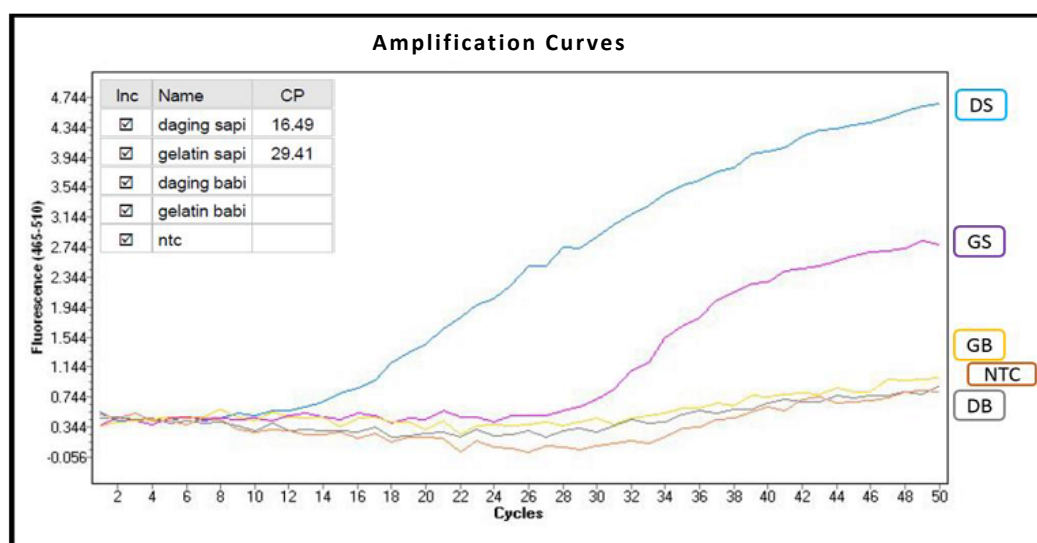
Berdasarkan hasil kurva amplifikasi yang terdapat pada [Gambar 1](#), DNA daging babi, DNA gelatin babi, dan NTC tidak mengalami kenaikan kurva amplifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa metode SYBR Green dengan primer sapi dapat mengamplifikasi DNA sapi secara spesifik.

Untuk menguji kespesifikan primer sapi menggunakan metode SYBR green, dilanjutkan dengan menganalisis nilai  $T_m$ . Nilai  $T_m$  Hasil Amplifikasi dengan Metode SYBR Green Menggunakan Primer Sapi dapat dilihat pada [Gambar 2](#). DNA daging sapi dan DNA gelatin sapi memiliki nilai  $T_m$  yang sama yaitu pada suhu 78°C. Nilai  $T_m$  tersebut merupakan  $T_m$  DNA target amplifikasi. Namun, pada DNA daging sapi, muncul puncak  $T_m$  lainnya yaitu 81,78 yang menunjukkan telah terbentuknya produk amplifikasi yang nonspesifik. Pada daging babi, gelatin babi, dan NTC tidak muncul puncak  $T_m$  yang menunjukkan bahwa tidak terjadi mis-priming ataupun primer-dimer. Primer-dimer adalah terbentuknya struktur sekunder yang disebabkan karena menempelnya sesama

