

**DESAIN PRIMER *MULTIPLEX* HRMA UNTUK DETEKSI DNA AYAM,
SAPI, BABI, DAN TIKUS SECARA *IN SILICO***

SKRIPSI

*Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi*



oleh:

Alfi Hanifah Prameswari

2100457

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA
2025**

LEMBAR HAK CIPTA

DESAIN PRIMER *MULTIPLEX* HRMA UNTUK DETEKSI DNA AYAM, SAPI, BABI, DAN TIKUS SECARA *IN SILICO*

Oleh

Alfi Hanifah Prameswari

Sebuah Skripsi yang diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains pada Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

© Alfi Hanifah Prameswari 2025

Universitas Pendidikan Indonesia

Agustus 2025

Hak Cipta dilindungi undang-undang.

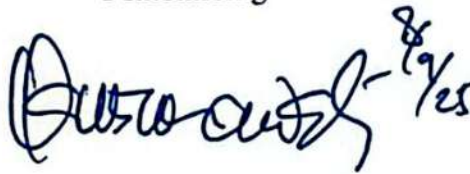
Skripsi ini tidak boleh diperbanyak seluruhnya atau sebagian,
dengan dicetak ulang, difotokopi, atau cara lainnya tanpa izin dari penulis.

LEMBAR PENGESAHAN
ALFI HANIFAH PRAMESWARI

**(DESAIN PRIMER *MULTIPLEX* HRMA UNTUK DETEKSI DNA AYAM,
SAPI, BABI, DAN TIKUS SECARA *IN SILICO*)**

Disetujui dan disahkan oleh pembimbing

Pembimbing

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Diah Kusumawaty', with a date '8/9/25' written to the right.

Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si.

NIP. 197008112001122001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Wahyu Surakusumah', with a date '8/9/25' written to the right.

Dr. Wahyu Surakusumah, M.T.

NIP. 197212031999031001

PERNYATAAN MAHASISWA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Alfi Hanifah Prameswari

NIM : 2100457

Program Studi (S1): Biologi

dengan ini menyatakan bahwa:

1. Penelitian yang saya lakukan berjudul **“DESAIN PRIMER MULTIPLEX HRMA UNTUK DETEKSI DNA AYAM, SAPI, BABI, DAN TIKUS SECARA *IN SILICO*”** merupakan bagian dari penelitian payung serta didanai sepenuhnya oleh dosen pembimbing dengan data terlampir;
 - a) Judul penelitian payung **“Pengembangan Penanda DNA Multipleks PCR HRMA untuk Deteksi DNA Tikus, Sapi, Babi dan Ayam pada makanan olahan daging”**
 - b) Jenis Hibah : Hibah Fundamental berdasarkan Surat Keputusan Direktur Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Nomor 0419/C3/DT.05.00/2025 tanggal 22 Mei 2025 dan Kontrak Pelaksanaan Penelitian Tahun Anggaran 2025 Nomor 547/UN40.D/PT.01.01/2025
 - c) Nama Dosen Pembimbing : Dr. Diah Kusumawaty,M.Si
NIP/NIDN : 197008112001122001/001108197005
2. Sehubungan dengan pendanaan tersebut, saya menyatakan bahwa seluruh **hak publikasi ilmiah** (baik dalam bentuk artikel, prosiding, maupun media ilmiah lainnya) dari penelitian ini saya serahkan kepada dosen pembimbing sebagai penanggung jawab hibah.
3. Saya menyadari bahwa publikasi yang dihasilkan akan tercantum juga atas nama dosen pembimbing beserta penulis lainnya sesuai dengan kebijakan akademik dan kesepakatan penelitian.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Bandung, 9 September 2025

Mahasiswa yang membuat pernyataan,



Alfi Hanifah Prameswari

LEMBAR PERNYATAAN

*Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang berjudul, “**DESAIN PRIMER MULTIPLEX HRMA UNTUK DETEKSI DNA AYAM, SAPI, BABI, DAN TIKUS SECARA IN SILICO**” beserta seluruh isinya adalah benar-benar karya saya sendiri, dan saya tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan dengan cara-cara yang tidak sesuai dengan etika ilmu yang berlaku dalam masyarakat keilmuan. Atas pernyataan tersebut, saya siap menanggung risiko yang dijatuhkan kepada saya apabila di kemudian hari ditemukan adanya pelanggaran etika keilmuan dalam karya ini, atau ada klaim dari pihak lain terhadap keaslian karya saya.*

Bandung, Agustus 2025

Alfi Hanifah Prameswari

NIM. 2100457

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul " **DESAIN PRIMER *MULTIPLEX* HRMA UNTUK DETEKSI DNA AYAM, SAPI, BABI, DAN TIKUS SECARA *IN SILICO***". Penulisan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan pada Program Studi Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

Skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik berkat adanya bantuan, bimbingan, dukungan, dan doa dari berbagai pihak selama proses penyusunan. Oleh karena itu, penulis menyampaikan penghargaan dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Kedua orang tua tercinta, Bapak Andri Setiyoso dan Ibu Wahyu Windarti, yang dengan penuh kasih sayang, kesabaran, dan ketulusan telah memberikan dukungan moral, spiritual, dan materiil yang tiada henti, serta doa yang senantiasa mengiringi setiap langkah penulis. Ucapan terima kasih pun tak luput untuk adik-adik penulis, Azmi Sani Winasis dan Auni Maritza Kinanti, yang selalu memberikan semangat, keceriaan, dan dukungan selama masa perkuliahan hingga penyelesaian skripsi ini.
2. Ibu Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si., selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan arahan, bimbingan, masukan, dan motivasi yang sangat berarti bagi penulis dari awal hingga akhir penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Dr. Wahyu Surakusumah, S.Si., M.T., selaku Ketua Program Studi Biologi FPMIPA UPI yang telah memberikan dukungan dan fasilitas selama proses perkuliahan hingga penyusunan skripsi.
4. Bapak (alm.) Prof. Yayan Sanjaya, M.Si., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik sekaligus yang pernah menjadi Dosen Pembimbing II, yang semasa hidupnya telah memberikan ilmu, arahan, dan inspirasi berharga bagi penulis.

5. Seluruh Bapak dan Ibu Dosen Biologi FPMIPA UPI yang telah membekali penulis dengan ilmu pengetahuan dan pengalaman selama menempuh pendidikan di Program Studi Biologi.
6. Para sahabat tersayang: Tami Sedlakova, Allen Dirgantara Chandraputra, Fasya Amelia Rahmadhiani, Malva Sahlia, Ajeng Berliany Wulandari, dan Salwa Faishal Alkatiri, yang senantiasa mendukung, menyemangati, dan menemani penulis dalam suka dan duka, khususnya sejak masa sekolah hingga saat ini.
7. Teman-teman selama masa perkuliahan: Cindy Puspita, Tsani Khofifah, Shella Nurhaliza Rindengan, Lisna Wahyu Nurani, Dini Indriani, Halisa, dan Hilda Nur Azizah Rahardi, yang telah menjadi bagian penting dalam perjalanan akademik penulis.
8. Seluruh teman-teman Biologi C 2021, atas kebersamaan, kerja sama, dan kenangan yang telah tercipta selama menempuh pendidikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, baik dari segi isi maupun penyajiannya. Oleh karena itu, saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan demi perbaikan di masa yang akan datang. Akhir kata, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan berkontribusi pada pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang biologi molekuler dan bioteknologi.

Bandung, Agustus 2025

Alfi Hanifah Prameswari

ABSTRAK

Produk pangan olahan berbasis daging di Indonesia memiliki kerentanan terhadap pemalsuan bahan dan kontaminasi silang yang dapat berdampak pada keamanan, kehalalan, dan kepercayaan konsumen. Kontaminasi bahan non-halal pada produk olahan daging di Indonesia menjadi isu penting terkait keamanan pangan dan kepatuhan terhadap standar halal. Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan mengoptimasi primer spesifik guna mengidentifikasi daging ayam, sapi, babi, tikus, dan kontrol internal menggunakan metode *Multiplex High-Resolution Melting Analysis* (HRMA) secara *in silico*. Data genom mitokondria teranotasi lengkap diunduh dari *GeneBank*. Desain primer dilakukan menggunakan Primer-BLAST, diikuti dengan uji spesifisitas melalui BLASTn dan *PCRTTest*, simulasi suhu leleh (T_m) dan kurva *melting* dengan uMELT, serta evaluasi kompatibilitas primer menggunakan *PrimerPooler*. Kombinasi primer terpilih adalah Ayam 1, Sapi 1, Babi 9, Tikus 4, dan pGEM-t 2 yang menunjukkan perbedaan T_m minimal 1,4°C tanpa tumpang tindih kurva sehingga memungkinkan pemisahan puncak secara jelas dalam analisis HRMA. Analisis termodinamik menunjukkan tidak ada interaksi dimer signifikan ($\Delta G \leq -7$ kcal/mol), dan semua primer mampu mengamplifikasi target masing-masing. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa desain primer memiliki spesifisitas tinggi, kompatibilitas untuk PCR *multiplex*, serta potensi diaplikasikan pada deteksi kontaminasi silang dalam pangan. Temuan ini dapat menjadi langkah awal menuju pengembangan metode autentikasi berbasis HRMA yang cepat, akurat, dan relevan bagi pengawasan pangan halal di Indonesia. Namun, validasi *in vitro* dan pengujian pada matriks pangan nyata diperlukan untuk memastikan performa di laboratorium.

