

Deteksi Marker Genetik dari Sekuen Protein Hewan untuk Autentikasi Halal Melalui Pendekatan Bioinformatika

Detection of Potential Genetic Marker from Animal Protein Sequence for Halal Authentication using Bioinformatic Approach

Maghfirotul Amaniyah^{1a}, Ruth Ema Febrita², Junaedi Adi Prasetyo³

¹Program Studi Teknologi Pengolahan Hasil Ternak, Politeknik Negeri Banyuwangi, Jl. Raya Jember – Banyuwangi Km. 13, Banyuwangi, 68461, Indonesia

^{2,3}Program Studi Teknik Informatika, Politeknik Negeri Banyuwangi, Jl. Raya Jember – Banyuwangi Km. 13, Banyuwangi, 68461, Indonesia

^aKorespondensi : Maghfirotul Amaniyah, E-mail: maghfirotulamaniyah@poliwangi.ac.id

Diterima: 29 – 09 – 2022 , Disetujui: 31 – 12 - 2023

ABSTRACT

Awareness of safety or guarantee of halal food authenticity becomes a problem for Muslims. Bioinformatics offers breakthrough analysis of specific genes from genetic material databases for managing biological information. This study aims to find markers of protein sequences in the mammalian group using bioinformatics. The selection of protein sequence samples was IGF2 (insulin-like growth factor 2) and CytB (cytochrome B). Analysis of the relationship between samples using a phylogenetic tree construction based on protein sequences of halal mammal species compared with non-halal mammals, especially pigs and dogs. We analyze the protein structure and physicochemical properties to determine the special characteristics of the 'halal' marker. The phylogenetic tree analysis shows that the pig species occupies a different group from the mammals commonly consumed in Indonesia and is most closely related to the dog species. Prediction of sample protein properties provides information on isoelectric point and solubility similarity between pig and dog species. Two marker blocks of amino acid polymorphism in pig and dog sequences of IGF2 protein were obtained by multiple sequence alignment methods, YDTWKQSAQRLRRGLPALLRARRGR and HGGASPEASG sequences, respectively. These findings can be a marker reference in testing DNA-based halal products, especially using the PCR method.

Keywords: bioinformatic, halal marker, IGF2, livestock, polymorphism

ABSTRAK

Keamanan pangan dari sudut pandang agama Islam menekankan pada jaminan kehalalan suatu makanan, sehingga aspek halal menjadi kebutuhan primer bagi masyarakat Indonesia. Studi bioinformatika menawarkan pendekatan untuk analisis materi genetik organisme dari database yang telah tersedia secara luas. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan marker dari sekuens protein beberapa sampel kelompok mamalia secara *in silico* dengan pendekatan bioinformatika. Pemilihan sampel urutan protein didasarkan pada protein yang telah banyak dilaporkan secara luas yaitu protein IGF2 (*insulin like growth factor 2*) dan CytB (*cytochrome B*). Analisis kekerabatan antar sampel menggunakan konstruksi pohon filogenetik berdasarkan sekuens protein sampel spesies mamalia halal yang dibandingkan dengan sampel mamalia non-halal seperti babi dan anjing. Tahap terakhir adalah analisis struktur dan sifat fisikokimia protein target untuk menentukan marker 'halal'. Analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa spesies babi menempati kelompok yang berbeda dengan mamalia yang umum dikonsumsi di Indonesia dan paling dekat hubungannya dengan spesies anjing. Prediksi sifat protein sampel memberikan informasi kesamaan titik isoelektrik dan karakteristik kelarutan antara sekuens protein spesies babi dan anjing. Dua blok penanda pada sekuens babi dan anjing dari protein IGF2 didapatkan dengan metode *multiple sequence alignment* berupa urutan polimorfisme asam amino YDTWKQSAQRLRRGLPALLRARRGR dan HGGASPEASG. Hasil ini dapat menjadi penanda baik secara struktur (urutan) maupun posisinya sebagai acuan dalam pengujian produk halal berbasis DNA, khususnya dengan metode PCR.

Kata kunci: bioinformatika, hewan ternak, IGF2, marker halal, polimorfisme

Amaniyah, M., Febrita, R. E., & Prasetyo, J. A. (2023). Deteksi Marker Genetik dari Sekuen Protein Hewan untuk Autentikasi Halal Melalui Pendekatan Bioinformatika. *Jurnal Agroindustri Halal*, 9(3), 289 – 299.

PENDAHULUAN

Makanan merupakan salah satu kebutuhan primer manusia, yang pemenuhannya merupakan bagian dari pemenuhan hak asasi manusia. Menjaga keamanan pangan penting dilakukan agar pangan yang dikonsumsi masyarakat tidak menimbulkan bahaya bagi kesehatan, merugikan serta tidak bertentangan dengan hukum agama atau kepercayaan, dan budaya di masyarakat (Undang-Undang Republik Indonesia Tentang Pangan, 2012). Kesadaran akan pentingnya jaminan autentikasi makanan halal menjadi isu dan masalah bagi sebagian masyarakat di dunia, terutama di negara yang memiliki mayoritas penduduk Muslim. Setiap negara memiliki perhatian dan kepentingan tersendiri untuk menentukan prioritas dalam membidik isu keaslian makanan halal. Isu kehalalan bagi konsumen muslim, seperti daging dan produk olahan daging, diharuskan tidak mengandung bahan babi, serta melalui cara penyembelihan yang halal (Nakyinsige *et al.*, 2012).

