

DETEKSI GELATIN BABI PADA SOFT CANDY MENGGUNAKAN METODE PCR-RFLP SEBAGAI SALAH SATU PEMBUKTIAN KEHALALAN PANGAN

Detection of Porcine Gelatin on Soft Candy Using PCR-RFLP Method as One of Halal Authentication

Fadhlurrahman^{1*}, Agustin Krisna Wardani¹, dan Endrika Widyastuti¹

¹Jurusan Teknologi Hasil Pertanian – Fakultas Teknologi Pertanian -Universitas Brawijaya
Jl. Veteran – Malang 65145

Penulis Korespondensi: email: fadhlur.foodtech@gmail.com; wardani8@yahoo.com

ABSTRAK

Gelatin merupakan salah satu bahan tambahan pangan yang banyak digunakan dalam pembuatan *soft candy* sebagai agen pembentuk gel. Namun, gelatin yang digunakan masih diragukan kehalalannya dikarenakan lebih dari 40% produksi gelatin menggunakan komponen babi sebagai bahan baku. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gelatin babi pada *softcandy* menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang disempurnakan dengan metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak sepuluh jenis *soft candy* yang dilakukan proses ekstraksi DNA terlebih dahulu sebelum dilakukan metode deteksi PCR-RFLP. Proses PCR menggunakan primer yaitu Cyt B (*Cytochrome B*) yang akan mengamplifikasi DNA homolog babi. Sampel yang berhasil teramplifikasi dilanjutkan dengan proses RFLP menggunakan enzim BseD1 untuk membedakan antara DNA babi dengan DNA homolognya. Hasil penelitian ini didapatkan bahwa suhu optimum dari proses annealing PCR sebesar 49 °C, tujuh dari sepuluh sampel berhasil diamplifikasi dengan ukuran DNA sebesar 359 bp (*base pair*), sedangkan tiga sampel tidak berhasil diamplifikasi karena kurang tepatnya proses isolasi yang dilakukan. Tiap sampel tidak menunjukkan adanya fragmentasi DNA dengan ukuran 228 bp dan 131 bp saat dilakukannya proses RFLP. Hal tersebut menunjukkan bahwa tujuh dari sepuluh sampel tidak mengandung gelatin babi dan tiga sampel yang tidak berhasil diamplifikasi perlu dilakukan proses ekstraksi ulang dengan menggunakan metode lain yang lebih tepat.

Kata kunci : Gelatin, PCR, RFLP, *Soft Candy*

ABSTRACT

Gelatin is one of common food additives used in the production of soft candy as a gelling agents. However, the status halal of the gelatin is still unclear as more than 40% percent of worldwide gelatin production used pig and its derivative. The purpose of the research is to detect the presence of pig gelatin in soft candy using PCR (Polymerase Chain Reaction) which is enhanced by the method of RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). The sample used in this study were ten different type of soft candy that firstly conducted by using DNA extraction process prior to the detection of PCR-RFLP method. PCR using primers Cyt B (Cytochrome B) which will amplify homologous pig DNA. The samples were successfully amplified followed by RFLP using the enzyme BseD1 process to distinguish between swine DNA with DNA homologs. Results revealed that the optimum temperature of the PCR annealing at 49 °C, seven out of ten samples successfully amplified with DNA size of 359 bp (base pair), while three samples did not successfully amplified because the unsuitable isolation process. Each sample did not show any DNA fragmentation with the size of 228 bp and 131 bp time of the RFLP process. It shows that seven out of ten samples do not contain pork gelatin and three samples were not successfully amplified, therefore it is necessary to repeat the extraction by using another more precise method.

