

PENGGUNAAN PRIMER GEN CYTOCHROME OXIDASE 1 DALAM REAKSI POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) UNTUK IDENTIFIKASI KANDUNGAN BABI PADA MAKANAN

Elfira Rosa Pane^{1*}, Leni Legasari¹, Intan Mardini¹

¹Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Raden Fatah Palembang
Jl.Prof.K.H.Zainal Abidin Fikri KM.3,5 Palembang Sumatera Selatan,30126 Indonesia

*E-mail: elfirarosapane_uin@radenfatah.ac.id

Riwayat Article

Received: 01 February 2024; Received in Revision: 23 July 2024; Accepted: 24 July 2024

Abstract

Muslims make up the majority of the population in Indonesia so halal food safety is of paramount importance. From a religious and health perspective, adulteration and contamination of Sus scrofa meat is considered a violation of halal norms. Sus scrofa is often used to adulterate beef to take advantage of the physical resemblance and price difference. The need to identify Sus scrofa meat contamination in food products was highlighted in this study. After a successful isolation process, the Polymerase Chain Reaction (PCR) method was used to validate the presence of porcine DNA. PCR utilizes primers specifically made to replicate specific DNA sequences associated with pigs. PCR testing provides precise results for pig DNA, ensuring the accuracy of detection of pork contamination in foodstuffs. This research contributes to efforts to maintain halal food safety in Indonesia by emphasizing the important role of PCR in the detection process of Sus scrofa meat.

Keywords: PCR, Desain Primer, Sus scrofa

Abstrak

Umat Islam merupakan mayoritas dari populasi di Indonesia sehingga keamanan pangan halal sangat penting. Dari sudut pandang agama dan kesehatan, pemalsuan dan kontaminasi daging Sus scrofa dianggap sebagai pelanggaran terhadap norma-norma halal. Sus scrofa sering digunakan untuk memalsukan daging sapi untuk mengambil keuntungan dari kemiripan fisik dan perbedaan harga. Kebutuhan untuk mengidentifikasi kontaminasi daging Sus scrofa pada produk makanan menjadi sorotan utama dalam penelitian ini. Setelah proses isolasi berhasil, metode Polymerase Chain Reaction (PCR) digunakan untuk memvalidasi keberadaan DNA babi. PCR menggunakan primer yang dibuat secara khusus untuk mereplikasi sekuens DNA tertentu yang terkait dengan babi. Pengujian PCR memberikan hasil yang tepat untuk DNA babi, menjamin keakuratan deteksi kontaminasi daging babi pada bahan pangan. Penelitian ini memberikan kontribusi pada upaya menjaga keamanan pangan halal di Indonesia dengan menekankan peran penting PCR dalam proses deteksi daging Sus scrofa.

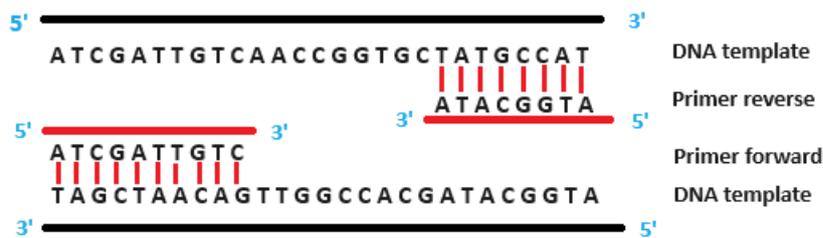
Keywords: minimal 3 keyword, Verdana 8 regular font