Ciri-ciri makanan halal tidak dapat dipastikan oleh konsumen secara langsung karena tidak terlihat terutama pada makanan olahan. Sjafoer *et al.* (2022) dalam hasil observasinya terhadap UMKM di Jawa Timur melaporkan bahwa hampir 50% responden tidak memiliki supplier bahan baku yang jelas sehingga status kehalalan bahan baku tidak mudah ditelusuri. Dalam rangka perlindungan jaminan makanan halal, pemerintah Indonesia memiliki BPJPH (Badan Penyelenggara Jaminan Produk Halal) yang berperan mengatur pemberian sertifikat halal pada suatu produk. Mekanisme pemeriksaan kehalalan suatu produk dilakukan melalui inspeksi lokasi produksi serta pengujian pada laboratorium (Kamsari, 2019).

Waluyo *et al.* (2021) telah melaporkan studi penggunaan analisis *in silico* terhadap gen Aktin sebagai kandidat untuk deteksi DNA Non-Halal. Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa suatu produk pangan dapat dikatakan halal atau haram melalui identifikasi atau pendekatan molekuler dengan melihat sifat atau struktur protein yang terkandung di dalamnya. Jika suatu makanan mengandung struktur protein seperti yang terdapat pada hewan tertentu, maka dapat diasumsikan bahwa makanan tersebut mengandung bahan hewani. Untuk melakukan penelitian tentang sifat-sifat protein dan DNA diperlukan data yang berkaitan dengan strukturnya. Metode pemeriksaan halal yang tepat dan sensitif sangat penting sebagai jaminan kualitas, jaminan hukum, dan perlindungan konsumen. Prosedur pengujian yang sudah digunakan untuk autentikasi halal antara lain pendekatan biologis dan kimiawi, menggunakan metode DNA-based, protein-based, atau lipid-based (Ballin, 2010; Guntarti *et al.*, 2017; Premanandh & bin Salem, 2017; He & Yang, 2018; Hermanto *et al.*, 2022). Urutan DNA dapat diaplikasikan dalam analisis kandungan kontaminan dalam bahan makanan mentah maupun olahan. Protein yang berbeda telah ditargetkan untuk identifikasi kualitas daging untuk analisis spesies daging (Davoli & Braglia, 2007; Fajardo *et al.*, 2010; Lopez-Oceja *et al.*, 2017; von Barga *et al.*, 2014).

Website UniProt (*Universal Protein Resource*) dan NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) telah menyediakan database sekuens protein dari berbagai level organisme yang dapat diakses secara bebas oleh publik. Pemanfaatan database protein mamalia untuk analisis deteksi marker genetik, termasuk penanda suatu kehalalan, merupakan hal yang potensial untuk dilakukan. Berdasarkan database tersebut, dapat diprediksi sifat khusus dari suatu kelompok protein terpilih hingga polimorfisme dari urutan sekuennya sebagai acuan penentuan marker spesifik. Adanya polimorfisme asam amino pada urutan residu tertentu suatu kelompok protein dapat memberikan pengaruh perbedaan sifat protein tersebut (Laksono & Sinuraya, 2018). Penerapan bioinformatika untuk deteksi gen potensial pada hewan ternak diharapkan menjadi terobosan baru untuk mencari bahan (marker spesifik). Marker spesifik merupakan komponen penting dalam metode pengecekan

autentifikasi halal berbasis DNA atau protein (Erwanto *et al.*, 2014; Hsieh *et al.*, 2016). Penggunaan pendekatan analisis bioinformatika sebagai bahan rekomendasi autentikasi makanan halal berbasis DNA dapat menjadi salah satu langkah inisiasi. Studi ini bertujuan untuk menemukan koleksi sekuens protein hewan ternak mamalia yang berpotensi sebagai bahan pendeteksi autentikasi makanan halal secara *in silico* menggunakan pendekatan bioinformatika. Penelitian ini juga merupakan tahap inisiasi untuk membandingkan metode analisis sampel molekuler menggunakan machine learning pada penelitian sebelumnya (Febrita & Amaniyah, 2021). Kami menggunakan gen ternak yang umum dikonsumsi di Indonesia menggunakan sumber database yang ada di UniProt dan NCBI. Pada penelitian selanjutnya, hasil dari studi ini diharapkan dapat digunakan sebagai data pendukung untuk pendeteksian autentikasi halal makanan berbasis DNA dan protein, khususnya daging olahan.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan pendekatan eksperimental *in silico* berdasarkan analisis bioinformatika. Kelompok mamalia yang diperbolehkan untuk dikonsumsi di Indonesia (sapi, domba, kambing, kuda, dan kerbau) digunakan sebagai sampel yang representatif dibandingkan dengan sekuens mamalia lainnya yang dilarang untuk dikonsumsi bagi umat Islam (babi, anjing, tikus dan mencit). Kami menganalisis menggunakan beberapa situs web dan program bioinformatika untuk mendapatkan beberapa informasi dari sekuen protein yang dipakai sebagai sampel.

Pemilihan Sampel Uji

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa 14 sekuen protein masing-masing dari gen IGF2 (*Insulin Like Growth Factor 2*) dan Cyt-B (*Cytochrome B*) spesies terpilih yang diambil dari genbank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan *Universal Protein Resource* (UniProt) (www.uniprot.org) (Tabel 1). Protein ini telah dilaporkan untuk mendeteksi kualitas daging pada beberapa spesies (Huang *et al.*, 2013; Davoli & Braglia, 2007; Lopez-Oceja *et al.*, 2017).