Kata kunci: HRMA, *multiplex*, primer, identifikasi daging, *in silico*

ABSTRACT

Processed meat-based food products in Indonesia are vulnerable to ingredient adulteration and cross-contamination, which may affect safety, halal compliance, and consumer trust. The contamination of processed meat products with non-halal ingredients is a critical issue related to food safety and adherence to halal standards. This study aimed to design and optimize specific primers to identify chicken, cattle, pork, rat, and an internal control using the in silico Multiplex High-Resolution Melting Analysis (HRMA) method. Complete annotated mitochondrial genome data were downloaded from GeneBank. Primer design was conducted using Primer-BLAST, followed by specificity testing through BLASTn and PCR Test, melting temperature (T_m) and melting curve simulation with uMELT, and primer compatibility evaluation using PrimerPooler. The selected primer combination (Chicken 1, Cattle 1, Pig 9, Rat 4, and pGEM-t 2) demonstrated a minimum T_m difference of 1.4°C without curve overlap, enabling clear peak separation in HRMA analysis. Thermodynamic analysis indicated no significant dimer interactions ($\Delta G \leq -7$ kcal/mol), and all primers successfully amplified their respective targets. These results demonstrate that the designed primers possess high specificity, compatibility for multiplex PCR, and potential application in detecting cross-contamination in food. This finding may serve as an initial step toward developing a rapid, accurate, and HRMA-based authentication method relevant to halal food monitoring in Indonesia. Nevertheless, in vitro validation and testing on real food matrices are necessary to confirm laboratory performance.

Keywords: *HRMA, multiplex, primers, meat identification, in silico*

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Pertanyaan Penelitian	6
1.4. Batasan Penelitian	6
1.5. Tujuan Penelitian.....	7
1.6. Manfaat Penelitian.....	7
1.7. Struktur Penulisan Skripsi.....	7
BAB II PENANDA MOLEKULER UNTUK AUTENTIKASI HALAL.....	9
2.1. Kehalalan Pangan dan Regulasinya di Indonesia.....	9
2.2. Penanda Genetik dan Molekuler	10
2.3. Metode Deteksi DNA <i>Species</i> dalam Produk Pangan.....	11
2.4. <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (DNA) Sebagai Penanda Molekuler	12
2.4.1. Pengertian DNA.....	12
2.4.2. Struktur Molekul DNA	12
2.4.3. Replikasi DNA.....	14
2.5. Genom Mitokondria untuk Pembuatan Primer	15
2.6. <i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (qRT-PCR)	18
2.7. Penggunaan Primer pada PCR untuk Deteksi DNA	21
2.8. Metode <i>High Resolution Melting Analysis</i> (HRMA)	22
2.9. <i>Species</i> yang Dipakai untuk Desain Primer (Meliputi Ayam, Sapi, Babi, dan Tikus, serta Kontrol Internal)	25

2.9.1. Ayam (<i>Gallus gallus</i>).....	25
2.9.2. Sapi (<i>Bos taurus</i>).....	26
2.9.3. Babi (<i>Sus scrofa</i> dan <i>Sus scrofa domesticus</i>).....	27
2.9.4. Tikus (<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Rattus rattus</i> , dan <i>Rattus argentiventer</i>)....	28
2.9.5. Kontrol Internal dalam PCR	29
2.10. Desain Primer <i>Multiplex</i> PCR	29
2.11. Peran Analisis <i>In Silico</i> untuk Autentikasi Halal	30
2.12. Situs <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI) sebagai <i>GeneBank</i>	31
2.13. Fitur Primer-BLAST untuk Perancangan Primer	31
2.14. <i>Sequence Manipulation Suite</i> (SMS) untuk Simulasi PCR secara <i>In Silico</i>	32
2.15. Simulasi Kompatibilitas Primer <i>Multiplex</i> pada Perangkat Lunak <i>PrimerPooler</i>	33
2.16. Visualisasi Kurva Leleh Amplikon di Situs uMELT	33
2.17. Perangkat Lunak BioEdit untuk Penyelarasan Sekuens Genom	34
BAB III METODE PENELITIAN	35
3.1. Jenis Penelitian	35
3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian.....	35
3.3. Alat dan Bahan Penelitian	35
3.4. Prosedur Penelitian.....	36
3.4.1. Persiapan Alat dan Data Sekunder.....	37
3.4.2. Pengumpulan Data Genom	37
3.4.3. Perancangan Primer <i>Multiplex</i>	38
3.4.4. Simulasi dan Optimasi Primer <i>Multiplex</i> PCR secara <i>In silico</i>	39
3.5. Pengujian Spesifisitas Primer	41
3.6. Alur Penelitian.....	42
BAB IV TEMUAN DAN PEMBAHASAN	43
4.1. Pencarian Data Genom	43
4.1.1. Pencarian Data Genom Ayam, Sapi, Babi, Tikus, dan Kontrol Internal	43
4.1.2. Pembuatan <i>Alignment</i> dan Sekuens Konsensus Babi dan Tikus Menggunakan Aplikasi Bioedit.....	51