Key words: Gelatin, PCR, RFLP, *Soft Candy*

PENDAHULUAN

Soft candy merupakan kembang gula yang bertekstur lunak, yang diproses dengan penambahan komponen hidrokoloid seperti agar, gum, pektin, pati, karagenan, gelatin dan lain-lain (Suprianto, 2007). Gelatin merupakan gelling agent karena kemampuannya membentuk gel, memadat, dan menstabilkan. Gelatin juga umum digunakan sebagai agen pengikat dan pelapis pada bermacam-macam produk pangan seperti marshmallows, gummies, daging dan lain-lain (Cai *et al.*, 2012). Gelatin yang beredar di pasaran didapatkan dari bahan baku mamalia seperti kulit babi sebanyak 46% dari produksi gelatin dunia, diikuti dengan kulit sapi sebanyak 29.4%, dari tulang sapi sebesar 23.1%, dan dari sumber lain sebesar 1.5% yang berasal dari produk perikanan (Karim dan Bath, 2009). Adanya kandungan babi pada *soft candy* menjadi suatu masalah dikarenakan adanya konsumen yang beragama Islam yang tidak diperbolehkan untuk mengonsumsi babi dan turunannya berdasarkan hukum halal. Suatu metode deteksi diperlukan untuk mengetahui keberadaan gelatin babi pada *soft candy*.

Salah satu jenis metode pendeteksian yang umum dilakukan dalam mendeteksi komponen babi dan turunannya adalah metode berbasis DNA yaitu PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Metode berbasis amplifikasi DNA memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode lain (Che Man, 2007). Pengujian PCR telah banyak dilakukan oleh peneliti sebelumnya, seperti penelitian Ilhak dan Arslan (2007) mengidentifikasi spesies beberapa daging dengan metode PCR, Tanabe dan Miyauchi (2007) mendeteksi kandungan babi tersembunyi pada produk makanan, Cai *et al* (2012) mendeteksi dan menghitung jumlah kandungan gelatin babi dan gelatin sapi pada campuran gelatin menggunakan metode RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*), dan Sahilah *et al.* (2012) menggunakan PCR dengan kombinasi *Southern Hybridization* untuk mendeteksi kandungan babi ada kapsul gel yang beredar di pasaran.

Metode PCR dalam penelitian ini menggunakan primer cytochrome b (cyt b) yang mampu mengamplifikasi DNA babi dan turunannya. Cytochrome b juga mampu diaplikasikan pada sampel yang telah mengalami pemanasan. Menurut Pascoal *et al.*

(2004), penggunaan cyt b pada metode PCR memiliki kelemahan yaitu adanya kemungkinan primer cyt b mengamplifikasi DNA yang memiliki homologi dengan DNA babi, seperti sapi, dan ayam, sehingga dibutuhkan metode tambahan yang mampu meningkatkan akurasi dan spesifisitas dalam mendeteksi gelatin babi. Salah satu metode yang mampu meningkatkan sensitivitas dan spesifikasi dari hasil PCR adalah metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Metode RFLP memanfaatkan enzim restriksi yang akan membedakan antara DNA babi dengan DNA homolog babi berdasarkan sisi restriksi dari enzim yang digunakan. Enzim restriksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim BseD1 yang memiliki sisi restriksi antara basa nukleotida 228 dan 229. Tujuan dari penggunaan enzim restriksi adalah untuk memotong hasil amplifikasi PCR sehingga sekuen yang dihasilkan lebih spesifik dan mewakili spesies tertentu (Rasmussen, 2012).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel berupa *soft candy* dengan berbagai jenis (marshmallow, chewing gum, jelly candy) sebanyak 10 buah yang diperoleh dari Toko Avia dan Alfamart. Bahan kimia yang digunakan adalah Asam fosfat 85% (RRC), Tris-base (vivantis), Na-EDTA (Phytotech), NaCl (Merck), SDS (1610301), fenol (Smart Lab), Kloroform (Smart Lab), Isoamil alkohol (Merck), Na-asetat (RRC), O steril (lokal), agarosa (Merck), Ethidium Bromida (H5041), marker Ladder 100 kb (Thermoscientific), dan Loading dye (Thermoscientific), Go Taq Green (Promega), oligonukleotida primer sitokrom b dengan urutan basa primer forward (CYT b1) 5' -CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3' dan primer reverse (CYT b2) 5' -GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA- 3' (AHMBiotech Indonesia), Enzim BseD1 (Thermoscientific), Proteinase-K (promega), Nuclease free water (Promega).

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah mesin PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700), Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer), mesin Elektroforesis (Bio-Rad), transilluminator,

autoklaf (TOMY ES-315), pH meter (trans Instrument), timbangan analitik (Ohaus), kulkas (Toshiba), Kompor listrik (Maspion S-300), vortex (LW Scientific, GSA MX-S dan Maximix), sentrifugator dingin (Hettich Zentrifugen), shaker waterbath (Lokal), mikropipet (Eppendorf).