Tabel 1. Sekuen protein dari sampel

Sampel Organisme	IGF2		CytB	
	Acc. No.	Sumber	Acc. No.	Sumber
Babi (<i>Sus scrofa</i>)	P23695.1	Uniprot	P24964	Uniprot
Anjing (<i>Canis lupus familiaris</i>)	J9P961	Uniprot	Q34101	Uniprot
Sapi (<i>Bos taurus</i>)	P07456.4	Uniprot	P00157	Uniprot
Kuda (<i>Equus caballus</i>)	P51459.2	Uniprot	P48665	Uniprot
Domba (<i>Ovis aries</i>)	P10764.2	Uniprot	P24959	Uniprot
Kambing (<i>Capra hircus</i>)	Q153G7	Uniprot	P24953	Uniprot
Kerbau (<i>Bubalus bubalis</i>)	XP_025142717.1	NCBI	Q33950	Uniprot
Monyet (<i>Macaca mulatta</i>)	A0A5F8AD35	Uniprot	Q6IYG6	Uniprot
Simpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	A0A2I3SPQ3	Uniprot	Q9T9V5	Uniprot
Manusia (<i>Homo sapiens</i>)	P01344.1	Uniprot	P00156	Uniprot
Mencit (<i>Mus musculus</i>)	P09535.1	Uniprot	P00158	Uniprot
Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	P01346.1	Uniprot	P00159	Uniprot
Ayam (<i>Gallus gallus</i>)	P33717.2	Uniprot	P18946	Uniprot
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Q9PUD0	Uniprot	Q9MIX8	Uniprot

(Acc. No: Nomor akses pada website)

Sekuen diambil dalam format fasta sebagai bahan analisis selanjutnya. Sekuen dari spesies terpilih diajukan di dalam penelitian ini sebagian besar berdasarkan data hewan ternak kelompok mamalia yang umum di konsumsi di Indonesia. Sekuen protein spesies dari ayam dan ikan dijadikan sebagai sekuen pembanding non mamalia.

Analisis Filogenetik

Analisis ini dilakukan untuk mengetahui kekerabatan atau kedekatan secara genetik dari sampel yang diuji. Setiap spesies memiliki susunan DNA dan protein yang spesifik sehingga dapat dijadikan sebagai penanda yang berbasis DNA untuk aplikasi di berbagai bidang. Analisis kekerabatan dilakukan melalui pembuatan pohon filogenetik yang dikonstruksi menggunakan sekuen protein gen IGF2 dan CytB dari sampel spesies mamalia, dan sekuen pembanding berupa ayam dan ikan. Urutan residu protein disejajarkan menggunakan software MEGAX sebagai data konstruksi pohon filogenetik berdasarkan metode *Neighbour Joining* dengan nilai *bootstrap* 1000 (Hall, 2013; Kumar *et al.*, 2018). Pohon filogenetik digunakan untuk mengetahui evolusi atau jarak mutasi DNA yang terjadi pada gen target. Gen target spesifik yang hanya terdapat pada kelompok mamalia akan digunakan untuk analisis perbandingan selanjutnya. Panjang cabang pohon filogenetik menjadi gambaran evolusi atau jarak mutasi yang terjadi pada gen target.

Analisis Sekuen Protein

Analisis protein bertujuan untuk mengetahui kelompok protein yang potensial untuk bahan deteksi protein produk 'halal'. Karakter spesifik dari protein-protein yang hanya dimiliki oleh spesies babi dibandingkan dengan karakter protein dari spesies lainnya yang kemudian akan menjadi acuan pembeda. Analisis ini dilakukan melalui perbandingan struktur dan sifat protein yang dimiliki babi dan mamalia pembanding lainnya.

Analisis prediksi struktur protein gen target terpilih dilakukan menggunakan open software PredictProtein (<http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/>) dan prediksi struktur protein tersier dimodelkan menggunakan Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>). Sifat fisikokimia protein yang diamati meliputi hidrofobitas, kelarutan, titik isoelektrik, dan pI. Analisis hidrofobik menggunakan Kyte-Doolittle Hydropath plot (https://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1), analisis kelarutan dengan Protein Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>), sedangkan berat molekul dan titik isoelektrik (pI) diestimasi dengan software Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/).

Selanjutnya, analisis *Multiple Sequence Alignment* (MSA) dibuat untuk mengetahui posisi dan ketepatan sekuen yang berbeda (polimorfisme asam amino) sebagai marker untuk mencari kemiripan sekuen protein IGF2 yang dimiliki oleh sekelompok sampel terpilih. MSA dilakukan menggunakan Clustal Omega software 1.2.1 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Region yang berisi residu atau asam amino yang konservatif ditetapkan sebagai marker penanda (Sievers & Higgins, 2014).