4.1.3. Verifikasi Homologi Sekuens Konsensus.....	56
4.2. Desain Primer Menggunakan Primer-BLAST	58
4.3. Analisis <i>Range</i> dan <i>Peak</i> Amplikon, serta Visualisasi Amplikon	67
4.3.1. Analisis Amplikon Primer Ayam, Sapi, Babi, Tikus, dan pGEM-t.....	67
4.3.2. Visualisasi Amplikon Primer Ayam, Sapi, Babi, Tikus, dan pGEM-t	72
4.4 Analisis Simulasi <i>In Silico</i> Kombinasi Pasangan Primer.....	84
4.5. Verifikasi Homologi Pasangan Primer di Fitur Primer-BLAST	93
BAB V SIMPULAN, IMPLIKASI, DAN REKOMENDASI	98
5.1. Simpulan.....	98
5.2. Implikasi.....	98
5.3. Rekomendasi	99
DAFTAR PUSTAKA.....	100
LAMPIRAN.....	113

DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Alat yang Digunakan	36
Tabel 3. 2 Bahan yang Digunakan.....	36
Tabel 4.1 Daftar Hasil Pencarian Data Genom <i>Gallus gallus</i> di <i>GeneBank</i>	44
Tabel 4. 2 Daftar Hasil Pencarian Data Genom <i>Bos taurus</i> di <i>GeneBank</i>	44
Tabel 4. 3 Daftar Hasil Pencarian Data Genom <i>Sus scrofa</i> di <i>GeneBank</i>	45
Tabel 4. 4 Daftar Hasil Pencarian Data Genom <i>Sus scrofa domesticus</i> di <i>GeneBank</i>	45
Tabel 4. 5 Daftar Hasil Pencarian Data Genom <i>Rattus norvegicus</i> di <i>GeneBank</i>	46
Tabel 4. 6 Daftar Hasil Pencarian Data Genom <i>Rattus rattus</i> dan <i>Rattus</i> <i>argentiventer</i> di <i>GeneBank</i>	46
Tabel 4. 7 Desain Primer Ayam dari Primer-BLAST	59
Tabel 4. 8 Desain Primer Sapi dari Primer-BLAST	59
Tabel 4. 9 Desain Primer Babi dari Primer-BLAST.....	60
Tabel 4. 10 Desain Primer Tikus dari Primer-BLAST	60
Tabel 4. 11 Desain Primer pGEM-t dari Primer-BLAST	61
Tabel 4. 12 <i>Range</i> Tm, Kandungan GC dan Panjang Amplikon Ayam.....	68
Tabel 4. 13 <i>Range</i> Tm, Kandungan GC dan Panjang Amplikon Sapi.....	68
Tabel 4. 14 <i>Range</i> Tm, Kandungan GC dan Panjang Amplikon Babi	68
Tabel 4. 15 <i>Range</i> Tm, Kandungan GC dan Panjang Amplikon Tikus	69
Tabel 4. 16 <i>Range</i> Tm, Kandungan GC dan Panjang Amplikon pGEM-t.....	69
Tabel 4. 17 Hasil Pemilihan Primer Berdasarkan Simulasi uMELT	86
Tabel 4. 18 Hasil BLAST Pasangan Primer yang Dipilih	94