Metode

Isolasi DNA

Proses isolasi merupakan modifikasi yang merujuk pada penelitian Ilhak dan Arslan (2007) dan Erwanto *et al.* (2014). DNA pada sampel dipisahkan terlebih dahulu dengan komponen-komponen non DNA yang terdiri dari beberapa tahap. Awalnya sampel ditimbang sebesar 10 gram dan dilarutkan dalam aquades sebanyak 100 ml. Sampel yang sudah dilarutkan kemudian dipanaskan sehingga terlarut secara sempurna. Sebanyak 500 µl sampel dimasukkan pada mikrotube 1.5 ml dengan penambahan proteinase-K sebanyak 3 µl dan TE Buffer 750 µl (Tris-EDTA pH 8 dan SDS 1% (v/v)). Mikrotube yang berisi sampel kemudian diinkubasi pada waterbath dengan suhu 55 °C selama 16 jam. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 32.869 x g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Hasil sentrifugasi kemudian dipisahkan antara supernatan dengan pellet yang terbentuk.

Supernatan yang didapatkan kemudian dipindahkan pada mikrotube baru dan ditambahkan 20 µl NaCl 5 M. Dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 32689 x g selama 10 menit untuk kemudian dipisahkan antara supernatan dengan pellet yang terbentuk. Supernatan kemudian diukur volumenya. Supernatan dipindahkan kembali pada mikrotube baru dan ditambahkan fenol:kloroform: Isoamil alkohol (P:C:I) dengan perbandingan 25:24:1

sebanyak volume sampel yang ada. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14000 RPM selama 10 menit. Kemudian akan terbentuk 3 lapisan. Lapisan atas dipisahkan dengan lapisan lainnya. DNA dalam keadaan kemurnian rendah terdapat pada lapisan paling atas. Sampel DNA yang didapat kemudian diukur volumenya. Sampel dipindahkan lagi pada mikrotube baru dengan penambahan kloroform sebanyak volume sampel yang ada. Sampel kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14000 RPM selama 10 menit. Setelah disentrifugasi, supernatan diambil dan diukur volumenya. Perlakuan penambahan fenol:kloroform: Isoamil Alkohol (25:24:1) serta kloroform diulang sebanyak 3 kali sehingga kemurnian DNA yang didapat tinggi.

Sampel DNA yang didapat ditambahkan etanol absolut sebanyak 2 kali volume sampel dan Na asetat 3 M dengan pH 7 sebanyak 1/10 volume. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14000 RPM selama 10 menit. Setelah sentrifugasi, pisahkan supernatan dan pellet yang terbentuk. Pellet yang tersisa pada mikrotube kemudian ditambahkan 500 µl Etanol 70%. Campuran pellet dan etanol kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14000 RPM selama 10 menit. Pellet kemudian dipisahkan dengan alkohol dan dilanjutkan pengeringan pellet pada suhu ruang. Pellet kemudian ditambahkan TE Buffer sebanyak 50 µl dan disimpan dalam freezer dengan suhu -20 °C. DNA dari tiap sampel kemudian dilakukan pengujian kemurnian dan konsentrasi menggunakan alat nanodrop spektrofotometri.

Amplifikasi DNA menggunakan metode PCR

Proses Amplifikasi DNA merupakan modifikasi yang merujuk pada penelitian Tanabe (2007) dan Erwanto *et al.* (2014).

Tabel 1. Formulasi PCR

Komponen	Volume 1x reaksi PCR (µl)
Master Mix Go Taq Green (Promega) campuran antara enzim Taq polymerase, buffer Taq, MgSO ₄ , dan dNTP 12,5	12.5
Primer forward (10 µM)	1
Primer reverse (10 µM)	1
DNA template	2
ddH ₂ O	8.5
Total volume	25