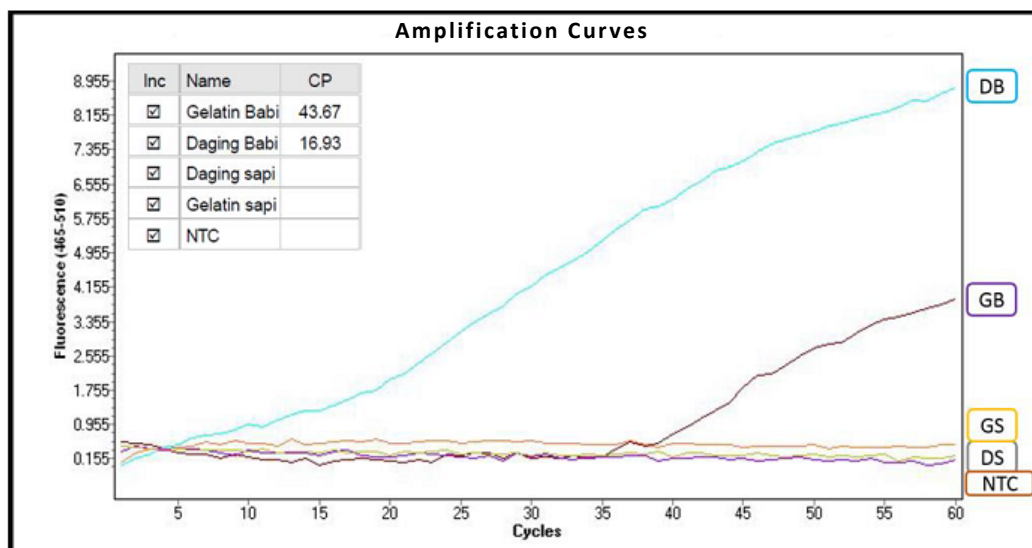
primer sejenis ataupun primer yang tidak sejenis seperti antara primer forward dengan komplemen primer reverse. Sedangkan mis-priming adalah penempelan primer diluar sekuen DNA target. Pasangan primer yang baik adalah kedua primer memiliki perbedaan nilai  $T_m$  tidak lebih dari 2 °C. Dengan demikian, primer sapi untuk analisis DNA daging dan gelatin sapi menggunakan metode SYBR green merupakan primer yang spesifik [21].

Pada penelitian ini, amplifikasi DNA dilakukan dengan modifikasi waktu annealing dan extension dilakukan pada 10 detik (annealing) & 7 detik (extension); 20 detik & 25 detik; dan 20 detik & 30 detik. Hasil amplifikasi DNA yang paling baik yaitu dengan modifikasi waktu annealing 20 detik dan extension 25 detik. Hasil amplifikasi terlihat pada [Gambar 3](#). Nilai CP hasil amplifikasi DNA daging babi dan DNA gelatin babi masing-masing adalah 11,86 dan 43,71. Secara teoritis, seharusnya nilai CP pada DNA gelatin babi lebih kecil dibandingkan DNA daging babi, karena konsentrasi DNA gelatin babi yang digunakan lebih tinggi dibanding DNA daging babi. Hasil ini sesuai dengan yang terjadi pada amplifikasi metode SYBR Green dengan primer sapi yang telah diuraikan sebelumnya, yaitu DNA gelatin yang digunakan memiliki kemurnian yang rendah dan banyak yang terfragmentasi. Sehingga DNA gelatin babi pada hasil kurva amplifikasi memiliki CP yang lebih besar daripada DNA daging babi.

Berdasarkan [Gambar 3](#), terjadi kenaikan kurva amplifikasi DNA daging sapi, DNA gelatin sapi, dan NTC pada siklus di atas 50, padahal seharusnya ketiga DNA tersebut tidak terjadi amplifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi amplifikasi nonspesifik yang dapat



**Gambar 5.** Kurva amplifikasi dengan metode Hydrolysis Probe menggunakan primer-probe sapi. Keterangan : DS = daging sapi, GS = gelatin sapi, GB = gelatin babi, DB = daging babi, NTC = no template control dan CP = crossing point



**Gambar 6.** Kurva amplifikasi dengan metode Hydrolysis Probe menggunakan primer-probe babi. Keterangan: DS = daging sapi; GS= gelatin sapi; GB = gelatin babi; DB = daging babi; NTC = no template control; dan CP = crossing point

disebabkan karena mis-priming atau primer-dimer seperti self dimer, cross dimer, atau pembentukan formasi hairpin. Terjadinya amplifikasi nonspesifik dianalisis melalui nilai  $T_m$ . Hasil analisis kespesifikan primer babi dapat dilihat pada [Gambar 4](#). Pada kurva tersebut terlihat bahwa pada DNA daging sapi, gelatin sapi dan NTC muncul puncak  $T_m$  yang seharusnya tidak ada. Puncak pada ketiga DNA tersebut merupakan hasil amplifikasi nonspesifik. Dari kurva amplifikasi dan  $T_m$  menunjukkan bahwa analisis DNA gelatin babi dan DNA gelatin sapi dengan metode Sybr Green pada primer babi yang di desain oleh Tanabe et. al., 2007 tidak dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut pada sampel [\[22\]](#).