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Struktur Molekuler DNA (Fridovich-Keil, 2022).....	13
Gambar 2. 2 Replikasi DNA (Lubischer, 2007)	15
Gambar 2. 3 Struktur Mitokondria (Andrieux <i>et al.</i> , 2021)	16
Gambar 2. 4 Model Alur qRT-PCR. (Heid <i>et al.</i> , 1996; Aini <i>et al.</i> , 2023).....	20
Gambar 2. 5 HRMA <i>Singleplex</i> (Dehbashi, 2022)	23
Gambar 2. 6 HRMA <i>Multiplex</i> (Skrzypczak-Zielinska <i>et al.</i> , 2016).....	23
Gambar 2. 7 Ayam (<i>Gallus gallus</i>).....	25
Gambar 2. 8 Sapi (<i>Bos taurus</i>)	26
Gambar 2. 9 Babi Hutan (<i>Sus scrofa</i>).....	27
Gambar 2. 10 Babi Ternak (<i>Sus scrofa domesticus</i>).....	27
Gambar 2. 11 Tikus Cokelat (<i>Rattus norvegicus</i>).....	28
Gambar 2. 12 Tikus Rumah (<i>Rattus rattus</i>).....	28
Gambar 2. 13 Tikus Sawah (<i>Rattus argentiventer</i>) (iNaturalist).....	28
Gambar 3. 1 Diagram Alur Penelitian	42
Gambar 4. 1 Katalog pGEM-t Promega	47
Gambar 4. 2 Katalog pGEM-t Vector Addgene.....	47
Gambar 4. 3 <i>Alignment</i> Sekuens pGEM-t dengan pGEM-5Zf(+)......	48
Gambar 4. 4 Tampilan Sekuens <i>Sus scrofa</i> dan <i>Sus scrofa domesticus</i> Sebelum <i>Alignment</i> di Aplikasi BioEdit.....	51
Gambar 4. 5 Tampilan Sekuens <i>Sus scrofa</i> dan <i>Sus scrofa domesticus</i> Sesudah <i>Alignment</i> di Aplikasi BioEdit.....	51
Gambar 4. 6 Panjang Total Sekuens <i>Sus scrofa</i> dan <i>Sus scrofa domesticus</i> Sesudah <i>Alignment</i> di Aplikasi BioEdit	52
Gambar 4. 7 Tampilan Konsensus Sekuens <i>Sus scrofa</i> dan <i>Sus scrofa domesticus</i> Sesudah <i>Alignment</i> di Perangkat Lunak BioEdit.....	52
Gambar 4. 8 Tampilan Beberapa <i>Gap</i> pada Sekuens Konsensus <i>Sus scrofa</i> dan <i>Sus</i> <i>scrofa domesticus</i> Sesudah <i>Alignment</i> di Aplikasi BioEdit	53
Gambar 4. 9 Tampilan Sekuens Konsensus Daerah Konservasi <i>Sus scrofa</i> dan <i>Sus</i> <i>scrofa domesticus</i>	53
Gambar 4. 10 Tampilan Sekuens <i>Rattus rattus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , dan <i>Rattus</i> <i>argentiventer</i> Sebelum <i>Alignment</i> di Aplikasi BioEdit.....	54

Gambar 4. 11	Tampilan Sekuens <i>Rattus rattus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , dan <i>Rattus argentiventer</i> Sesudah <i>Alignment</i> di Aplikasi BioEdit.....	54
Gambar 4. 12	Panjang Total Sekuens <i>Rattus rattus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , dan <i>Rattus argentiventer</i> Sesudah <i>Alignment</i> di Aplikasi BioEdit	54
Gambar 4. 13	Tampilan Konsensus Sekuens <i>Rattus rattus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , dan <i>Rattus argentiventer</i> Sesudah <i>Alignment</i> di Perangkat Lunak BioEdit	54
Gambar 4. 14	Basa <i>Degenerate</i> Konsensus dari <i>Rattus rattus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Rattus argentiventer</i> yang Diedit Menjadi Basa <i>Non-Degenerate</i>	55
Gambar 4. 15	Hasil BLASTn Sekuens Konsensus daerah Konservasi <i>Sus scrofa</i> dan <i>Sus scrofa domesticus</i>	56
Gambar 4. 16	Hasil BLASTn Sekuens Konsensus dari <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Rattus rattus</i> , <i>Rattus argentiventer</i>	57
Gambar 4. 17	Visualisasi Tm Primer Ayam. Huruf yang berada di atas kurva leleh menandakan masing-masing pasangan primer.....	73
Gambar 4. 18	Visualisasi Tm Primer Sapi. Huruf yang berada di atas kurva leleh menandakan masing-masing pasangan primer.....	74
Gambar 4. 19	Visualisasi Tm Primer Babi. Huruf yang berada di atas kurva leleh menandakan masing-masing pasangan primer.....	74
Gambar 4. 20	Visualisasi Tm Primer Tikus. Huruf yang berada di atas kurva leleh menandakan masing-masing pasangan primer.....	76
Gambar 4. 21	Visualisasi Tm Primer pGEM-t. Huruf yang berada di atas kurva leleh menandakan masing-masing pasangan primer.	77
Gambar 4. 22	Visualisasi Tm <i>Multiplex</i> di Situs uMELT. Huruf yang berada di atas kurva leleh menandakan masing-masing pasangan primer.....	87
Gambar 4. 23	Rentang ΔG Simulasi <i>Multiplex PrimerPooler</i>	89
Gambar 4. 24	Hasil Amplikon Simulasi <i>Multiplex PrimerPooler</i>	90
Gambar 4. 25	Analisis Visualisasi Tm <i>Multiplex</i> dari penelitian Denyinghot <i>et al.</i> (2021) di Situs uMELT. Huruf yang berada di atas kurva leleh menandakan masing-masing pasangan primer.	92
Gambar 4. 26	Posisi Primer Babi 9 pada Konsensus Sekuens Babi.....	96