Proses amplifikasi DNA dengan PCR diawali dengan persiapan campuran sampel dengan jumlah volume sebanyak 25 µl yang tertera pada Tabel 1. Campuran sampel kemudian dimasukkan pada *thin wall* dalam keadaan tertutup dan kemudian diletakkan pada mesin PCR. Mesin PCR kemudian di atur suhu dan waktu dari masing-masing tahap (denaturasi, penempelan, dan elongasi). Suhu yang ditentukan berdasarkan primer yang digunakan. Pada penelitian ini, tahap pre-denaturasi diatur pada suhu 94 °C selama 2 menit. Dilanjutkan dengan tahap denaturasi yang diatur pada suhu yang sama dengan sebelumnya selama 36 detik. Tahap Annealing diatur pada suhu 51 °C selama 73 detik. Tahap Extension dibagi menjadi bagian awal dengan pengaturan 72 °C selama 84 detik dan bagian akhir (final) dengan pengaturan 72 °C selama 3 menit. Proses PCR ini diatur sebanyak 35 siklus. Tahap penyimpanan diatur pada suhu 4 °C selama 5 menit. Setelah setiap tahap telah diatur suhu dan waktunya, tekan tombol PCR untuk memulai proses amplifikasi dan tunggu hingga mesin PCR selesai beroperasi. Konfirmasi hasil amplifikasi PCR menggunakan metode elektroforesis.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Untuk melanjutkan pada metode RFLP, hasil amplifikasi PCR sebanyak 10 µl kemudian diberikan penambahan enzim restriksi BseD1 sebanyak 2 unit/ µl dan larutan pemecah sebanyak 20 µl yang mengandung 1 x reaction buffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA, 1 mM DTT dan 50% glycerol). Campuran sampel dengan bahan lainnya diinkubasi pada suhu 55 °C selama 3 jam. Konfirmasi hasil RFLP menggunakan metode elektroforesis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemurnian Isolat DNA

DNA dari tiap sampel maupun kontrol yang dianalisa menghasilkan kemurnian dan konsentrasi seperti yang tertera pada Tabel 2. Konsentrasi yang didapatkan berkisar antara 13.35 hingga 263 ng/µl dan kemurnian berkisar antara 1.15 hingga 1.76. Menurut Brown (2010), nilai kemurnian DNA yang didapat menggunakan nanodrop spektrofotometri berada dibawah 1.8 menandakan bahwa DNA isolasi masih mengandung kontaminan berupa protein. Sedangkan, nilai kemurnian DNA berada diatas 2.0 menanda-

Tabel 2. Hasil konsentrasi dan kemurnian isolasi DNA pada sampel *soft candy*

Sampel	Konsentrasi (ng/µl)	Kemurnian
K+	246.78	1.74
F1	223.14	1.56
G1	262.99	1.46
C1	36.84	1.48
C2	141.67	1.5
C3	74.81	1.66
C4	23.63	1.57
C5	89.36	1.27
C6	13.35	1.76
C7	19.53	1.45
C8	59.45	1.49
C9	33.98	1.46
C10	178.36	1.15

Keterangan :

K+ = kontrol Positif Daging babi
 F1 = Kontrol Positif Gelatin babi
 G1 = Kontrol Negatif Gelatin Sapi
 C1 - C10 = Sampel *Soft Candy*



Gambar 1. Hasil optimasi suhu annealing PCR pada suhu 49 °C hingga 65 °C

kan bahwa DNA isolasi masih mengandung kontaminan RNA.

Beberapa DNA yang telah diisolasi menghasilkan konsentrasi yang rendah. DNA yang dikatakan baik menurut Erwanto *et al.*, (2014) umumnya memiliki konsentrasi diatas 125 ng/ μ l. Rendahnya konsentrasi yang didapat bisa diakibatkan oleh pengulangan proses pemurnian dengan fenol: kloroform:isoamil alkohol (P:C:I). Menurut Goldenberger *et al.*, (1995) penggunaan P:C:I tidak dianjurkan dalam isolasi DNA dikarenakan fenol dan kloroform merupakan bahan kimia berbahaya bersifat karsinogenik yang dapat mendegradasi DNA. Selain itu, saat proses pemisahan antar fase dalam penggunaan P:C:I membutuhkan ketelitian tinggi karena memungkinkan terjadinya kehilangan DNA. Kandungan P:C:I yang tersisa pada DNA juga dapat menjadi inhibitor pada proses PCR (Goldenberger *et al.*, 1995).