1. Introduction

Indonesia adalah negara yang memiliki penduduk muslim terbanyak di dunia, dan dalam agama Islam ada aturan yang mewajibkan untuk memakan makanan yang halal dan toyyib. Seperti yang tertuang dalam Al Qur'an yaitu: "*Wahai manusia, makanlah dari (makanan) yang halal dan baik yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah setan. Sesungguhnya setan itu musuh yang nyata bagimu.*" – (Q.S Al-Baqarah: 168). Dan dalam Al-Qur'an jelas tertulis bahwa babi dilarang untuk dimakan yaitu dalam surat An Nahl 114-115: "*Maka makanlah yang halal lagi baik dari rezeki yang telah diberikan Allah kepadamu; dan syukurilah nikmat Allah, jika kamu benar-benar hanya menyembah kepada-Nya. (114) Sesungguhnya Allah hanya mengharamkan atasmu bangkai, darah, daging babi, dan (hewan) yang disembelih dengan (menyebut nama) selain Allah, tetapi barangsiapa terpaksa (memakannya) bukan karena menginginkannya dan tidak pula melampaui batas, maka sesungguhnya Allah Maha Pengampun*

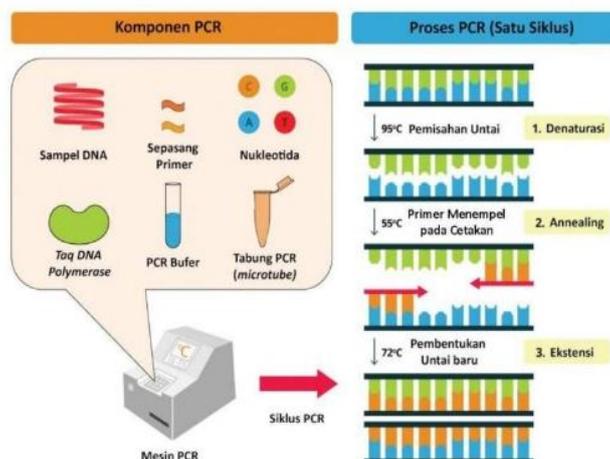
lagi Maha Penyayang. (115). Oleh karena itu, metode pengujian makanan yang memiliki kandungan babi harus diketahui dan menggunakan prosedur yang tidak sulit.

Salah satu metode sederhana dan murah adalah dengan menggunakan teknologi *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Untuk menggunakan teknologi ini, maka harus menentukan terlebih dahulu gen khas yang ada di babi untuk diperbanyak dalam reaksi PCR. Dalam penelitian ini, gen *cytochrome oxidase 1 (COX1)* menjadi pilihan yang baik karena gen ini terletak dalam mitokondria. Gen *COX1* mengkode protein *cytochrome c oxidase 1* yang merupakan sub unit utama dalam kompleks *cytochrome c oxidase*, merupakan enzim kunci dalam metabolisme aerob dan berperan sebagai pemompa proton. Gen *COX1* seringkali digunakan sebagai DNA barcode untuk mengidentifikasi spesies hewan. Laju mutasi dalam gen *COX1* cukup cepat sehingga mampu membedakan spesies yang berkerabat dekat dan memiliki bagian gen yang lestari (Hebert, dkk., 2003).



Gambar 1. Posisi primer forward dan reverse pada teknologi *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

Dari gambar 1 menunjukkan posisi primer pada Teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dalam memperbanyak gen khas yang ada pada sampel. Primer PCR terdiri dari primer forward dan reverse, yang berfungsi untuk membatasi ukuran gen yang akan dipolimerisasi. Primer PCR sangat penting dalam menentukan keberhasilan reaksi polimerisasi gen (Lorenz, 2012). Dalam penelitian ini, Gen *COX1* dari spesies babi dianalisis untuk menentukan posisi primer yang sesuai untuk reaksi polimerisasi. Empat komponen utama dari proses PCR adalah sebagai berikut: (1) DNA cetakan (DNA Template), yaitu fragmen DNA yang perlu diduplikasi; (2) primer oligonukleotida, yaitu urutan nukleotida pendek (15-25 basa) yang memulai sintesis rantai DNA; (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), yang terdiri atas 13 dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP; dan (4) enzim DNA polimerase, yang berperan sebagai katalisator reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini memfasilitasi produksi DNA melalui katalisis. Primer PCR adalah untai pendek DNA yang berukuran 15-30 pasang basa (pb) yang digunakan untuk menentukan gen yang akan dipolimerisasi dalam reaksi PCR (Widowati, est. 2013). Proses PCR terdiri dari tiga tahap, yakni denaturasi, penempelan (annealing), dan amplifikasi, ilustrasi proses PCR dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Ilustrasi tahap amplifikasi DNA pada teknologi *Polymerase Chain Reaction (PCR)* (sumber. <https://facellitate.com/advantages-and-disadvantages-of-pcr-technology/>)