Gambar 4. 27 Posisi Primer <i>Forward</i> dan <i>Reverse</i> Tikus 4 pada Konsensus Sekuens Tikus.....	97
--	----

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran I. Pencarian Data Genom.....	113
Lampiran II. <i>Alignment</i> Sekuens Genom.....	117
Lampiran III. Verifikasi Homologi Sekuens Hasil <i>Alignment</i>	121
Lampiran IV. Perancangan Primer <i>Multiplex</i> di Primer-BLAST	122
Lampiran V. Simulasi PCR pada <i>Sequence Manipulation Suite</i> Bioinformatics org	127
Lampiran VI. Simulasi Tm pada uMELT	132
Lampiran VII. Simulasi Kompatibilitas pada <i>PrimerPooler</i>	134
Lampiran VIII. Verifikasi Spesifisitas Primer	135

DAFTAR PUSTAKA

- Addgene. (n.d.). pGEM-T vector. Addgene. [Online] Diakses pada tanggal 3 Juli 2025, dari <https://www.addgene.org/vector-database/2854/>
- Adhikari, P., Han, S. H., Kim, Y. K., Kim, T. W., Thapa, T. B., Subedi, N., Kunwar, A., Banjade, M., & Oh, H. S. (2018). New record of the Oriental house rat, *Rattus tanezumi*, in Nepal inferred from mitochondrial Cytochrome B gene sequences. *Mitochondrial DNA. Part B, Resources*, 3(1), 386–390. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1436991>
- Aini, S.R., Kurniasih, K.S.I., Rohman, A., Mulyanto, Erwanto, Y., Windarsih, A. dan Bakar, N.K.A. (2023). The employment of Real-Time Polymerase Chain Reaction coupled with species-specific primer for analysis of wild boar meat for halal authentication. *Food Research*. 7(4), 114-121. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.7\(4\).463](https://doi.org/10.26656/fr.2017.7(4).463)
- Alamsyah, A., Basuki, E., Prarudiyanto, A., Cicilia, S. (2019). Diversifikasi Produk Olahan Daging Ayam. *Jurnal Abadi Mas TPB*. 1 (1), 63-69.
- Asryadin, A., Yuniati, N. I., Khasanah, N. A. H., Aqwam, A., Khairunnisa, R., Endang, H. K., Nurhidayah, J., Wahyono, D. D., & Yuniaty, A. (2024). Bioinformatics Techniques for Developing Molecular Detection Methods for the HIV-1 Gag Gene. *European Journal of Biomedical Research*, 3(4), 1–4. <https://doi.org/10.24018/ejbiomed.2024.3.4.97>
- Assal, N., & Lin, M. (2021). PCR procedures to amplify GC-rich DNA sequences of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Microbiological Methods*, 181, 106121. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106121>
- Astari, D. D., Dewi, S. G., Setyaningrum, S., & Lidya, B. (2021). Perancangan Primer untuk Deteksi Kandungan Gen Cytochrome b Babi dengan Metode Polymerase Chain Reaction dan Aplikasinya pada Berbagai Produk Industri. *Fullerene Journal of Chemistry*, 6(2), 110-117.
- Badonia, M., Patidar, S., & Sharma, C. K. (2020). Molecular markers: An uprising tool for crop improvement. *Research on Crops*, 21(4), 852–861. <https://doi.org/10.31830/2348-7542.2020.130>
- Bakar, M.-A. A. A., Rovie-Ryan, J. J., Ampeng, A., Yaakop, S., Nor, S. M., & Md-Zain, B. M. (2017). Optimisation of polymerase chain reaction conditions to amplify D-loop region in the Malaysian mousedeer genomic DNA. *Malaysian Applied Biology*, 46(4), 63-71.
- Banaganapalli, B., Shaik, N. A., Rashidi, O. M., Jamalalail, B., Bahattab, R., Bokhari, H. A., Alqahtani, F., Kaleemuddin, M., Al-Aama, J. Y., & Elango, R. (2019). *In silico* PCR. In *Essentials of Bioinformatics, Volume I: Understanding Bioinformatics: Genes to Proteins* (pp. 355-371). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02634-9_16
- Bartlett, J. M. S., dan Stirling D. A. (2003). Short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular Biology*. Vol 226. 3-6.
- Barton, L., Bingham, B., Sankaranarayanan, K., Monroe, C., Thomas, A., & Kemp, B. M. (2020). The earliest farmers of northwest China exploited grain-fed pheasants not chickens. *Scientific Reports*, 10(1), Article 2556. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59316-5>
- Bempah, R. T. (2017). Polres Bogor Amankan 7 Orang Terkait Bakso Oplosan Daging Babi. [Online] Diakses pada tanggal 2 Januari 2025.