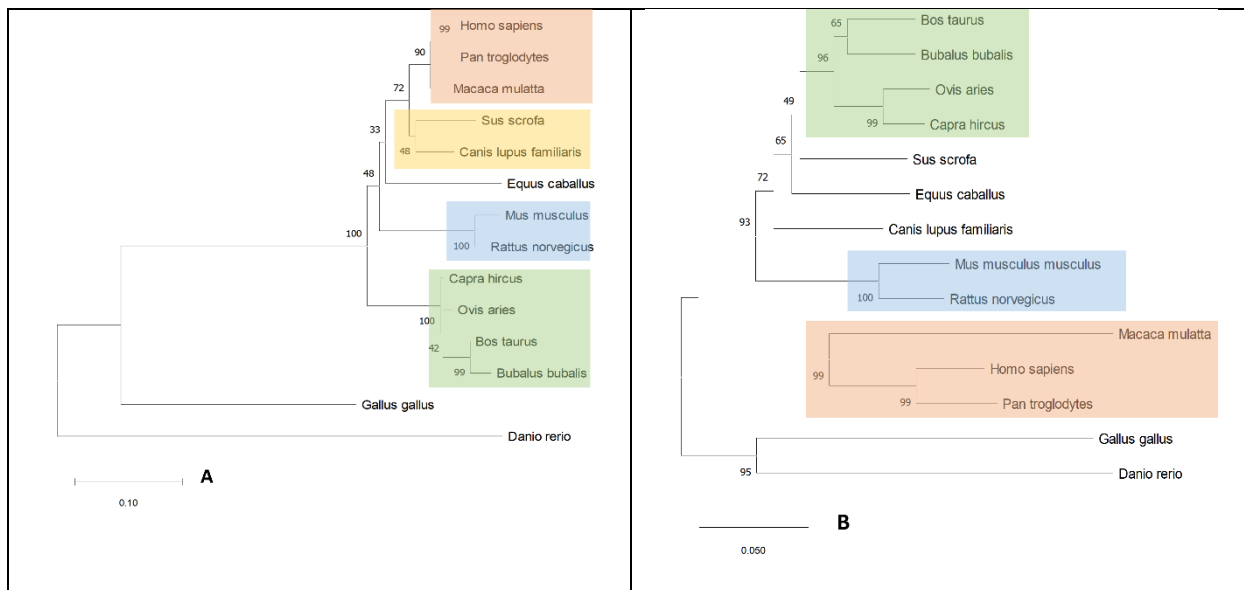
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Kekerabatan Sampel

Evolusi dapat didefinisikan sebagai perkembangan bentuk biologis dari bentuk lain yang sudah ada sebelumnya atau bentuk awal ke bentuk tertua saat ini melalui seleksi alam atau modifikasi. Dalam penelitian biologi modern, seleksi dalam evolusi molekuler dapat dilakukan melalui analisis filogenetik untuk menganalisis sejarah evolusi organisme untuk memprediksi garis keturunan organisme tersebut. Perspektif evolusioner dapat dibangun dengan menggunakan sekuens DNA atau protein sebagai data molekuler organisme yang ada karena

materi genetik mengakumulasi mutasi yang terjadi seiring waktu sehingga menyebabkan perubahan fenotipik (Xiong, 2006).

Analisis filogenetik dapat menggambarkan prediksi kekerabatan secara genetik diantara sampel sekuen protein yang diuji. Hasil hubungan evolusioner sampel protein IGF2 menunjukkan posisi empat kelompok (cluster) (Gambar 1A). Kelompok pertama terdiri dari manusia, primata dan simpanse. Babi dan anjing menempati kelompok berbeda, begitu juga dengan kelompok tikus dan mencit. Kelompok lainnya terdiri dari sapi, kambing, domba dan kerbau. Outgroup dalam analisis filogenetik ini berupa ayam dari kelompok aves dan zebrafish (*Danio rerio*) dari kelompok ikan menunjukkan posisi cabang pohon filogenetik yang berbeda dengan kelompok hewan mamalia uji lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa sampel sekuen protein IGF2 diasumsikan dapat digunakan untuk menunjukkan kekerabatan antara kelompok mamalia dan non-mamalia (ayam dan ikan). Pohon filogenetik yang dibangun mengungkapkan hubungan parafiletik antara cluster babi (*Sus scrofa*) dan cluster sapi (*Bos taurus*), yang menunjukkan adanya prediksi variasi spesifik pada urutan asam amino (polimorfisme asam amino) dalam urutan protein IGF2 antara kedua spesies kelompok. Huang *et al.* (2013) melaporkan bahwa karakter polimorfisme IGF2 dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk seleksi dalam program pemuliaan sapi potong. Hal ini menunjukkan bahwa polimorfisme intraspecies diharapkan lebih tinggi antara protein IGF2 mamalia yang dapat dikonsumsi oleh umat Islam (cluster *B. taurus*) dan *S. scrofa*, sehingga berpotensi untuk dikembangkan untuk tujuan autentikasi halal.



Gambar 1. Konstruksi pohon Filogenetik sekuen protein (A) IGF2 dan (B) CytB dari mamalia, burung dan ikan. Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode *neighbour joining algorithm* dalam MEGA X. Bar menunjukkan perkiraan divergensi sekuen

Di sisi lain, protein CytB dari sampel menunjukkan pola konstruksi pohon filogenetik yang sedikit berbeda dari protein IGF2 (Gambar 1B). Kelompok pertama terdiri dari sapi, kambing, domba dan kerbau. Kelompok kedua terdiri dari tikus dan mencit dan kelompok ketiga terdiri dari manusia, primata dan simpanse. Sampel kuda, babi dan anjing menunjukkan kedekatan dengan kelompok sapi dan tikus. Aina *et al.*, (2020) melaporkan bahwa sekuen DNA protein Cyt-B dapat dipakai sebagai marker standar untuk mengidentifikasi adanya kontaminasi daging babi dalam makanan berdasarkan analisis Real Time-PCR menggunakan primer CYTBWB2-wb yang terbukti spesifik untuk mendeteksi kontaminasi daging babi pada produk bakso.