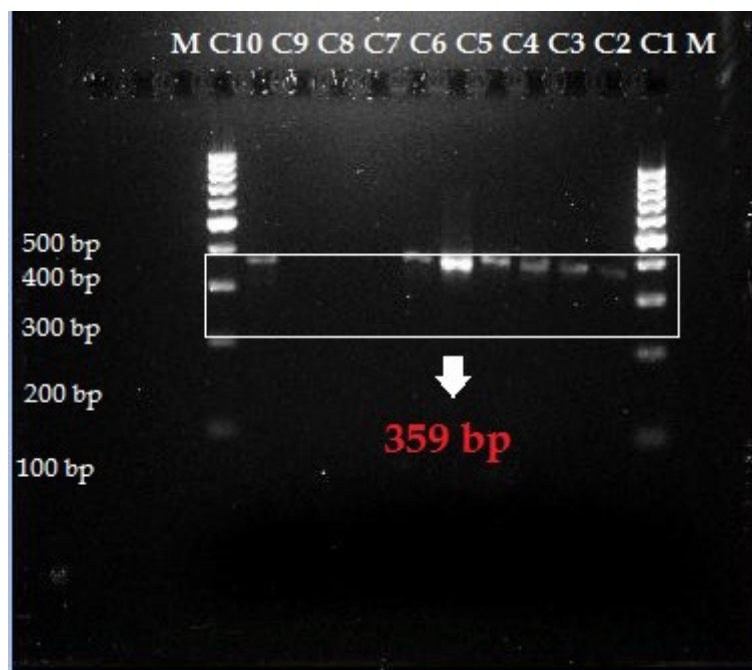
Optimasi Suhu Annealing PCR

Suhu optimasi yang digunakan adalah 49 °C, 41 °C, 53 °C, 57 °C, 59 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C. Dari tiap suhu yang diujikan kemudian dilihat hasil visual yang terbaik. Hasil visualisasi dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil visualisasi terbaik ditunjukkan pada suhu 49 °C dengan kecerahan hasil visualisasi yang paling terang dibanding-

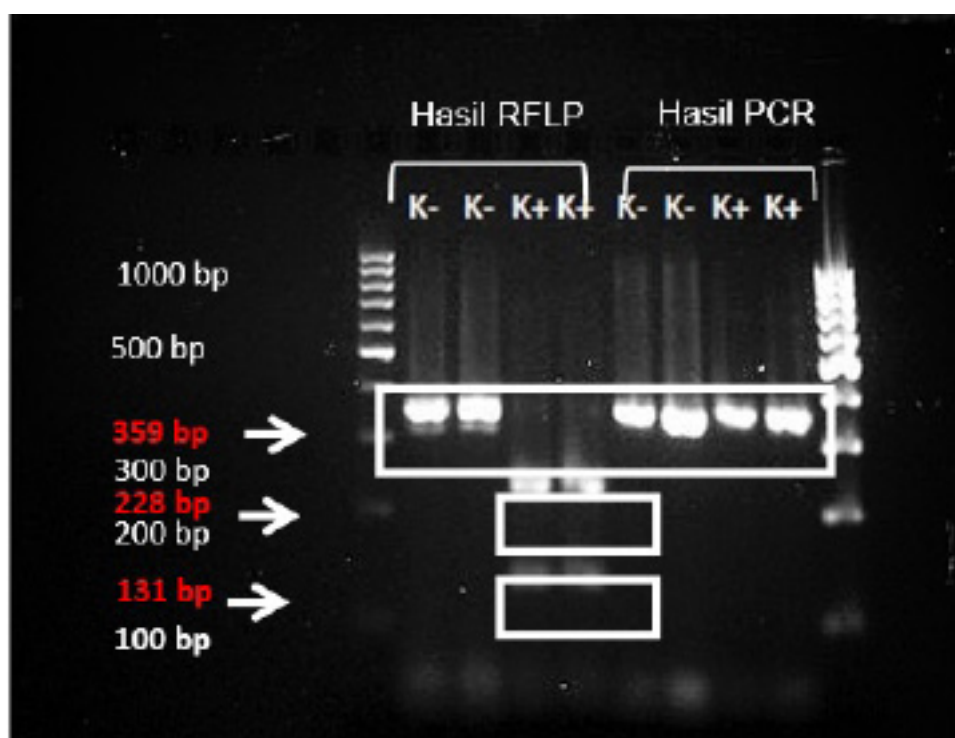
kan pada suhu yang lain. Dalam literatur, Erwanto (2012) berhasil mengamplifikasi gen babi menggunakan primer *cyt b* dengan suhu annealing sebesar 51 °C. Hal tersebut menandakan bahwa suhu yang digunakan pada penelitian ini masih dalam jangkauan yang sama yaitu ± 5 °C dibawah nilai T_m yang didapat.