- [https://regional.kompas.com/read/2017/05/30/14192801/polres.bogor.aman kan.7.orang.terkait.bakso.oplosan.daging.babi](https://regional.kompas.com/read/2017/05/30/14192801/polres.bogor.aman%20kan.7.orang.terkait.bakso.oplosan.daging.babi)
- Bhumika, C., Misra, M., & Bindu, S. (2022). *In silico* pcr primer designing using mitochondrial (cox-1) gene of clinostomum marginatum. International Journal of Zoological Investigations, 08(02), 671-673. <https://doi.org/10.33745/ijzi.2022.v08i02.081>
- Bjornsti, M.-A., & Kaufmann, S. H. (2019). Topoisomerases and cancer chemotherapy: Recent advances and unanswered questions. F1000Research, 8, Article 1704. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20201.1>
- British Association for Shooting and Conservation. (n.d.). Wild boar. [Online] Diakses pada 10 Agustus 2025, from <https://basc.org.uk/deer/wild-boar/>
- Brown, S. S., Chen, Y.-W., Wang, M., Clipson, A., Ochoa, E., & Du, M.-Q. (2017). PrimerPooler: Automated primer *pooling* to prepare library for targeted sequencing. Biology Methods and Protocols, 2(1), bpx006. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpx006>
- Browne, P. D., Nielsen, T. K., Kot, W., Aggerholm, A., Gilbert, M. T. P., Puetz, L., Rasmussen, M., Zervas, A., & Hansen, L. H. (2020). GC bias affects genomic and metagenomic reconstructions, underrepresenting GC-poor organisms. GigaScience, 9(2), giaa008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa008>
- Bruzzone, C. M., Tawadros, P. S., Boardman, L. A., & Steer, C. J. (2013). Enhanced primer selection and synthetic amplicon *templates* optimize high-resolution *melting* analysis of single-nucleotide polymorphisms in a large population. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 17(9), 675–680. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2013.0113>
- Bustin, S. A., Mueller, R., & Nolan, T. (2020). Parameters for successful PCR primer design. Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols, 5-22.
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2008). Biology. 8th ed. Pearson Education, Inc.
- Charles Darwin Foundation. (n.d.). Rattus norvegicus Berkenhout, 1769. Galapagos Species Database. [Online] Diakses pada 10 Agustus 2025, from <https://datazone.darwinfoundation.org/en/checklist/?species=5244datazone.darwinfoundation.org>
- Chen, H., Dong, H., Yuan, H., Shan, W., Zhou, Q., Li, X., ... & Ma, Y. (2023). Mitochondrial COI and Cytb gene as valid molecular identification marker of sandfly species (Diptera: Psychodidae) in China. Acta Tropica, 238, 106798. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106798>
- Chen, K., Jiang, C., Yuan, Y., & Huang, L.-Q. (2015). High resolution *melting* and its application in identity study of traditional Chinese medicine. Yaoxue Xuebao, 50(12), 1581–1588.
- Chen, Y., & Zhao, J. (2019). Utilizing online tools for effective primer design in *multiplex* PCR: A review. Bioinformatics Advances, 2(1), 34-48. <https://doi.org/10.1016/j.biaad.2019.100004>
- CNBC Indonesia. (2019, December 27). Teror flu babi, amit-amit RI senasib seperti China. CNBC Indonesia. [Online] Diakses pada 11 Agustus 2025 <https://www.cnbcindonesia.com/news/20191227165006-4-126131/teror-flu-babi-amit-amit-ri-senasib-seperti-china>
- Connell, J. R., Benton, M. C., Lea, R. A., Sutherland, H. G., Chaseling, J., Haupt, L. M., Wright, K. M., & Griffiths, L. R. (2022). Pedigree derived mutation rate across the entire mitochondrial genome of the Norfolk Island population.