Berdasarkan pohon filogenetik dari dua sampel protein, menunjukkan bahwa spesies babi adalah kerabat terdekat dengan anjing (keduanya merupakan mamalia yang dilarang untuk dikonsumsi oleh umat Islam). Hasil ini menunjukkan bahwa mereka babi dan anjing adalah kelompok yang berbeda dari anggota kelompok sapi, kambing, domba dan kerbau yang biasanya dikonsumsi untuk daging di Indonesia. Hasil ini dapat digunakan sebagai bahan referensi untuk studi lebih lanjut terkait hubungan evolusi antara babi (atau anjing) dan hewan lain yang dikategorikan haram, tetapi masih dikonsumsi di Indonesia.

Analisis Sekuen Protein

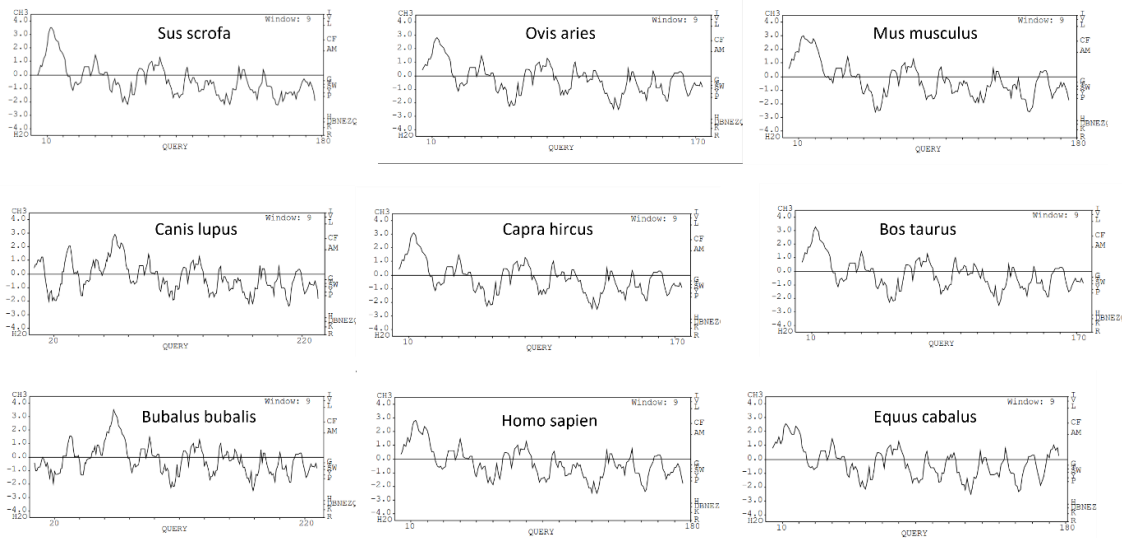
Asam amino standar terdiri atas 20 jenis, meskipun beberapa organisme memiliki asam amino tambahan. Pada tahapan sintesis protein, residu dalam protein dimodifikasi secara kimiawi melalui proses pascatranslasi yang mengubah sifat fisik dan kimia, hingga fungsi protein. Tahapan prediksi analisis protein pada penelitian ini menggunakan 9 sampel sekuen protein mamalia, yaitu sapi, kambing, domba, kerbau, kuda, babi, anjing, manusia, dan tikus.

Sampel protein IGF2 dan CytB yang digunakan dalam penelitian ini memiliki panjang urutan asam amino yang berbeda sehingga memiliki berat molekul yang berbeda pula (Tabel 2). Hal menarik dari analisis sifat fisikokimia protein ini adalah kemiripan karakter titik isoelektrik dan kelarutan antara sekuen protein IGF2 dari spesies babi dan anjing. Kedua sekuen ini memiliki titik isoelektrik dan nilai kelarutan lebih tinggi dibandingkan sekuen asam amino sampel lainnya. Hasil prediksi ini didukung oleh hasil studi Hamdani *et al.* (2018) yang melaporkan bahwa terkait sifat fisikokimia sekuen protein IGF2, spesies babi (*Sus scrofa*) memiliki titik isoelektrik serta kelarutan yang lebih tinggi dibandingkan dengan spesies sapi (*Bos taurus*). Sampel protein CytB juga menunjukkan kemiripan karakter titik isoelektrik dari spesies babi dan anjing dengan nilai lebih rendah dibandingkan sampel mamalia lainnya. Karakter sifat kelarutan sampel protein CytB mamalia menunjukkan nilai yang hampir sama pada semua sampel yang digunakan. Analisis hidrofobik menggunakan Kyte-Doolittle Hydropath plot menunjukkan prediksi semua sekuen protein IGF2 yang diujikan cenderung bersifat hidrofilik dan sekuen protein CytB cenderung bersifat hidrofobik (Gambar 2 dan 3). Protein IGF2 dipilih untuk di analisis terlebih dahulu terkait sifat protein lanjutan berdasarkan hasil perbandingan analisis sifat fisikokimia protein yang lebih stabil dibandingkan protein CytB.