Dalam penelitian ini, gen COX1 dari spesies Babi dan Sapi dianalisis dan dibandingkan urutan gen keduanya untuk melihat perbedaan dari urutan gen dari masing-masing spesies. Selanjutnya, dilakukan analisis gen COX1 dari spesies babi untuk mengetahui posisi variative dan lestari untuk digunakan sebagai pengidentifikasi spesies. Urutan gen Gen COX1 spesies babi sepanjang 1545 bp dapat dilihat pada gambar 3.

```
>lcl|AF486855.1_cds_AAQ05982.1_1 [gene=COI] [protein=cytochrome oxidase subunit I]
ATGTTTCGTAATCGTTGACTATACTCAACAAACCACAAAGACATCGGCACCCGTACCTACTATTTGGTG
CCTGAGCAGGAATAGTGGGCACGTCCTGAGCCTACTAATTCGCGCTGAACTAGGTCAGCCCGGAACCCCT
ACTTGGCGATGATCAAATCTATAATGTAATTGTTACAGCTCATGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTA
ATACCCATTATGATTGGGGTTTTGGTAACCTGACTCGTACCCTAATAATCGGAGCTCCCGATATGGCCT
TTCCACGTATAAACAACATAAGTTTCTGACTACTCCACCATCCTTCCATTACTACTGGCATCCTCAAT
AGTAGAAGCCGGGGCGGTACTGGATGAACCGTATACCCACCTTTAGCTGGAACCTTAGCCCATGCAGGA
GCTTCAGTTGATCTAACAATTTTCTCCCTACACCTTGCAGGTGTATCATCAATCCTAGGGGCTATTAATT
TCATTACCACAATTATTAACATAAAACCTCCCGCAATGTCTCAATACCAAACACCCCTGTTTGTCTGATC
AGTACTAATCAGCCGACTACTTCTACTATCCCTGCCAGTTCTAGCAGCTGGCATTACTATACTACTG
ACAGACCACAACCTGAACACAACCTTTTTGATCCAGCAGGTGGTGGAGACCCATCCTTTATCAACACT|
TATTCTGATTTTTCGGACACCCAGAAGTATATATTCTCATCTTACCAGGGTTCGGAATAATCTCCACAT
TGTAACCTACTATTTCAGGTAAAAAAGAACCATTTGGATATATAGGCATAGTATGAGCCATAATGTCCATT
GGATTCTTAGGTTTTATCGTATGGGCTCACCACATATTCACCGTAGGAATAGACGTGGATACCCGAGCAT
ACTTTACATCTGCCACAATAATCATTGCTATTCCACTGGAGTAAAAGTATTTAGTTGATTAGCTACCCCT
GCACGGCGCAATATTAATGATCACCCGAATACTATGAGCTCTGGGCTTCACTTCTTATTCACCGTA
GGAGGCTAACGGGCATTGTACTAGCTAACTCCCTCCCTAGACATTGTATTACATGATACATATTATGATG
TCGCACACTTCCACTATGTCTTATCTATAGGAGCAGTGTTCGACATTATAGGGGGCTTTGTTCACTGATT
CCCCCTATTCTCCGGGTACACACTCAACCAGCATGAGCAAAAATTCACCTTTGTAATTATATTCGTAGGA
GTAATATAACATTTTCCACAACACTTTCTAGGACTATCCGGAATACCTCGACGATACTCCGATTATC
CTGACGCATACACAGCATGAAATACTATTTCTCAATAGGCTCATTTCATCTCACTAACAGCAGTGATATT
AATAATCTTCAATCTGAGAAGCATTTCATCAAAAACGAGAAGTATCTGCAGTAGAACGACAAGCACA
AACCTAGAATGACTACACGGATGTCTCTCCCTATCACACATTTGAAGAACCACATATATCAACCTAA
AATAA
```

