

Pengujian Kualitas Dan Kuantitas Ikan Segar Beserta Produk Olahannya Dengan Metode DNA

(Quality and Quantity Testing of Fresh and Processed Fish Using the DNA Method)

Nur Azizah Nasution^{1*}, Hadi Syahputra²

¹Departemen Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan, Universitas Nahdlatul Ulama Cirebon

²Departemen Budidaya Perairan, Universitas Nahdlatul Ulama Cirebon

*Korespondensi: nstnurazizah@gmail.com

Abstract

Processed fishery products are the result of diversifying fish into various products that have higher market value, longer shelf life, and high nutritional value, such as fish balls and chikuwa. The fish species used as the raw material must be clearly identified to avoid issues of mislabeling, wholesomeness, and economic fraud. One accurate and effective method for identifying the fish used within these processed products is DNA identification. The objectives of this research are to determine the quantity of fish in the processed products, assess the quality of the processed products, and identify the most effective DNA isolation method for this purpose. The results showed that the CTAB DNA isolation method was the most sensitive, as it yielded DNA with the highest purity. In contrast, the Qiagen Kit method was the fastest and easiest to use.

Keywords: processed products, DNA identification.

Abstrak

Produk olahan perikanan adalah hasil diversifikasi ikan menjadi berbagai produk yang memiliki nilai jual lebih tinggi, tahan lama, dan bernilai gizi tinggi, seperti bakso dan chikuwa. Ikan yang digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan produk olahan harus jelas spesiesnya sehingga tidak terjerat dalam *mislabeling*, *wholesomeness*, dan *economic frauds*. Salah satu cara yang tepat dan efektif dalam mengidentifikasi ikan yang sudah diolah didalam produk adalah dengan identifikasi DNA. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui uji kuantitas pada produk olahan ikan, mengetahui uji kualitas pada produk olahan ikan, mengetahui perbandingan metode isolasi terbaik. Hasil yang diperoleh yaitu metode Isolasi DNA CTAB merupakan metode yang paling sensitif karena menghasilkan kemurnian DNA terbaik, sedangkan metode Kit Qiagen merupakan metode yang paling cepat dan mudah.

Kata kunci: produk olahan, identifikasi DNA.

PENDAHULUAN

Ikan yang dihasilkan dalam perikanan tangkap memiliki jenis yang melimpah sehingga diperlukan identifikasi dan diverifikasi kevalidan spesies tersebut agar kemudian ikan yang nantinya akan dijual memiliki kejelasan data yang lengkap dan valid. Begitupula halnya dengan produk perikanan dari sektor pengolahan perikanan. Produk olahan perikanan merupakan bentuk diversifikasi produk yang menggunakan hasil perikanan sebagai bahan dasar. Pengolahan ialah salah satu kegiatan yang dilakukan untuk meningkatkan mutu dari hasil perikanan baik perikanan laut maupun perikanan tawar. Selain itu proses pengolahan juga dapat memberikan nilai tambah pada produk. Produk perikanan harus diproduksi dengan baik dan benar, hal tersebut

adalah penerapan jaminan mutu pada proses pengolahan. Ikan yang digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan produk harus jelas spesiesnya sehingga tidak terjerat dalam *mislabeled*, *wholesomeness*, dan *economic frauds*. Salah satu cara yang tepat dan efektif dalam mengidentifikasi ikan segar maupun ikan yang sudah diolah didalam produk adalah dengan cara identifikasi DNA.

Analisis DNA barcoding spesies bahan baku mampu mendukung penerapan program keamanan pangan dengan pendeteksian melalui DNA sequencing (Armani et al. 2015). Metode identifikasi berbasis DNA merupakan teknik yang paling baik untuk mengetahui informasi suatu spesies serta lebih cepat dan handal (Zhang and Hanner 2011). Sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi spesies dalam berbagai produk olahan. Salah satu teknik yang dapat digunakan dalam identifikasi spesies yang sudah diolah menjadi produk perikanan adalah analisis DNA barcoding.

Analisis DNA tersebut bertujuan untuk menentukan kualitas dan kuantitas molekul DNA pada sampel produk chikuwa kemudian dipasangkan dengan primer yang berasal dari lokus tertentu pada kromosom beberapa jenis ikan tertentu. Kegiatan ini melibatkan serangkaian kerja yang diawali dengan isolasi, ekstraksi, purifikasi/pemurnian dan analisa DNA.