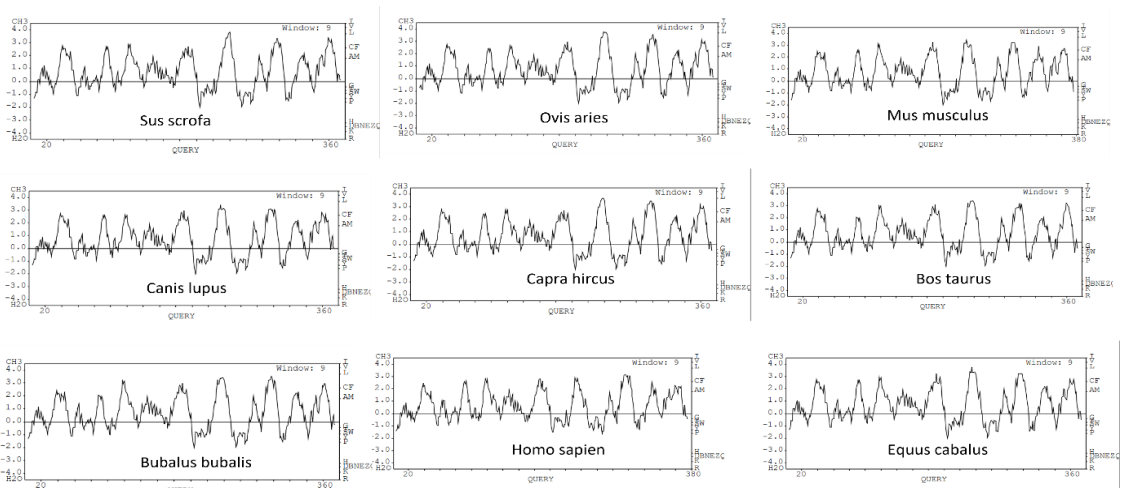
Tabel 2. Prediksi parameter fisikokimia protein sampel mamalia IGF2 dan CytB

Sampel Organisme	IGF2				CytB			
	Panjang sekuen (bp)	Berat Mol. (Dalton)	pI	Sol	Panjang sekuen (bp)	Berat Mol. (Dalton)	pI	Sol
Babi	181	20312.51	10.00	0.592	379	42781.97	6.85	0.218
Anjing	238	26460.64	9.61	0.576	379	42593.51	6.85	0.222
Sapi	179	19681.51	9.11	0.467	379	42590.62	7.75	0.229
Kuda	181	20360.55	9.01	0.386	379	42761.84	7.22	0.267
Domba	179	19616.32	8.84	0.427	379	42849.12	7.19	0.207
Kambing	179	19654.41	8.84	0.423	379	42871.10	7.19	0.207
Manusia	244	20140.35	9.50	0.482	380	42717.59	7.83	0.291
Mencit	180	20030.14	9.38	0.495	381	43209.58	7.80	0.232
Kerbau	235	25783.45	8.43	0.398	379	42783.89	7.79	0.232

(pI: Titik Isoelektrik; Sol: kelarutan protein)



Gambar 2. Prediksi hidrofobisitas sekuen protein IGF2 sampel mamalia. Plot hidrofobisitas yang menampilkan area dominan di bawah garis threshold menunjukkan prediksi kecenderungan sifat hidrofilik pada sekuen sampel.



Gambar 3. Prediksi hidrofobisitas sekuen protein CytB sampel mamalia. Plot hidrofobisitas yang menampilkan area dominan di atas garis threshold menunjukkan prediksi kecenderungan sifat hidrofobik pada sekuen sampel.

Analisis struktur protein

Berbagai jenis protein memiliki fungsi yang berbeda akibat perbedaan urutan asam amino-asam aminonya, yang ditentukan berdasarkan urutan DNA dan disandi dalam kode genetik. Perbedaan urutan asam amino akan mempengaruhi pelipatan protein menjadi struktur tiga dimensi khusus hingga reaktivitas kimia suatu protein (Gutteridge & Thornton, 2005). Suatu struktur protein dapat diketahui melalui model matematika protein melalui prediksi formasi molekul secara komputasi berdasarkan data teori tanpa mendeteksi struktur protein secara langsung di laboratorium (Zhang, 2008). Analisis struktur sekunder dan tersier sekuen protein IGF2 dari 9 sampel mamalia yang dianalisis menunjukkan keragaman pola urutan struktur (gambar tidak ditampilkan). Hasil analisis sifat struktur protein IGF2 dari spesies babi dan anjing secara khusus dianalisis melalui perbandingan untuk mengetahui secara detail perbedaan karakternya (Gambar 3). Kedua protein terdeteksi memiliki struktur sekunder dan tersier yang cenderung berbeda dengan jumlah struktur alfa helix sebanyak 6

buah dengan posisi yang berbeda. Protein IGF2 spesies babi tersusun atas 2 struktur beta, sedangkan spesies anjing memiliki 5 struktur beta.



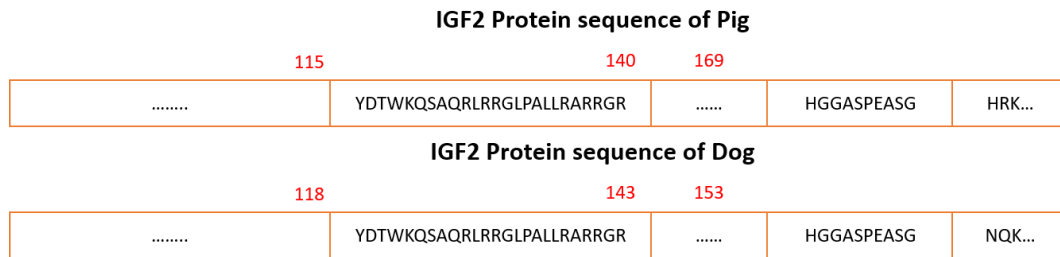
Gambar 3. Perbandingan prediksi struktur protein IGF2 sekunder dan tersier antara (A) spesies babi dan (B) spesies anjing. Struktur heliks (warna biru); struktur beta (warna ungu).