Gambar 3. Gen COX1 spesies babi sepanjang 1545 bp

Bagian gen yang digunakan sebagai pengidentifikasi ditentukan posisi Primernya. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis posisi perbedaan antara gen COX1 pada spesies sapi dan babi, menganalisis posisi primer gen COX1 pada babi, dan mendesain primer forward dan reverse yang tepat reaksi PCR. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA genom babi yang diambil dari makanan yang mengandung babi dan melakukan reaksi PCR untuk memperbanyak gen COX1 dengan menggunakan DNA genom babi dan primer PCR yang telah didesain sebelumnya.

2. Methodology

- a. Desain Primer PCR Gen COX1
- b. Desain primer dengan analisis in silico
- c. Isolasi DNA
- d. Reaksi PCR

2.1. Desain Primer PCR Gen COX1.

Desain Primer PCR adalah proses mendesain pasangan primer PCR yang komplemen dengan target region DNA dan dapat memulai terjadinya amplifikasi DNA. Primer PCR harus memiliki karakteristik tertentu, seperti panjang, suhu leleh, jumlah konten GC, dan spesifisitas untuk meyakinkan terjadinya reaksi PCR (Lorenz, 2012).

1. Panjang Primer

Primer yang diperlukan untuk PCR adalah primer forward (maju) dan primer reverse. Panjang basa sebaiknya 18-30 basa, dipertimbangkan dari kondisi acak yang mungkin ditemukan dalam satu urutan genom. Primer dengan panjang lebih dari 30 basa tidak disarankan karena tidak menunjukkan spesifisitas yang lebih tinggi. Primer yang panjang juga dapat menyebabkannya terhibridisasi dengan primer pasangannya (Lorenz, 2012).

2. Primer Melting Temperature (T_m)

Melting temperature atau suhu leleh merupakan temperatur yang diperlukan oleh primer untuk terdisosiasi/melepaskan ikatannya. Primer dengan T_m berkisar antar 52-58°C sangat ideal, sedangkan T_m diatas 65°C akan mengurangi efektifitas penempelan (annealing) primer sehingga

proses amplifikasi DNA akan berjalan kurang baik. Tm sangat ditentukan oleh jumlah basa GC (GC content) (Lorenz, 2012).

Rumus menghitung Tm primer:

A. $T_m (^{\circ}C) = ((G+C) \times 4) + ((A+T) \times 2)$

B. $T_m (^{\circ}C) = \{\Delta H / \Delta S + R \ln(C)\} - 273.15$

3. Suhu penempelan primer (annealing temperature /Ta)

Suhu penempelan primer adalah suhu perkiraan primer dapat berikatan dengan DNA template dengan stabil. Jika suhu penempelan primer tinggi, maka primer akan sulit menempel dengan DNA template dan sebaliknya apabila suhu penempelan rendah, maka primer menjadi kurang selektif dan tidak spesifik. Rumus menghitung suhu penempelan:

$T_a = 0.3 \times T_m(\text{primer}) + 0.7 T_m (\text{product}) - 14.9$

$T_m(\text{primer}) = T_m \text{ primer}$

$T_m(\text{produk}) = T_m \text{ produk PCR}$

4. Konten GC

Idealnya, jumlah basa G dan C dalam primer adalah 40-60%.

5. GC clamp

2.2. Desain primer dengan analisis in silico.

Analisis in silico pada desain primer adalah percobaan eksperimental dengan menggunakan simulasi computer untuk mendapatkan komposisi primer yang sesuai dengan gen target. Oleh karena itu, untuk mendesain primer PCR, gen yang digunakan sebagai templat DNA adalah gen yang sudah didaftarkan dalam gen Bank. Tabel 1 menunjukkan daftar nomor akses Template DNA gen COX1 yang digunakan sebagai dasar pembuatan primer PCR. Primer gen COX1 didesain berdasarkan penjajaran 42 gen diatas menggunakan program BioEdit. Untuk mendapatkan area lestari dan urutan basa yang terbaik digunakan analisis urutan basa menggunakan program netprimer. Primer terbaik yang terpilih disintesis sesuai dengan urutan yang telah didesain menggunakan jasa dari Macrogen

Tabel 1. Daftar gen COX1 yang digunakan dalam penjajaran.