Amplifikasi DNA sampel menggunakan PCR

Berdasarkan hasil visualisasi pada Gambar 2, dari sepuluh sampel yang diujikan proses PCR menggunakan primer *cyt b* mampu mengamplifikasi DNA babi dan homolognya pada sampel C1, C2, C3, C4, C5, C6, dan C10 dengan ukuran 359 bp. Sampel C7, C8, dan C9 tidak menunjukkan terbentuknya hasil amplifikasi dengan ukuran 359 bp. Proses amplifikasi pada C7-C9 tidak berhasil dikarenakan sifat sampel yang digunakan bersifat lengket sehingga sampel sulit dilarutkan pada saat proses isolasi dan mengakibatkan DNA tidak terekstrak dengan sempurna. Beberapa pre-treatment telah dilakukan untuk mengatasi sifat lengket yaitu dengan melarutkannya pada air hangat (modifikasi Raraswati, 2013), dan membekukannya pada suhu -20°C selama 24 jam (Demirhan, 2011)



Gambar 2. Visualisasi hasil PCR dari tiap sampel *soft candy*, M = Marker 100 bp; C1-C10 = sampel *soft candy*



Gambar 3. Hasil visualisasi proses RFLP pada hasil PCR gelatin babi dan gelatin sapi; K+ : kontrol positif; K- : kontrol negatif

Tabel 3. Modifikasi komposisi proses RFLP pada tiap sampel *soft candy*

Komponen	Volume (µl)
DNA Produk PCR	10
Buffer 1x	9
BseD1 (10 unit/µl)	1

Sumber: Modifikasi Erwanto *et al.*, (2014)

Aplikasi RFLP pada sampel

Metode RFLP pada penelitian ini merujuk metode pada penelitian Erwanto *et al.* (2014). Proses RFLP dilakukan berdasarkan komposisi Tabel 3 diujikan pada kontrol positif dan negatif dengan tujuan untuk mengkonfirmasi dari kemampuan enzim BseD1 dalam membedakan DNA babi dan sapi. Hasil visualisasi pada Gambar 3 membuktikan bahwa enzim BseD1 hanya spesifik memotong pada DNA babi. Enzim BseD1 mampu memotong hasil amplifikasi dari DNA babi dengan menghasilkan sekuen 228 bp dan 131 bp seperti yang dilakukan oleh Erwanto *et al.* (2014) dalam memotong DNA daging babi. Tiap sampel tidak menunjukkan terbentuknya 2 fragmen pada saat dilakukannya proses RFLP menggunakan enzim BseD1. Hal tersebut menandakan bahwa 7 dari sampel yang berhasil diamplifikasi menggunakan PCR tidak mengandung babi dan turunannya. Hasil negatif pada pengujian bahan pangan menggunakan metode PCR-RFLP dengan enzim BseDI juga terjadi pada pendeteksian cemaran babi pada chicken nugget di Indonesia oleh Raharjo *et al.* (2012). Menurutnya, tidak terbentuknya hasil fragmentasi dengan ukuran 228 bp dan 131 bp menunjukkan bahwa sampel tidak mengandung DNA babi dan turunannya.