Analisis *multiple sequence alignment* (MSA) dilakukan untuk mengetahui posisi blok marker yang berupa polimorfisme asam amino antar sampel sekuen protein IGF2 secara lebih rinci. Gambar 4 menunjukkan keberadaan dua blok marker (polimorfisme asam amino dibandingkan sampel sekuen protein mamalia lainnya) yang terdapat pada kedua sekuen protein anjing dan babi. Kami menemukan dua blok marker yang terdiri dari 25 sekuens asam amino YDTWKQSAQLRRGLPALLRARRGR dan 10 sekuens asam amino HGGASPEASG. Posisi marker di seluruh sekuen bervariasi tergantung pada panjang sekuens protein. Namun, pola posisi urutan blok YDTWKQSAQLRRGLPALLRARRGR selalu ada sebelum urutan blok HGGASPEASG. Berdasarkan pola ini dapat diasumsikan bahwa karakter atau sekuens yang berada sebelum dan setelah blok HGGASPEASG, bukan penciri atau marker pada protein anjing dan babi. Analisis MSA ini memiliki temuan penanda yang sesuai dengan analisis N-Gram pada penelitian sebelumnya (Gambar 5) (Febrita & Amaniyah, 2021).

Cow	DVSASTTVLPDDVTAYPVGKFFQYDIWKQSTQRLRRGLPAFLRARRGR	140
Buffalo	DVSASTTVLPDDVTAYPVGKFFQYDIWKQSTQRLRRGLPAFLRARRGR	196
Sheep	DVSASTTVLPDDFTAYPVGKFFQSDTWKQSTQRLRRGLPAFLRARRGR	140
Goat	DVSASTTVLPDDFTAYPVGKFFQSDTWKQSTQRLRRGLPAFLRARRGR	140
Mouse	DVSTSQAVLPDDFPRYPVVGKFFQYDTWRQSAQRLRRGLPALLRARRGR	140
Horse	DVSTPPTVLPDDSPRYPVVVKLFQYNAWKQSTQRLRRGLPALLRTRRGR	140
Human	DVSTPPTVLPDNFPRYPVVGKFFQYDTWKQSTQRLRRGLPALLRARRGH	140
Pig	DVSTPPTVLPDNFPRYPVVGKFFRYDTWKQSAQLRRGLPALLRARRGR	140
Dog	DVSTPPTVLPDNFPRYPVVGKFFQYDTWKQSAQLRRGLPALLRARRGR	197

Cow	TLAKELEALREAKSHRPLIALPTQDPATHGGASSKASSD--	179
Buffalo	TLAKELEALREAKSHRPLIALPTQDPATHGGASSEASSD--	235
Sheep	TLAKELEALREAKSHRPLIALPTQDPATHGGASSEASSD--	179
Goat	TLAKELEALREAKSHRPLIALPTQDPATHGGASPEASSD--	179
Mouse	MLAKELKEFREAKRHRPLIVLPPKDPAHG-GASEMSSNHQ	180
Horse	MLVKELEAFREAQRHRPLIALPTEDPTPHGAAFVEVSSDLQ	181
Human	VLAKELEAFREAKRHRPLIALPTQDPA-HGGAPPEMASNRK	180
Pig	TLAKELEAVREAKRHRPLTARPTRDPAAHGGASPEASGHRK	181
Dog	MLAKELEAFREAKRHRPLIALPTHDPATHHGGASPEASGNQK	238

Gambar 4. *Multiple sequence alignment* urutan asam amino IGF2. Daerah konservatif antara sekuen sampel babi dan anjing ditunjukkan oleh warna abu-abu



Gambar 5. Ilustrasi posisi marker non-halal pada sekuens protein IGF2 pada hewan babi dan anjing (Febrita & Amaniyah, 2021).

KESIMPULAN

Analisis pohon filogenetik sekuens protein IGF2 (*insulin like growth factor 2*) dan CytB (*cytochrome B*) menunjukkan bahwa spesies babi menempati klaster yang berbeda dengan mamalia yang umum dan dapat dikonsumsi di Indonesia. Berdasarkan analisis urutan protein, spesies babi paling dekat hubungannya dengan anjing. Analisis sifat protein menunjukkan kesamaan titik isoelektrik dan karakteristik kelarutan antara sekuens protein spesies babi dan anjing. Analisis *multiple sequence alignment* yang diterapkan untuk mendeteksi posisi dan urutan marker ‘non-halal’ dalam struktur protein (IGF2) pada hewan menunjukkan adanya dua blok marker yang terdapat pada sekuens protein babi dan anjing. Marker ‘non-halal’ terdiri dari 25 sekuens asam amino YDTWKQSAQRLRRGLPALLRARRGR dan 10 sekuens asam amino HGGASPEASG. Temuan tersebut dapat menjadi penanda baik secara struktur (urutan) maupun posisinya, sehingga dapat dijadikan acuan dalam pengujian produk halal berbasis DNA khususnya dengan metode PCR sehingga biaya dan waktu dapat diminimalkan. Data relevan terkait karakter gen selektif pada beberapa sampel hewan dapat digunakan sebagai informasi pendukung pemilihan penanda gen halal.