No.	Kode Akses	Panjang basa DNA	Lokasi
1	AF304203	1545	Swedish
2	AF304202.1	1545	Landrace
3	AF304201.1	1545	Italian
4	AB298688.1	1545	Jepang
5	KT372092.1	1545	India
6	KT372091.1	1545	India
7	MF183225.1	1545	Hungaria
8	MF183224.1	1545	Hungaria
9	NC_012095.1	1545	Jepang
10	FJ236993.1	1545	Iberian
11	EU117375.1	1545	Spain
12	DQ518915.2	1545	Taiwan
13	DQ534707.2	1545	Taiwan
14	KT279758.1	1545	Australia
15	AJ002189.1	1545	Swedia
16	MF183222.1	1545	Hungaria
17	MF183223.1	1545	Hungaria
18	KT279759.	1545	Australia
19	DQ466081.2	1545	China
20	KT279760.1	1545	Australia
21	AF034253.1	1545	Taiwan
22	DQ972936.3	1545	Taiwan
23	AF486855.	1545	China
24	AF486857.1	1545	Wuhan, China
25	AF486858.1	1545	Wuhan, China
26	AF486859.1	1545	Wuhan, China
27	AF486861.1	1545	China

28	AF486865.1	1545	China
29	AF486866.1	1545	China
30	AF486873.1	1545	China
31	AF486856.1	1545	China
32	AF486860.1	1545	China
33	AF486862.1	1545	China
34	AF486864.1	1545	China
35	AF486867.1	1545	China
36	AF486868.1	1545	China
37	AF486869.1	1545	China
38	AF486870.1	1545	China
39	AF486871.1	1545	China
40	AF486872.1	1545	China
41	AF486863.1	1545	China
42	AF486874.1	1545	China

2.3. Isolasi DNA.

Untuk mendapatkan sampel DNA babi dari Indonesia, dilakukan isolasi DNA genom. Isolasi DNA menggunakan prosedur pada kit isolasi DNA merk Vivantis.

2.4. Reaksi PCR.

Reaksi PCR dilakukan untuk mendapatkan urutan gen COI dengan menggunakan templat isolasi DNA dan primer yang telah didesain (Lorenz, 2012). Formula untuk reaksi PCR berdasarkan protocol dari GoTaq Green master mix (Promega). Kondisi reaksi PCR ditunjukkan dalam alur berikut ini: denaturasi awal 95° C selama 2 menit, denaturasi 35 cycle 94°C selama 20 detik, penempelan Primer pada suhu 47-51 °C selama 30 detik, perpanjangan untai DNA pada suhu 72°C selama 2 menit dan perpanjangan untai final pada suhu 72°C selama 10 menit.

2.5. Pengurutan gen COX1.

Gen COX1 yang telah berhasil diamplifikasi akan diketahui urutan DNA nya menggunakan jasa MacroGen (Singapura). Urutan DNA yang didapatkan dianalisis dengan program DNA star untuk mengetahui kualitas DNA yang telah didapatkan. Gen COX1 yang telah didapatkan dianalisis menggunakan program Blastn (GenBank) untuk mengetahui keberhasilan primer yang telah dibuat.