Isolasi DNA merupakan tahap awal dari rangkaian berbagai teknologi analisis DNA. Proses pemecahan membran sel dan membran inti dibutuhkan untuk mengisolasi DNA kemudian dilanjutkan dengan pemisahan DNA dari berbagai komponen sel lain. Pada saat melakukannya, DNA harus dijaga agar tidak rusak dan dalam bentuk rantai panjang (Fatchiyah et al. 2011).

Berdasarkan uraian diatas, maka diperlukan isolasi dan pemurnian DNA untuk melihat kualitas DNA dari chikuwa produk olahan ikan. Pendekatan identifikasi tersebut dapat dilakukan dengan beberapa tahap analisis antara lain isolasi secara konvensional menggunakan CTAB dan kit dari Qiagen), selanjutnya amplifikasi menggunakan alat PCR (Polymerase Chain Reaction). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan isolasi dan pemurnian DNA pada produk olahan perikanan.

METODE

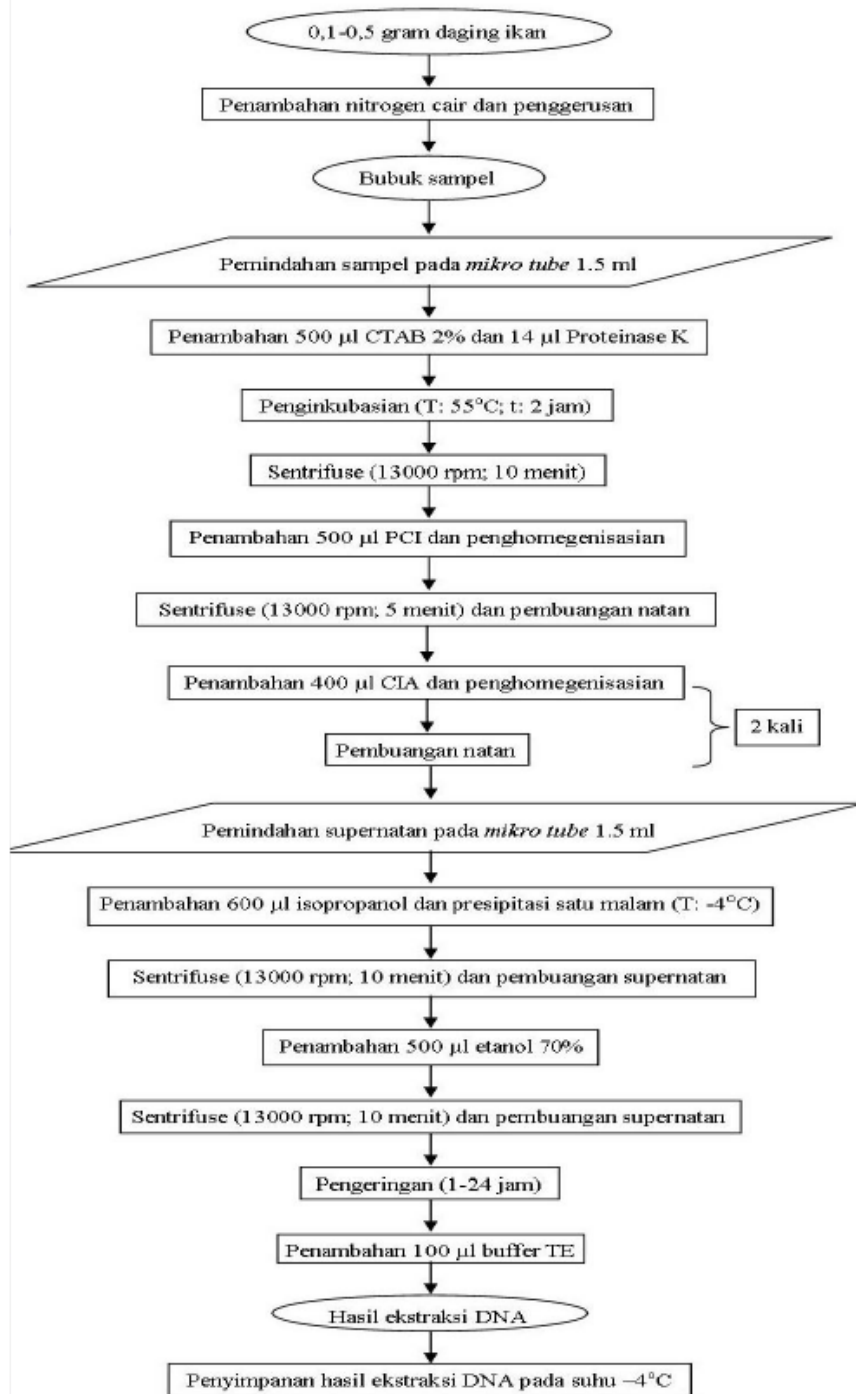
Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel bakso, chikuwa, ikan ekor kuning, CTAB 2%, proteinase K, Isoamilalkohol, larutan PCI (*Phenol, chloroform, isoamilalkohol*), larutan CIA (*chloroform, isoamilalkohol*), buffer TE, kit Qiagen, Ethidium bromide (EtBr), alkohol, *food buffer lysis*, protease K, Chloroform, buffer PB, buffer AW, buffer EB, RNAase, digestion solution (DS), lysis solution (LS), ethanol, WB1 dan WB2. Alat yang digunakan yaitu Freezer, microtube 1,5 mL, mikropipet dan tip, spin down, sentrifuge, vortex, PCR (Thermocycler Biometra T1), alat sinar UV (merk Extragene Ultraviolet Viewer), elektroforesis (merk Mupid-Exu, tipe Electrophoresis System), timbangan digital, dan microwave, pH meter, mortar, sarung tangan, sudip, aluminium foil, waterbath shaker, column tube dan spin column.

