

DAFTAR ISI

HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
PERNYATAAN	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
INTISARI	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Penelitian	1
B. Rumusan Masalah	4
D. Manfaat Penelitian.....	6
E. Tujuan Penelitian.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
A. Telaah Pustaka.....	9
1. Monyet ekor panjang (<i>Macaca fascicularis</i>) dan metode deteksi dalam olahan makanan.....	9
2. Uji kuantitatif DNA	10
3. Perancangan primer	12
4. <i>Real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR)</i>	18
5. Pelacak EvaGreen®.....	22
6. <i>Melting Curve Analysis (MCA)</i>	24
7. Validasi metode <i>real-time PCR</i>	25
8. Sekuensing DNA produk PCR	27
B. Landasan Teori	31
C. Kerangka Konsep Penelitian	33
D. Hipotesis.....	33
BAB III METODE PENELITIAN	35
A. Rancangan Penelitian	35

B.	Tempat dan Waktu Penelitian	35
C.	Bahan dan Subyek penelitian	35
D.	Variabel Penelitian	36
E.	Definisi Operasional Variabel	36
F.	Instrumen Penelitian.....	37
G.	Jalannya Penelitian	37
	1. Pengumpulan sampel.....	37
	2. Penyiapan sampel	38
	3. Penyiapan sampel bakso (Purnomo dan Rahardiyana, 2008)	38
	4. Ekstraksi DNA sampel (Sambrook dan Russell, 1989).....	39
	5. Perancangan primer	42
	6. Optimasi program suhu <i>annealing</i> primer.....	44
	7. Validasi metode <i>real-time</i> PCR.....	44
	8. Purifikasi Hasil <i>Real-time</i> PCR	46
	9. Kloning fragmen DNA ampikon	48
	10. Sekuensing produk <i>real-time</i> PCR.....	51
	11. Identifikasi DNA daging monyet pada sampel bakso pasaran 52	
H.	Analisis Data	53
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN		56
A.	Ekstraksi DNA Daging 7 Spesies dan Bakso Daging Monyet.....	56
B.	Analisis Kualitatif dan Kuantitatif DNAt.....	60
C.	Desain Primer	65
D.	Validasi Primer <i>real-time</i> PCR	70
	1. Verifikasi primer <i>in-silico</i>	70
	2. Optimasi program suhu <i>annealing</i> primer D-loop F4 dan R4.....	71
	3. Uji spesifitas primer	76
	4. Efisiensi amplifikasi dan linearitas metode <i>real-time</i> PCR.....	79
	5. Uji batas deteksi	83
	6. Keterulangan metode.....	86
E.	Konfirmasi Ampikon dengan Sekuensing	87
F.	Analisis Produk Bakso Pasaran.....	97
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN		100

DAFTAR PUSTAKA	101
LAMPIRAN.....	109

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Diagram skematis dari prosedur yang digunakan untuk mendesain dan validasi primer untuk protokol <i>real-time</i> PCR.....	13
Gambar 2. Skema marker gen pada mitokondrial DNA dan aplikasinya sebagai daerah target untuk mengidentifikasi spesies dalam produk makanan	14
Gambar 3. Siklus pertama amplifikasi pada PCR.....	19
Gambar 4. Diagram skematik data real-time PCR dari 3 sampel yang tidak diketahui).....	21
Gambar 5. Diagram skematik menunjukkan bagaimana EvaGreen® beraksi sebagai fluoresensi yang spesifik pada DNA untai ganda	23
Gambar 6. Kurva analisis <i>melting curve</i> 3 amplikon yang berbeda panjang basa	25
Gambar 7. Syarat spesifisitas untuk DNA polimerase.....	27
Gambar 8. Diagram menunjukkan <i>chain termination</i> dengan dideoksitimidin trifosfat (ddTTP)	28
Gambar 9. Prinsip metode <i>chain-terminating</i> pada Sanger Dideoksi Nukleotida (Sanger, 2004)	30
Gambar 10. Hasil Elektroforesis terhadap hasil isolat DNA monyet segar.....	61
Gambar 11. Elektroferogram hasil isolat DNA bakso referensi dengan % konsentrasi daging monyet : sapi (100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 10:90, 5:95, 1:99, 0:100)	62
Gambar 12. Elektroferogram hasil isolat DNA bakso pasaran dari 12 lokasi di Yogyakarta	62
Gambar 13. Posisi urutan nukleotida primer D-loop F4 dan R4 pada gen D-loop mtDNA <i>M. fascicularis</i> FJ906803.1	68
Gambar 14. Hasil amplifikasi optimasi suhu <i>annealing</i> (T_a) 52,0-59,6 °C.....	74
Gambar 15. Hasil amplifikasi optimasi suhu pada suhu 55,5 – 56,1°C.....	76
Gambar 16. Kurva <i>Melt Peak</i> produk amplifikasi dari isolat daging monyet terhadap 6 spesies lainnya pada $T_a = 55,5^\circ\text{C}$	78
Gambar 17. Kurva baku DNA monyet murni pada 8 kadar pengenceran bertingkat 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; dan 0,39 ng	80
Gambar 18. Kurva baku DNA bakso monyet 100% dengan 6 kadar pengenceran bertingkat 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; dan 0,78 ng	81
Gambar 19. Batas deteksi DNA monyet murni 1 ng – 0,0078 ng.	84
Gambar 20. Batas deteksi DNA bakso referensi dengan persentase daging monyet dalam bakso sapi 0, 1, 5, 10, dan 25%	86
Gambar 21. Elektroferogram hasil purifikasi produk amplifikasi <i>real-time</i> PCR	89
Gambar 22. Elektroferogram plasmid hasil transformasi amplikon D-loop menggunakan DNA marker 0,25 kb	91
Gambar 23. Elektroferogram amplikon <i>real-time</i> PCR dengan cetakan DNA hasil kloning menggunakan DNA marker 50 pb (M)	92
Gambar 24. Urutan DNA plasmid hasil sekuensing	93