Proses amplifikasi DNA dengan metode Hydrolysis Probe dilakukan dalam tiga tahap, yaitu tahap inisial denaturasi, tahap amplifikasi, dan tahap pendinginan. Konsentrasi DNA daging sapi; DNA daging babi; DNA gelatin sapi; dan DNA gelatin babi yang digunakan dalam proses amplifikasi masing-masing adalah 8,59 ng/ $\mu$ L; 8,0 ng/ $\mu$ L; 19,38 ng/ $\mu$ L; dan 13,63 ng/ $\mu$ L.

Metode analisis menggunakan Hydrolysis Probe menggunakan suhu annealing hasil optimasi yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya yaitu 60°C. Hasil amplifikasi DNA gelatin sapi dan DNA gelatin babi dengan primer sapi dapat dilihat melalui [Gambar 5](#). Daging sapi memberikan nilai CP lebih awal yaitu pada 16,49 meskipun konsentrasi DNA daging sapi yang digunakan hanya 8,59 ng/ $\mu$ L. Sedangkan gelatin sapi yang memiliki konsentrasi lebih tinggi yaitu 19,38 ng/ $\mu$ L memberikan nilai CP lebih lama yaitu pada 29,41. Secara teoritis, seharusnya nilai CP

pada DNA gelatin sapi lebih kecil dibandingkan DNA daging sapi. Hal ini sejalan dengan kurva yang dihasilkan metode SYBR Green yaitu disebabkan karena kemurnian DNA gelatin yang rendah dan DNA gelatin yang banyak terfragmentasi [\[20\]](#).

Spesifisitas amplifikasi dengan menggunakan Hydrolysis Probe tidak dapat dianalisa melalui Melting Peaks, karena perbedaan prinsip pewarnaan fluoresens antara metode SYBR Green dengan Hydrolysis Probe. Spesifisitas metode Hydrolysis Probe dilihat berdasarkan kenaikan kurva amplifikasi pada kontrol negatif. Pada [Gambar 5](#), pada DNA daging babi, DNA gelatin babi, dan NTC yang merupakan kontrol negatif tidak terjadi kenaikan kurva amplifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa primer-probe sapi dapat mengamplifikasi DNA sapi secara spesifik. Oleh karena hal tersebut, metode ini dapat digunakan untuk analisa lebih lanjut pada sampel yang mengandung gelatin.

Pada [Gambar 6](#) terlihat bahwa daging babi memberikan nilai CP lebih awal yaitu pada 16,93, diikuti dengan gelatin babi dengan nilai CP 43,67. Secara teoritis, seharusnya nilai CP pada DNA gelatin babi lebih kecil dibandingkan DNA daging babi dimana konsentrasi DNA gelatin yang digunakan dalam proses amplifikasi lebih tinggi dibandingkan DNA daging. Hal ini dapat disebabkan kemurnian DNA gelatin yang rendah dan DNA gelatin yang banyak terfragmentasi [\[20\]](#). Hasil kurva amplifikasi pada [Gambar 6](#) menunjukkan metode analisa ini cukup spesifik untuk deteksi DNA babi yang ditandai dengan tidak terjadinya amplifikasi pada DNA daging sapi,

gelatin sapi, dan NTC. Oleh karena hal tersebut, metode ini dapat digunakan untuk analisa lebih lanjut pada sampel yang mengandung gelatin.