1. Isolasi DNA Menggunakan CTAB Modifikasi

Timbang sampel 0,1-0,5 gr, kemudian dihaluskan dan dimasukkan ke dalam microtube 1,5ml. Tambahkan 500µl CTAB 2% dan 14µl Proteinase K, vortex dan di spin down. Kemudian inkubasi dengan suhu 55°C selama 2 jam dan di sentrifuge dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit. Tambahkan lagi 500µl PCI dan

divortex serta di spindown. Selanjutnya di sentrifuge lagi dengan kecepatan 13000rpm selama 5 menit dan dilakukan pembuangan natan.

Setelah itu, tambahkan 400µl CIA, vortex, di spin down dan dibuang natannya. Proses ini dilakukan dua kali berturut-turut. Kemudian dilakukan pemindahan supernatant pada microtube baru dan ditambahkan 600µl isopropanol, presipitasi semalaman dengan suhu -4°C. Selanjutnya di sentrifuge dengan kecepatan 13000rpm selama 10 menit dan dibuang supernatannya. Tambahkan 500µl etanol 70%, sentrifuge kecepatan 13000 rpm selama 10 menit dan dilakukan pembuangan supernatannya, keringkan di suhu ruang selama 24 jam. Setelah kering, tambahkan 100µl buffer TE dan didapatkan hasil ekstraksi DNA. Simpan pada suhu -4°C atau di dalam kulkas hingga digunakan.