DAFTAR PUSTAKA

- Aina, G. Q., Rohman, A., & Erwanto, Y. (2020). Wild boar-specific PCR assay and sequence analysis based on mitochondrial cytochrome-B gene for Halal authentication studies. *Indonesian Journal of Chemistry*, 20(2), 483–492. <https://doi.org/10.22146/ijc.42552>
- Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577-587. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>
- Davoli, R., & Braglia, S. (2007). Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Briefing in Functional Genomics and Proteomics*, 6(4), 313-321. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elm036>
- Erwanto, Y., Abidin, M. Z., Muslim, E. Y. P., Sugiyono, S., & Rohman, A. (2014). Identification of pork contamination in meatballs of Indonesia local market using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(10), 1487-1492. <https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14014>
- Fajardo, V., González Isabel, I., Rojas, M., García, T., & Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 408-421. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.06.002>

- Febrita, R. E. & Amaniyah, M. (2021). Deteksi gen potensial hewan ternak untuk autentikasi produk halal menggunakan analisis n-gram. In Seminar Nasional Terapan Riset Inovatif (SENTRINOV) Ke-6. *Jurnal Seminar Nasional Terapan Riset Inovatif (SENTRINOV)*, 7(1), 260–267.
- Guntarti, A., Rohman, A., Martono, S., & Yuswanto, A. (2017). Authentication of Wild Boar Meat in Meatball Formulation Using Differential Scanning Calorimetry and Chemometrics. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 8-12. <https://doi.org/10.14499/jfps>
- Gutteridge, A., & Thornton, J. M. (2005). Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends in biochemical sciences*, 30(11), 622-629. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.006>
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- Hamdani, A. D., Suryohastari, R. B., Virgianti, D. P., & Putrie, R. F. W. (2018). Short Communication: Genetic diversity of the IGF2 gene as a source of genetic marker for halal authentication. *Nusantara Bioscience*, 10(4), 203–209. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n100401>
- He, Z., & Yang, H. (2018). Colourimetric detection of swine-specific DNA for halal authentication using gold nanoparticles. *Food Control*, 88, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.001>
- Hermanto, S., Rudiana, T., Zein, M. I. H. L., & Wisudawati, A. W. (2022). Methods Validation of Pork Authentication in Processed Meat Products (Sausages) Through Densitometry Analysis. *Indonesian Journal of Halal Research*, 4(1), 35–44. <https://doi.org/10.15575/ijhar.v4i1.11892>
- Hsieh, M. K., Shih, P. Y., Wei, C. F., Vickroy, T. W., & Chou, C. C. (2016). Detection of undeclared animal by-products in commercial canine canned foods: Comparative analyses by ELISA and PCR-RFLP coupled with slab gel electrophoresis or capillary gel electrophoresis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1659–1665. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7268>
- Huang, Y. Z., Wang, J., Zhan, Z. Y., Cao, X. K., Sun, Y. J., Lan, X. Y., Lei, C. Z., Zhang, C. L., & Chen, H. (2013). Assessment of association between variants and haplotypes of the IGF2 gene in beef cattle. *Gene*, 528(2), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.035>
- Kamsari, D. H. A. (2019). *Mekanisme Pengajuan Sertifikasi Halal dan Fasilitasi Halal Bagi UMK*. Badan Penyelenggara Jaminan Produk Halal. Kementerian Agama. http://www.halal.go.id/cms/assets/files/Materi_Pak_Amru_compressed.pdf
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Laksono, J. P., & Sinuraya, R. K. (2018). Review Artikel: Polimorfisme Gen Serotonin Mempengaruhi Pengobatan Risperidone dan Clozapine Pada Pasien Skizofrenia. *Farmaka*, 16(3), 83-90.
- Lopez-Oceja, A., Nuñez, C., Baeta, M., Gamarra, D., & de Pancorbo, M. M. (2017). Species identification in meat products: A new screening method based on high resolution melting analysis of cyt b gene. *Food Chemistry*, 237, 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.004>
- Nakyinsige, K., Man, Y. B. C., & Sazili, A. Q. (2012). Halal authenticity issues in meat and meat products. *Meat science*, 91(3), 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.015>

- Undang-Undang Republik Indonesia Tentang Pangan Nomor 18 Tahun 2012 Pasal 1 ayat 5 (2012). <https://www.kemhan.go.id/ppid/wp-content/uploads/sites/2/2016/09/uu18-2012bt.pdf>.
- Premanandh, J., & bin Salem, S. (2017). Progress and challenges associated with halal authentication of consumer packaged goods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(14): 4672-4678. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8481>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods in Molecular Biology*, 1079, 105–116. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6
- Sjakoer, N. A. A., Noerhayati, E., Mardiyani, S. A., & Said, M. M. U. (2022). Gambaran kesiapan UMKM menuju industri halal Jawa Timur: An Overview of Small and Medium Enterprise (SME) Readiness towards The East Java Halal Industry. *Jurnal Agroindustri Halal*, 8(2), 189.
- von Barga, C., Brockmeyer, J., & Humpf, H. U. (2014). Meat authentication: A new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(39), 9428–9435. <https://doi.org/10.1021/jf503468t>
- Waluyo, S., Malau, J., Raekiansyah, M., Yulian, E., & Hardiman, I. (2021). In Silico Analysis of Actin Gene as a Candidate for DNA Non-Halal Detection Base on Real-Time PCR. *Indonesian Journal of Halal Research*, 3(2), 70–74. <https://doi.org/10.15575/ijhar.v3i2.12123>
- Xiong, J. (2006). *Essential bioinformatics*. Cambridge University Press.
- Zhang, Y. (2008). Progress and challenges in protein structure prediction. *Current opinion in structural biology*, 18(3), 342-348. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.02.004>