3. Results and Discussion

3.1. Desain Primer.

Untuk mendapatkan primer yang tepat dalam reaksi polimerisasi gen COI dalam spesies *Sus sp*, dibutuhkan data base gen COI yang sudah ada di GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), Tabel 1 menunjukkan data base gen COI yang digunakan untuk mendapatkan primer. GenBank adalah platform yang menyimpan data gen terbanyak diseluruh dunia dan dikelola oleh Departemen Kesehatan Negara Amerika Serikat. Terdapat 42 data gen COI yang berukuran lengkap yaitu sepanjang 1.545 pasang basa. Data yang dikumpulkan berasal dari Swedia, Australia, Hungaria, Italia, Taiwan, Jepang, Spanyol, dan China. Mayoritas data berasal dari China, dan tidak ditemukan data gen COI spesies *Sus, sp.* yang berasal dari Indonesia.

Data yang telah dikumpulkan dianalisis dengan menggunakan program BioEdit untuk dilakukan penjajaran data gen dan mengamati wilayah yang lestari dari 42 gen COI tersebut. Hasil penjajaran ditunjukkan dalam gambar dibawah ini. Berdasarkan hasil penjajaran 42 gen COI yang berasal dari satu spesies yaitu *Sus scrofa*, urutan gen yang lestari ada dalam satu spesies dengan beberapa single nucleotide polymorfisme (SNP). Data ini menunjukkan bahwa gen COI dapat mengidentifikasi didalam satu spesies. Terdapat satu nukleotida yang khas yang dimiliki oleh spesies tertentu. Oleh karena itu, primer yang akan digunakan untuk reaksi polimerisasi gen COI dapat diambil dari urutan awal gen COI dan bagian akhir gen yang lestari.

Tabel 2. Kandidat primer forward

Nama primer	Sekuen	Mulai	Berhenti
F1	5'-CGTAAATCGTTGAC-3'	6	19
F2	5'-GACATCGGCACCCTGTACCTAC-3'	40	61
F3	5'- CGGCACCCTGTACCTACTATT -3'	45	65
F4	5'-GGTGCCTGAGCAGGAATAGTGG-3'	67	88

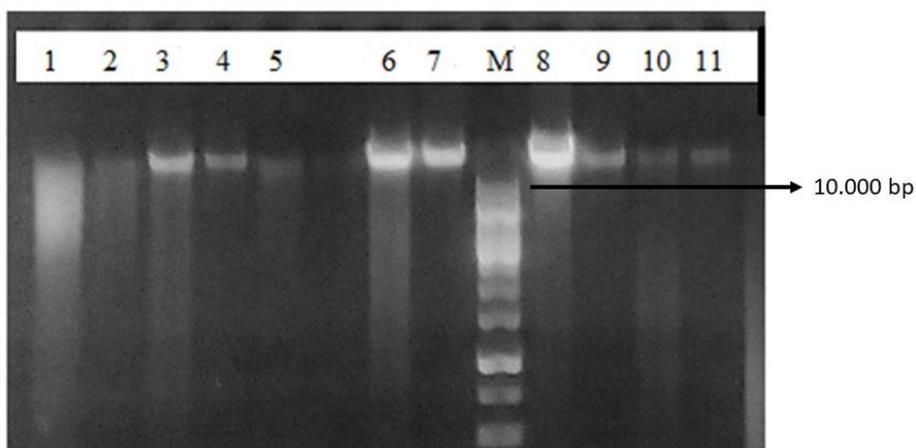
Tabel 3. Urutan kandidat primer reverse

Nama Primer	Sekuen	Mulai	Berhenti
R1	5'-TAGGGAGGAGGACATCCGTG-3'	1486	1505
R2	5'-AGGTTTGTGCTTGTGTCAG-3'	1459	1475
R3	5'- CTGCTGTTAGTGAGATGAATGAG - 3'	1371	1393

3.2. Isolasi DNA.

Sampel yang mengandung babi diidentifikasi berdasarkan komposisi makanan tersebut atau diindikasi dari sumber lain. Selanjutnya dipreparasi untuk proses ekstraksi DNA menggunakan Forensic DNA extraction kit (Vivantis). Proses ekstraksi dilakukan dengan mengikuti petunjuk penggunaan yang terdapat dalam kemasan kit tersebut. Sampel DNA yang diperoleh kemudian divisualisasi dengan elektroforesis dalam gel agarosa 1% yang mengandung 10 µg/ml etidium bromida pada 200 V selama 30 menit untuk melihat kualitasnya, lalu diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer dan disimpan pada suhu -20°C agar tidak rusak. Metode isolasi DNA digunakan untuk mendapatkan genom babi. Genom adalah kumpulan seluruh informasi genetic dalam suatu organisme. Genom terdiri dari DNA yang mengandung semua instruksi genetic yang diperlukan untuk mengatur fungsi dan perkembangan organisme (Goldman, 2016). Sampel makanan yang mengandung babi dilakukan isolasi DNA untuk mendapatkan DNA genom.