SIMPULAN

Suhu optimasi Annealing menggunakan primer cyt b didapatkan sebesar 49 °C. Metode PCR-RFLP mampu untuk membedakan antara DNA babi dengan DNA sapi dengan hasil amplifikasi PCR sebesar 359 bp menggunakan primer cyt b dan terbentuknya 2 fragmen DNA pada proses berukuran 228 bp dan 131 bp menggunakan enzim BseD1. Tujuh dari sepuluh sampel yang telah diamplifikasi tidak menunjukkan adanya kandungan gen babi setelah dilakukan penambahan enzim restriksi BseDI sehingga dapat dikatakan bebas dari kandungan babi dan turunannya. Tiga sampel yang tidak berhasil

diampifikasi belum dapat dipastikan mengandung babi atau tidak dikarenakan kurang tepatnya proses isolasi yang dilakukan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Fakultas Teknologi Pertanian dan Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah membiayai penelitian ini melalui program hibah Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) tahun 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T.B. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis*. Wiley & sons Publisher, Chichester
- Che Man, Y.B., Aida, A.A., Raha, A.R., and Son, R. 2007. Identification of Pork Derivates in Food Products by Species-Specific Polymerase Chain Reaction (PCR) For Halal Verification. *Journal of Food Control*. 18:885-889
- Cai, H, Gu, X, Scnalan, M. S, Ramatlapeng, D. H dan Lively, C. R. 2012. Real Time-PCR Assays for Detection and Quantitation of Porcine and Bovine DNA in Gelatin Mixtures in Gelatin Capsule. *Journal of food composition an analysis*. 25: 83-87
- Demirhan, Y, Ulka, P, and Senyuwa, H. Z. 2011. Detection of Porcine DNA in Gelatin and Gelatine-Containing Processed Food Products-Halal/Kosher Aunthentication. *Meat Science*. 90: 686-689
- Erwanto, Y, Sugiyono, Rohman, A, Abidin, and M. Z, Ariyani, D. 2012. Identifikasi Daging Babi Menggunakan Metode PCR-RFLP Gen Cytochrome b dan PCR Primer Spesifik Gen Amelogenin. *Jurnal Agritech*. 32(4):370-377
- Erwanto, Y, Sugiyono, Rohman, A, Abidin, M. Z, and Muslim, E. Y. P. 2014. Identification of Pork Contaminant in Meatballs of Indonesia Local Market Using

- Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). *Journal of Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27:1487-1492
- Goldenberger, D., Perschil I., Ritzler, M., and Alwegg, M. 1995. A Simple "Universal" DNA Extraction Procedure Using SDS and Proteinase K is Compatible with direct PCR amplification. *Journal of PCR Methods Appl.* 4:368-370
- Ilhak, O.I., and A. Arslan. 2007. Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. *Turkey Journal Vet. Anim. Sci.* 31(3):159-163
- Suprianto. 2007. Parameter Mutu Permen Kunyah. Dilihat 2 Februari 2015. <<http://foodreview.co.id/preview.php?view2&id=55719#.VzRWslV97I>>
- Karim AA, and Bhat R. 2009. Fish Gelatin: Properties, Challenges, and Prospects as an Alternative to Mammalian Gelatins. *Food Hydrocolloids.* 23:563-576
- Pascoal, A., Prado, M., Castro, J., Cepeda, A., and Velazquez, J. B. 2004. Survey of Authenticity of Meat Species in Food Products Subjected to Different Technological Processes, by Means of PCR-RFLP Analysis. *Journal of Eur. Food Technol.* 218:306-312
- Raharjo, T. J., Cahyanigtyas, W., and Pranowo, D. 2012. Validation of PCR-RFLP Testing Method to Detect Porcine Contamination In Chicken Nugget. *Indo. J. Chem.* 12(3):302-307
- Rasmussen, H. B. 2012. Restriction Fragment Length Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis-Valuable Tool of Genotyping and Genetic Fingerprinting. Dilihat 25 Februari 2015. <<http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restriction-fragment-length-polymerism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te>>
- Sahilah, A. M, Mohd. Fadly, L., Norrakiah, A. S., Aminah, A., Wan Aida, W. M., Ma'aruf, A. G., Mohd. Khan, A. 2012. Halal Market Surveillance of Soft and Hard Gel Capsule Pharmaceutical Products Using PCR and Southern-Hybridization on Biochip Analysis. *inter. Food Research Journal.* 19(1):371-375
- Tanabe, S, and Miyauchi, E. 2007. PCR Methods of Detecting Pork in Foods for Verifying Allergen Labelling and for Identifying Hidden Pork Ingredients in Processed Foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(7):1663-1667