Gambar 1. Alur proses ekstraksi/isolasi DNA menggunakan CTAB

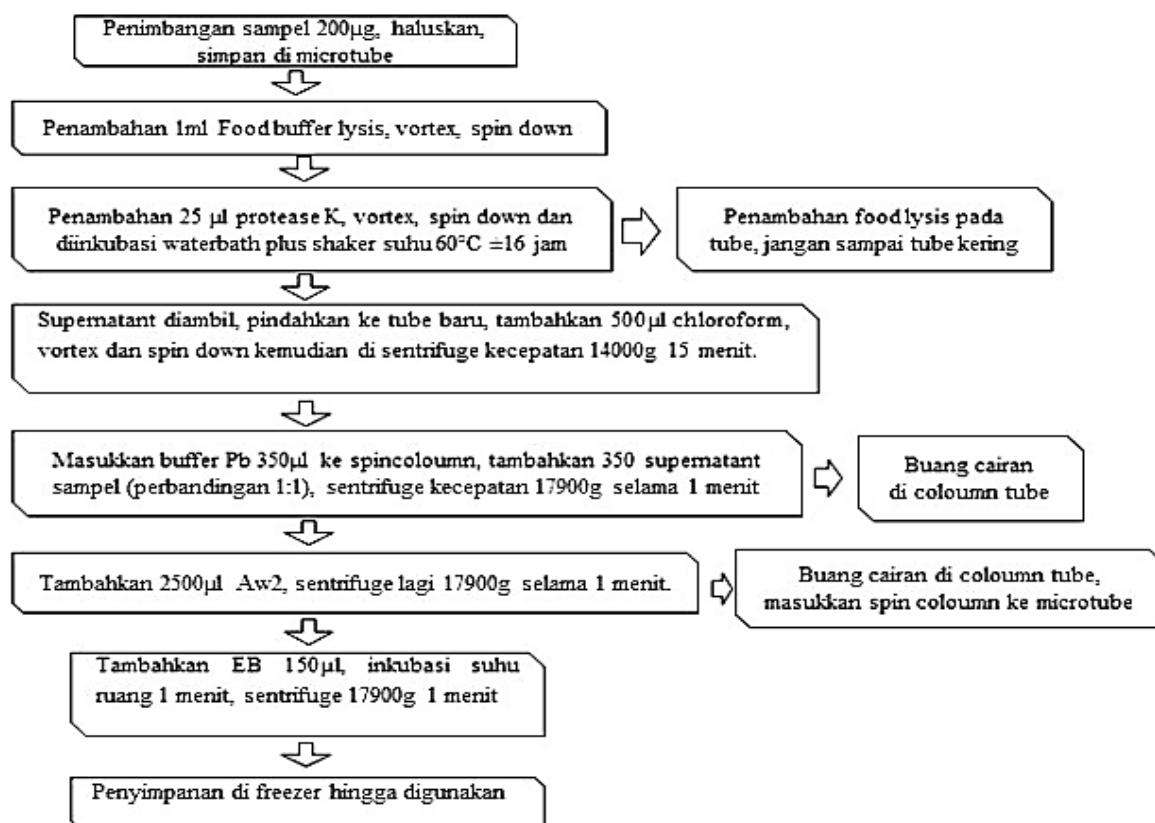
2. Isolasi DNA menggunakan kit Qiagen

Timbang 200µg sampel kemudian tumbuk hingga halus dan masukkan ke microtube. Kemudian tambahkan 1ml Food buffer lysis, di vortex dan di spin down. Tambahkan proteinase K sebanyak 25µl kemudian di inkubasi menggunakan waterbath dan di shaker pada suhu 60°C selama 16 jam. Pada saat di inkubasi, air di dalam microtube kemungkinan akan kering, jadi disiapkan food buffer lysis untuk ditambahkan ke dalam tube (jangan sampai kering).

Setelah inkubasi selama 16 jam tersebut, sampel di sentrifuge dengan 2500g selama 5 menit. Kemudian supernatant diambil pelan-pelan, pindahkan ke tube baru dan tambahkan 500µl chloroform kemudian di vortex dan spin down dan di sentrifuge lagi dengan kecepatan 14000g selama 15 menit.

Masukkan buffer Pb 350µl ke spin column dan tambahkan 350 supernatant sampel yang telah di sentrifuge terakhir (perbandingan 1:1) kemudian di sentrifuge lagi dengan kecepatan 17900g selama 1 menit. Air yang terdapat pada column tube dibuang, satukan lagi column tube dengan spin column dan tambahkan Aw2 sebanyak 2500µl kemudian di sentrifuge lagi dengan kecepatan 17900g selama 1 menit.

Setelah itu, air di column tube dibuang lagi, ambil microtube baru dan disatukan dengan spin column kemudian ditambahkan dengan EB sebanyak 150µl. Inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 17900g selama 1 menit. Kemudian sampel disimpan di freezer hingga digunakan.