Berikut ini hasil isolasi DNA genom dari 10 sampel yang telah dilakukan menggunakan alat PCR:



gambar 2. Hasil isolasi DNA genom dari 10 sampel

Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) akan memperbanyak sekuens DNA spesifik yang terkait dengan babi. Pengujian PCR bisa spesifik untuk DNA babi, misalnya dengan menggunakan primer yang dirancang untuk mengamplifikasi fragmen DNA yang hanya ada pada spesies babi. Ketebalan pita pada produk PCR dapat dijadikan sebagai penduga konsentrasi DNA yang teramplifikasi dan kesesuaian kondisi PCR. Pita DNA yang tebal dan terang dapat menunjukkan produk tersebut memiliki konsentrasi DNA target yang lebih tinggi dibandingkan pita yang tipis

dan redup. Tebalnya pita DNA hasil PCR pada sampel menunjukkan bahwa kondisi PCR yang optimal telah tercapai, sehingga proses PCR telah berlangsung dengan baik. Hasil isolasi DNA genom ini dapat digunakan untuk kepentingan profiling dari gen babi asli Indonesia, akan tetapi perlu dilakukan Whole Genome Sekuensing untuk mendapatkan urutan gen babi dari Indonesia secara keseluruhan.

4. Conclusion

Data pengamatan urutan gen COI spesies *Sus scrofa* menunjukkan kemampuan gen untuk mengidentifikasi organisme dalam satu spesies. Perkiraan area primer yang akan digunakan adalah di bagian awal dan akhir gen COI yang lestari. Telah dilakukan isolasi DNA genom sebagai templat untuk gen mendapatkan gen COX1. Untuk kepentingan profiling dari gen babi asli Indonesia, perlu dilakukan Whole Genome Sekuensing untuk mendapatkan urutan gen babi dari Indonesia secara keseluruhan.

Acknowledgement

Pada penelitian ini kami peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada Universitas Islam Negeri Raden Fatah Palembang karena telah membantu kelancaran penelitian melalui Anggaran BLU UIN Raden Fatah Palembang

References

- A. Ni'Mah, Y. Kartikasari, A. D. Pratama, L. R. Kartikasari, B. S. Hertanto, and M. Cahyadi, "Detection of pork contamination in fresh and cooked beef using genetic marker mitochondrial- DNA cytochrome b by duplex-PCR," *J. Indones. Trop. Anim. Agric.*, vol. 41, no. 1, pp. 7–12, Mar. 016, doi: 10.14710/jitaa.41.1.7-12.
- A Setiawan, W., Handayani, K., & M Kanedi, M. K. (2021). "Pelatihan Analisis Dna Secara Sederhana Untuk Praktikum Biologi Bagi Guru Ipa Sma Di Bandar Lampung". Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
- Dual Genomic DNA Isolation Kit (Tissue). GeneDirex, Int. November 2023. <https://www.genedirex.com/product/dual-genomic-dna-isolation-kit-tissue/>.
- Faatih, M. (2009). "Isolasi dan digesti DNA kromosom". Jurusan Pendidikan Biologi FKIP Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Fitriya, R. T., Ibrahim, M., & Lisdiana, L. (2015). Keefektifan metode isolasi DNA kit dan CTAB/NaCl yang dimodifikasi pada *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. *LenteraBio*, 4(1), 87-92.
- Hariyadi, S., Narulita, E., & Rais, M. A. (2018, October). "Perbandingan Metode Lisis Jaringan Hewan dalam Proses Isolasi DNA Genom pada Organ Liver Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)". In *Proceeding Biology Education Conference* (Vol. 15, No. 1, pp. 689-692).
- Koentjoro, M. P., Wilujeng, H. S., Dilla, A., & Prasetyo, E. N. (2021). Modifikasi Metode Isolasi Dna Cetyl Trimethylammonium Bromide (Ctab) Untuk Sampel Epitel Pipi Manusia. *Journal of Indonesian Medical Laboratory and Science (JoIMedLabS)*, 2(2), 115-127.
- Mulyani, Y., Purwanto, A., & Nurruhwati, I. (2011). Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini koi herpes virus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*, 2(1).
- Murtiyaningsih, H. (2017). "Isolasi DNA genom dan identifikasi kekerabatan genetik nanas menggunakan RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA)". *Agritrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian (Journal of Agricultural Science)*, 15(1).
- R. Mariyani, Sismindari, "Validasi Metode Real- Time Polymerase Chain Reaction Untuk Deteksi DNA Babi (*Sus scrofa*) Dan Celeng (*Sus barbatus*) Pada Sosis Sapi," *J. Ilm. Indones.*, vol.6, no. 8, pp. 3296–3940, 2021.