## KESIMPULAN

Analisis DNA gelatin sapi dan DNA gelatin babi dengan metode SYBR Green menghasilkan amplifikasi yang nonspesifik, sehingga metode ini kurang baik digunakan sebagai metode analisis DNA gelatin sapi dan DNA gelatin babi. Namun, dengan metode Hydrolysis Probe amplifikasi DNA gelatin sapi dan DNA gelatin babi berlangsung secara spesifik sehingga metode ini dapat digunakan sebagai metode analisis DNA gelatin sapi dan DNA gelatin babi.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ratnasari, I., Yuwono, S.S., Nusyam, H., & Widjanarko, S.B. (2013). Extraction and characterization of gelatin from different fresh water fishes as alternative sources of gelatin. *International Food Research Journal*, 20(6), 3085–3091.
- [2] Aisyah, N.M., Nurul, H., Azhar, M.E., & Fazilah, A. (2014). Poultry as an Alternative Source of Gelatin. *Health and the Environment Journal*, 5(1), 37–49.
- [3] Nhari, R.M.H., Ismail, R.A., & Cheman, Y.B. (2012). Analytical methods for gelatin differentiation from bovine and porcine origins and food products. *Journal of Food Science*, 77(1), 42–46.
- [4] Sarbon, N.M., Badii, F., & Howell, N.K. (2013). Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 143–151.
- [5] Shyni, K., Herna, G.S., Ninan, G., Mathew, S., Joshy, C.G., & Lakshmanan, P.T. (2014). Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Food Hydrocolloids*, 39(8), 68–76.
- [6] Jamaludin, M.A., Ramli, M.A., & Hashim, D.M. 2012. Fiqh Istihalah: Integration of Science and Islamic Law. *Revelation and Science*, 2(2), 5–18.
- [7] Nemati, M., Oveisi, M.R., Abdollahi, H., & Sabzevari, O. (2004). Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(3), 485–492.
- [8] Hidaka, S., & Liu, S.Y. (2003). Effects of gelatins on calcium phosphate precipitation: A possible application for distinguishing bovine bone gelatin from porcine skin gelatin. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(4), 477–483.
- [9] Hashim, D.M., CheMan, Y.B., Norakasha, R., Shuhaimi, M., Salmah, Y., & Syahariza, Z.A. (2010). Potential use of Fourier transform infrared spectroscopy for differentiation of bovine and porcine gelatin. *Food Chemistry*, 118(3), 856–860.
- [10] Zhang, G. F., Tao, L. I. U., Qian, W. A. N. G., Jian-Du, L. E. I., Guang-Hui, M. A., & Zhi-Guo, S. U. (2008). Identification of marker peptides in digested gelatins by high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36(11), 1499–1504.
- [11] Venien, A., & Leveux, D. (2005). Differentiation of bovine from porcine gelatines using polyclonal anti-peptide antibodies in indirect and competitive indirect ELISA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39(3), 418–424.
- [12] Cai, H., Gu, X., Scanlan, M.S., Ramatlapeng, D.H., & Lively, C.R. (2012). Realtime PCR assays for detection and quantitation of porcine and bovine DNA in gelatin mixtures and gelatin capsules. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1), 83–87.
- [13] Demirhan, Y., Ulca, P., & Senyuva, H.Z. (2012). Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products-Halal/Kosher authentication, *Meat Science*, 90(3), 686–689.
- [14] Arya, M., Iqbal, S., Shergill, Wiliamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, R.H. (2005). Basic Principle of Real-Time Quantitative PCR. *Future Drugs Review Article*, 5(2), 209–219.
- [15] Roche. (2012). High Pure PCR Template Preparation Kit. <http://www.rocke-applied-science.com>. Diakses pada 13 Juni 2014
- [16] BioDrop. (2012). Quick Start Guide. <http://www.biodrop.co.uk>. Diakses pada 30 September 2014.
- [17] Roche. (2005). LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master. [www.rockeapplied-science.com](http://www.rockeapplied-science.com). Diakses pada 2 September 2014.
- [18] Roche. (2008). The LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual. [www.rockeapplied-science.com](http://www.rockeapplied-science.com). Diakses pada 10 Juni 2014.
- [19] Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Edisi ketiga. New York: Cold Spring Harbour Lab. Press.
- [20] Edward, M.G., Bickel, A., & Weihs, P. (1996). Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(24), 5026–5033.
- [21] Smith, Cindy J., & Osborn, A.M. (2008). Advantages and Limitations of Quantitative PCR (Q-PCR)-based Approaches in Microbial Ecology. Federation of European Microbiological Societies UK: Blackwell Publishing Ltd.
- [22] Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., & Akiyama, H. (2007). A Real Time quantitative detection method for pork, chicken, beef, mutton and horseflash in foods. *Bioscience Biotechnol Biochem*, 71(12), 3131–3135.



Copyright © 2017 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)