Gambar 2. Alur proses isolasi DNA menggunakan kit Qiagen

3. Amplifikasi PCR

Sampel hasil ekstraksi DNA yang digunakan untuk PCR adalah 2 µL. Bahan yang digunakan untuk PCR adalah ddH₂O, DNA polimerase, primer, DNA, dan dNTP. Bahan-bahan ini dicampurkan dalam tabung PCR. Bahan ddH₂O berfungsi untuk melarutkan komponen PCR agar dapat bercampur dengan baik. Primer berfungsi untuk proses penggandaan. Mix yang terdiri dari dNTP berfungsi untuk membantu

proses pembuatan untaian baru serta *Taq polymerase*. Tabung PCR dimasukkan ke dalam *thermocycler*.

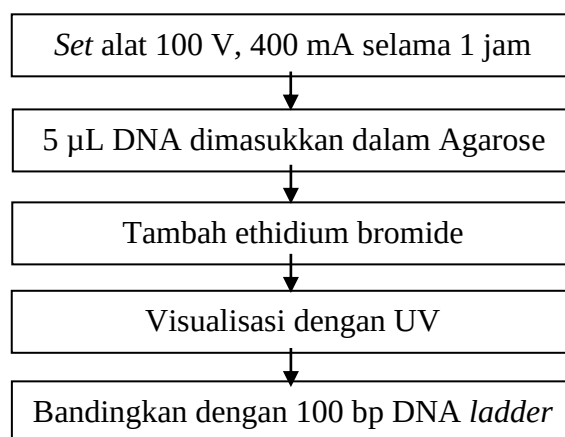
Proses PCR secara garis besar dapat dibagi menjadi lima bagian, yaitu *pre denaturation*, *denaturation*, *annealing*, *extension*, *post extention*, dan *preservation*. Tahap denaturasi merupakan pemutusan untaian ganda menjadi untaian tunggal pada suhu 94 °C agar primer dapat menempel (*annealing*). Primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA untaian tunggal pada suhu 50-55 °C, yang kemudian dapat ditingkatkan menjadi 72 °C selama 80 detik ketika telah menempel untuk proses polimerasi. Proses polimerasi dilakukan pada suhu 72 °C selama 7 menit untuk mendapatkan ribuan salinan DNA. Setelah proses polimerasi, suhu diturunkan menjadi 4°C (penyimpanan suhu dingin). Hasil dari amplifikasi ini biasa disebut dengan produk PCR. Proses PCR dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Tahapan	Keterangan
<i>Pre denaturation</i>	Persiapan denaturasi, suhu diatur 94 °C selama 5 menit
<i>Denaturation</i>	Pemutusan untaian ganda menjadi untaian tunggal (T = 94 °C selama 40 detik)
<i>Annealing</i>	Penempelan primer dan DNA tunggal (T = 50-55 °C)
<i>Extention</i>	persiapan polimerasi (T = 72 °C selama 80 detik)
<i>Post extention</i>	Polimerasi (T = 72 °C selama 7 menit), terdapat jutaan salinan DNA
<i>Preservation</i>	Penyimpanan (T = 4 °C)

4. **Elektroforesis**

Prinsip kerja elektroforesis adalah untuk memisahkan asam nukleat berdasarkan ukuran. Hasil PCR kemudian diidentifikasi menggunakan elektroforesis. Hasil amplifikasi PCR (produk PCR) sebanyak 5 µL dimasukkan ke dalam agarose 1%. Mesin Elektroforesis di-*setting* pada 100 V, 400 mA selama 1 jam. Agarose ditambahkan ethidium bromida untuk memendarkan pita DNA pada waktu penyinaran Ultraviolet. DNA bermuatan negatif, sehingga molekul DNA akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif. DNA yang bermuatan negatif akan ditarik oleh muatan listrik positif, sehingga molekul DNA akan terpisah sesuai dengan ukuran berat molekulnya (Howe 2007). Molekul DNA yang terpisah kemudian divisualisasi menggunakan sinar UV dan akan berpendar karena pewarna yang ditambahkan seperti ethidium bromida. Panjang fragmen dibandingkan pada 100 bp DNA *ladder* sebagai penanda ukuran molekul DNA. Proses elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Proses kerja Elektroforesis (Howe 2007)

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA

Pada penelitian ini dilakukan uji kuantitatif DNA menggunakan Nanodrop. Nanodrop adalah alat yang digunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA dan RNA. Berikut ini adalah hasil dari analisis DNA menggunakan Nanodrop.