- R. L. Puspitasari, D. Elfidasari, and A. T. Perdana, "Deteksi Kandungan Babi pada Makanan Berbahan Dasar Daging di Kampus Universitas Al Azhar Indonesia," *J. Al-AZHAR Indones. SERI SAINS DAN Teknol.*, vol. 5, no. 2, p. 66, 2019, doi: 10.36722/sst.v5i2.352.
- Riupassa, P. A. (2009). "Perancangan Primer Oligonukleotida untuk Polimerisasi in Vitro Gen Sukrosa Sintase". *Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA: A Scientific Journal*, 26(3), 131-137.
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). "Karakteristik primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk sekuensing DNA: mini review". In *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)* (pp. 93-102).
- Salsabila, N., Fadilah, F., Pramana, R. C., KA, S. M., Romzalis, A. A., Ramadhani, D. N., ... & Arianti, O. F. (2021). "Penentuan Sekuens Terbaik untuk Gen COI pada *Crocodylus rhombifer* Menggunakan SoftWare Perlprimer dan Primer Blast Sebagai Bentuk Praktikum Saat Pandemi Covid-19". *Indonesian Journal of Science Learning (IJSL)*, 2(1), 15-21.
- Tang YQ, Weng N. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. *Bioanalysis*. 2013 Jun;5(12):1583-98. doi: 10.4155/bio.13.117. PMID: 23795935
- Triani, N. (2020). Isolasi DNA tanaman jeruk dengan menggunakan metode CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide). *G-Tech: Jurnal Teknologi Terapan*, 3(2), 221-226.
- Widowati, Esti W. 2013. Desain Primer Sitokrom B (Cyt B) Sebagai Salah Satu Komponen Pcr (Polymerase Chain Reaction) Untuk Deteksi Dna Babi. Lembaga Penelitian Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga Yogyakarta.
- Yulianti, E. (2006). "Pengembangan teknik isolasi DNA tumbuhan menggunakan detergen komersial". In *Seminar Nasional MIPA (Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA serta Peranannya dalam Peningkatan Keprofesionalan Pendidik dan Tenaga Kependidikan)* pada tanggal (Vol. 1, pp. 71-85).
- Y. Yobelanno Sitompul and S. Artanto, "Desain Primer Berdasarkan Gen Mt-12s Rrna untuk Mendeteksi Cemar Daging Babi pada Produk Olahan Asal Daging Sapi dengan Metode Multiplex-Pcr Designed Primers Based on Mt-12s rRNA Gene to Detect the Adulteration of Pork in Beef Product Using Multiplex-PCR Method," *ACTA Vet. Indones.*, vol. 8, no. 2, pp.24-30, 2020, Online. Available: <http://www.journal.ipb.ac.id/index.php/actavetindones>.