Gambar 25. Urutan fragmen 96 pb D-loop DNA hasil pensejajaran.....	95
Gambar 26. Hasil pensejajaran basa hasil sekuensing dengan <i>software</i> CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8).....	96
Gambar 27. Identifikasi DNA bakso pasaran dengan primer F4 dan R4 gen D-loop	98
Gambar 28. Deteksi DNA bakso pasaran dengan primer sapi (gen rRNA-12s mtDNA) (<i>Bos taurus</i>).....	99

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Studi PCR untuk analisis DNA monyet.....	5
Tabel 2. Konsentrasi DNA untai-tunggal, DNA untai-ganda dan RNA untai-tunggal pada λ 260 nm.....	11
Tabel 3. Syarat <i>default</i> untuk desain primer pada <i>real-time PCR</i>	16
Tabel 4. Formulasi sampel bakso referensi dengan daging monyet dengan daging sapi.....	39
Tabel 5. Komponen reaksi tahap Ligasi DNA.....	48
Tabel 6. Konsentrasi dan kemurnian isolat DNA daging segar.....	64
Tabel 7. Konsentrasi dan kemurnian isolat DNA bakso daging sapi-monyet.....	64
Tabel 8. Konsentrasi dan kemurnian isolat DNA bakso pasaran.....	64
Tabel 9. Hasil desain primer dengan <i>online software</i>	66
Tabel 10. Perolehan <i>annealing temperature</i> (T_a) primer D-loop F4 dan R4 dengan <i>software</i> Thermofischer.....	72
Tabel 11. Campuran reaksi <i>real-time PCR</i> menggunakan SsoFast TM EvaGreen® Supermix.....	73
Tabel 12. Protokol <i>real-time PCR</i> dengan primer D-loop F4 dan R4.....	77
Tabel 13. Perbandingan hasil sensitifitas terhadap DNA daging monyet.....	85
Tabel 14. Data uji keterulangan metode terhadap DNA daging monyet.....	87

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer NanoVue™ .	110
Lampiran 2. <i>Macaca fascicularis</i> D-loop mtDNA gen bank NCBI	114
Lampiran 3. Hasil OligoAnalyzer 3.1 terhadap primer D-loop F4 dan R4	115
Lampiran 4. BLAST Primer D-loop F4 dan R4 terhadap 6 spesies (<i>Canis lupus</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Capra hircus</i> , <i>Sus scrofa</i> , <i>Bos taurus</i> , dan <i>Macaca fascicularis</i>)	116
Lampiran 5. Hasil BLASTn primer D-loop F4 dan R4 terhadap <i>M. fascicularis</i>	117
Lampiran 6. Protokol <i>real-time</i> PCR untuk optimasi suhu <i>annealing</i> primer D-loop F4 dan R4 terhadap isolat DNA daging monyet.....	118
Lampiran 7. Data hasil amplifikasi dan <i>melt peak</i> pada optimasi suhu <i>annealing</i> primer D-loop F4 dan R4 terhadap isolat DNA daging monyet....	120
Lampiran 8. Data kurva amplifikasi pada pembuatan kurva baku dan uji efisiensi daging monyet dan bakso monyet 100%	122
Lampiran 9. Data kurva amplifikasi penetapan batas deteksi daging monyet dan bakso monyet 100%	123
Lampiran 10. Hasil kloning dengan vektor P-GemT ke dalam bakteri <i>E. Coli</i> ..	124
Lampiran 11. Hasil sekuensing dibaca dengan MEGA 7	125