Tabel 1 Hasil analisis Nanodrop

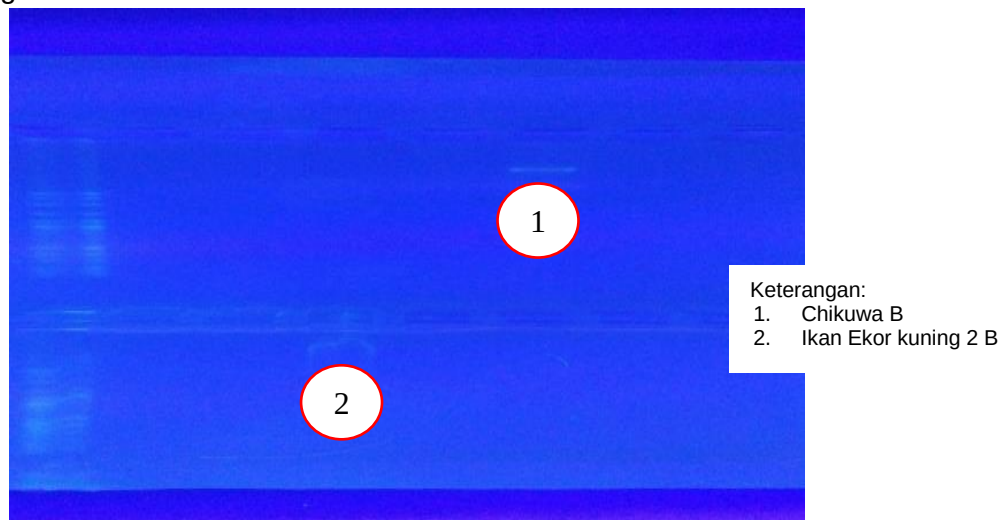
Sampel	260/280	Sampel Type
Chikuwa 1	1,23	DNA
Chikuwa 2	1,24	DNA
Ikan Ekor kuning A 1	2,04	DNA
Ikan Ekor kuning A 2	2,06	DNA
Ikan Ekor kuning B 1	1,61	DNA
Ikan Ekor kuning B 2	1,62	DNA
Bakso 1	1,21	DNA
Bakso 2	1,23	DNA

Dari hasil analisis diatas didapatkan nilai tertinggi pada rasio absorbansi 260/280 yaitu ikan Ekor kuning A sebesar 2,04 dan 2,06 dan chikuwa juga bakso memiliki nilai hampir sama sebesar 1,2. Buku manual untuk nanodrop yang berasal dari Thermo Science Scientific (2015) menyatakan bahwa sampel yang memiliki nilai mendekati 1,80 pada rasio absorbansi 260/280 merupakan sampel DNA yang murni dan sampel yang mendekati nilai 2,00 pada rasio 260/230 merupakan sampel yang memiliki RNA murni. Rasio OD260/OD280 kurang dari 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi berupa fenol atau protein pada hasil ekstraksi (Devereux dan Wilkinson 2004), sedangkan jika rasio OD260/OD280 lebih dari 2,0 menjelaskan bahwa DNA terkontaminasi RNA (Khosravinia *et al.* 2007). Hasil isolasi sampel bakso dan chikuwa menunjukkan masih adanya kontaminasi berupa protein, hal ini diduga pada tahap

presipitasi dengan kloroform kurang maksimal. Kloroform sendiri berfungsi untuk membersihkan protein serta molekul lainnya (polisakarida), sehingga DNA yang diperoleh bebas kontaminasi. Masih terdapatnya kontaminasi RNA pada sampel ikan ekor kuning A disebabkan oleh pada tahap isolasi tidak ditambahkannya enzim RNase, sehingga RNA tidak terdegradasi.

Konsentrasi DNA hasil isolasi yang diperoleh bervariasi, hal ini disebabkan oleh sampel yang diisolasi berasal dari sumber yang berbeda (ikan ekor kuning segar utuh dan produk olahan bakso dan chikuwa). Kandungan bahan campuran yang terdapat dalam produk juga dapat mempengaruhi konsentrasi DNA yang diperoleh. Penambahan bumbu-bumbu, tepung, lemak dan bahan lain dalam produk olahan menyebabkan DNA yang diisolasi masih tercampur dengan senyawa kontaminan seperti oligopeptida, polisakarida, protein dan bahan-bahan organik lainnya (Nuraini 2004). Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa sampel yang memiliki DNA yang baik adalah sampel ikan Ekor kuning.

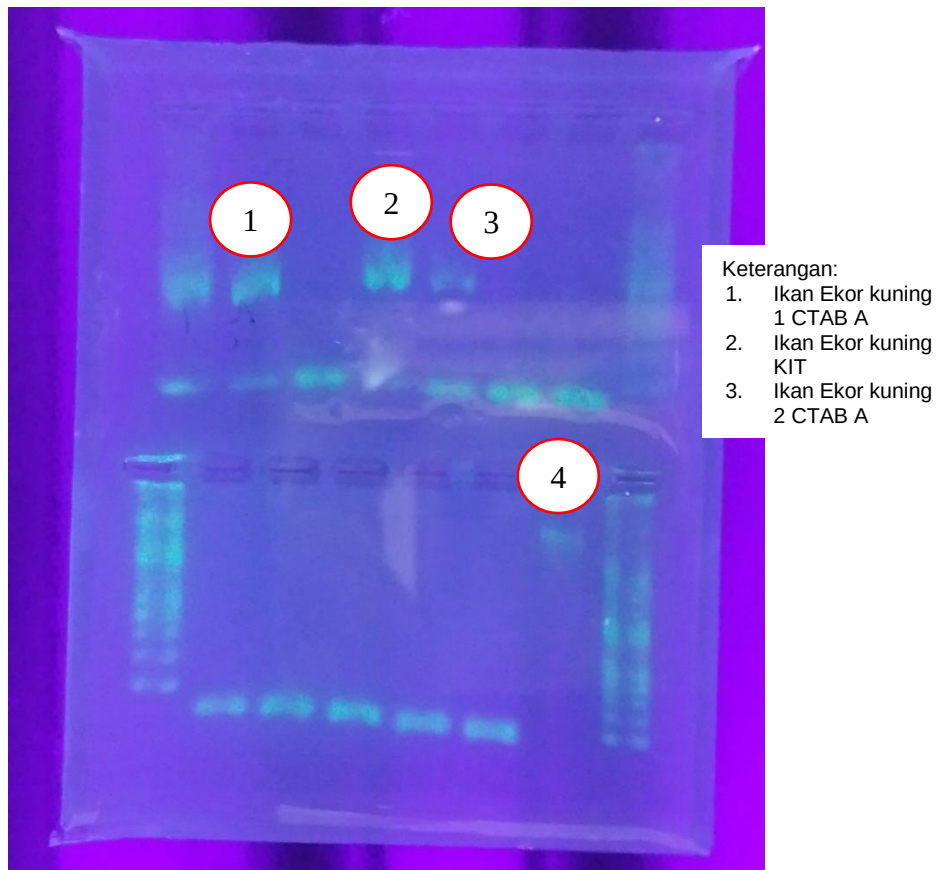
Sampel kemudian diuji kualitatif menggunakan elektroforesis horizontal. Hasilnya adalah sebagai berikut:



Gambar 1 Hasil uji kualitatif Kit Qiagen menggunakan elektroforesis

2. Uji kualitatif pada hasil PCR DNA

Hasil uji kualitatif pada hasil PCR DNA dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil menunjukkan bahwa pita DNA hasil elektroforesis yang muncul adalah DNA yang berasal dari Ikan ekor kuning. DNA dari produk perikanan berupa bakso dan chikuwa tidak terlihat/tidak muncul. Hal ini dapat terjadi karena kontaminan berupa material genetik dari bahan tambahan lain pada sampel produk bakso dan chikuwa lebih banyak daripada sampel ikan ekor kuning segar. Hal ini diduga dikarenakan produk tersebut telah diberi bahan tambahan, seperti tepung dan bahan tambahan lainnya (Bestor 2001), sedangkan pada produk ikan ekor kuning segar, kemungkinan untuk terkontaminasi DNA dari organisme lain sangat kecil. Hasil PCR ini sebanding dengan hasil nanodrop yaitu DNA ikan yang memiliki tingkat kemurnian tertinggi dibandingkan dengan produk perikanan.



Gambar 2 Hasil uji kualitatif CTAB menggunakan elektroforesis

3. Perbandingan Metode Isolasi DNA

Isolasi DNA pada produk olahan chikuwa dengan menggunakan beberapa metode isolasi DNA menu hasil yang berbeda. Dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Metode Isolasi DNA

Metode	Waktu	Biaya	Kemurnian DNA
Kit Qiagen	++	+	+
CTAB	+	++	++

Keterangan :

+ : kurang baik

++ : baik

Berdasarkan tabel 2. metode isolasi DNA CTAB merupakan metode yang paling sensitif karena menghasilkan kemurnian DNA terbaik namun metode ini kurang efektif dalam segi waktu dan pengerjaannya, sedangkan metode Kit Qiagen merupakan metode yang paling cepat dan mudah. Metode CTAB yang digunakan terbukti dapat menghasilkan ekstrak DNA yang baik. Hasil ini juga didapatkan oleh Chapela et al. (2007) yang mengekstrak DNA dari sampel tuna kaleng dengan berbagai metode ekstraksi, yaitu Wizard DNA Clean Up, Nucleospin (Clontech), GenomicPrep (Amersham Pharmacia Biotech) dan metode presipitasi CTAB. Ekstrak DNA terbaik diperoleh dengan metode CTAB.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan hasil uji kuantitas chikuwa nano drop mendapatkan hasil kurang baik dibawah 1,80. Hasil uji kualitas chikuwa kit Qiagen menggunakan elektroforesis horizontal memperlihatkan pita dna walaupun sedikit. Hasil uji kualitas chikuwa CTAB hasil pcr menggunakan elektroforesis horizontal tidak terlihat adanya pita dna. Metode Isolasi DNA CTAB merupakan metode yang paling sensitif karena menghasilkan kemurnian DNA terbaik, sedangkan metode Kit Qiagen merupakan metode yang paling cepat dan mudah.

DAFTAR PUSTAKA

- [UNCLOS] United Nations Convention on the Law of the Sea. The law of sea treaty. www.unlawoftheseatreaty.org/ (16 Maret 2017)
- Armani A, Guardone L, Castellana, Gianfaldoni D, Guidi A, Castigliengo L. 2015. DNA barcoding reveals commercial and health issues in ethnic seafood sold on the italian market. *Food Control*, 55:206-214.
- David G. Watson. 2009. *Analisis Farmasi*. EGC. Jakarta
- Devereux R, Wilkinson SS. 2004. *Amplification of Ribosomal RNA Sequences*. Kluwer Academic Publisher. Netherlands.
- Fatchiyah, Rahayu S, Arumingtyas EL. 2011. Isolasi DNA. Di dalam : Fatchiyah, Arumingtyas EL, Widyarti S, Rahayu S. Biologi Molekular-Prinsip Dasar Analisis. Jakarta (ID): Erlangga. hlm 21-32.
- John dan Rachmawati. 2011. Chemistry 3A. Erlangga. Jakarta
- Khopkar, S. M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. UI-Press. Jakarta
- Khosravinia H, Murthy HNN, Parasad DT, Pirany N. 2007. Optimizing Factors Influencing DNA Extraction from Fresh Whole Avian Blood. *African Journal of Biotechnology*. 6(4): 481-486.
- Martin, R. 1996. *Gel electrophoresis: nucleic acids*. Bios scientific Publisher, Oxford
- Nuraini H. 2004. Pengembangan Sekuen *Procine Repetitive Element-1* (PRE-1) sebagai Penanda Molekuler untuk Mendeteksi Material Babi pada Produk Daging Olahan. [Tesis]. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor. 117 hlm.
- Palyoga H. 2012. Isolasi DNA, amplifikasi DNA dengan PCR, uji polimerisme dengan teknik RLFP dan elektroforesis gel poliakrilamid. <http://www.dokter-hewan.net> (03 April 2017)
- Thermo Scientific. 2015. Technical Bulletin. <http://www.nanodrop.com> (14 Maret 2017)
- Zhang JB, Hanner R. 2011. DNA Barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39:31-42.