- Scientific Reports, 12(1), Article 6827. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10530-3>
- Dai, P., & Rudge, D. (2018). Using the discovery of the structure of DNA to illustrate cultural aspects of science. *American Biology Teacher*, 80(4), 256–262. <https://doi.org/10.1525/abt.2018.80.4.256>
- Dehbashi, S., Tahmasebi, H., Alikhani, M. Y., Keramat, F., & Arabestani, M. R. (2022). Optimization and development of high-resolution melting curve analysis (HRMA) assay for detection of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) producing *Pseudomonas aeruginosa*. *AIMS microbiology*, 8(2), 178.
- Denyingyhot, A., Phraephaisarn, C., Vesaratchavest, M., Dahlan, W., & Keeratipibul, S. (2021). A new tool for quality control to monitor contamination of six non-halal meats in food industry by *multiplex* High-Resolution Melting Analysis (HRMA). *NFS Journal*, 25, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2021.09.002>
- Denyingyhot, A., Srinulgray, T., Mahamad, P., Ruangprach, A., Sa, S., Saerae, T., ... & Keeratipibul, S. (2022). Modern on-site tool for monitoring contamination of halal meat with products from five non-halal animals using *multiplex* Polymerase Chain Reaction coupled with DNA strip. *Food Control*, 132, 108540.
- Devi, N. W. A. S., & Yowani, S. C. (2025). Desain Primer Secara *In silico* untuk Amplifikasi Mutagenesis GLY349→GLU349 pada Gen Glikoprotein Virus Rabies Strain GD-SH-01 sebagai Kandidat Marker Attenuasi. *Innovative: Journal Of Social Science Research*, 5(4), 1141-1152.
- Dewi, D. I. (2010). Tikus sawah (*Rattus argentiventer*, Robinson & Kloss, 1916). *Jurnal Litbang Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang Banjarnegara*, 6(1). <https://doi.org/10.22435/balaba.v6i1.Jun.1718>
- Dinas Ketahanan Pangan dan Pertanian Kabupaten Seruyan. (2022). Pengemukan sapi. Dinas Ketahanan Pangan dan Pertanian Kabupaten Seruyan. [Online] Diakses pada 11 Agustus 2025 <https://dkpp.seruyankab.go.id/pengemukan-sapi/>
- Dinh, H. T. T., Nguyen, M. N., & Hoang, S. X. (2022). In-vitro synthesis of RNA fragments specifying envelope protein gene and RdRp gene of SARS-CoV-2 as positive standards for molecular diagnosis tests. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 64(4), 60–63. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.64\(4\).60-63](https://doi.org/10.31276/VJSTE.64(4).60-63)
- Dona, R., Frimayanti, N., Ikhtiarudin, I., Iskandar, B., Maulana, F., Silalahi, N. (2019). Studi *In silico*, Sintesis, dan Uji Sitotokik Senyawa P-Metoksi Kalkon terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. <https://doi.org/10.25077/jsfk.6.3.243-249.2019>
- Donahue, C. J., Adair, A. A., Wright, L. K., Newman, D. L., (2019). A Close-Up Look at PCR. Course Source. Vol 6.
- Dule, E. J., Kinimi, E., Bakari, G. G., Max, R. A., Lyimo, C. M., & Mushi, J. R. (2024). Species authentication in meat products sold in Kilosa District in Tanzania using HRM-enhanced DNA barcoding. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 1-12.
- Dwight, Z., Palais, R., & Wittwer, C. T. (2011). uMELT: Prediction of high-resolution *melting curves* and dynamic *melting* profiles of PCR products in a

- rich web application. *Bioinformatics*, 27(7), 1019–1020. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr065>
- Edwards, T., Williams, C., Teethaisong, Y., Sealey, J., Sasaki, S., Hobbs, G., Cuevas, L. E., Evans, K., & Adams, E. R. (2020). A highly *multiplexed* melt-curve assay for detecting the most prevalent carbapenemase, ESBL, and AmpC genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 97(1), 115076. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115076>
- Fadillah, Y., Kurniawan, M., Rohmayanti, T. (2023). Analisis Molecular Docking Senyawa Ekstrak Seledri (*Apium Graveolens*) Untuk Penghambatan Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Jurnal Agroindustri*, 9 (1). 74-81.
- Fantastic Pest Control. (2021). Black rats – identification, habits & facts. *Fantastic Pest Control*. [Online] Diakses pada 11 Agustus 2025 <https://fantasticpestscontrol.com.au/rats/black-rat/>
- Farrugia, A., Keyser, C., & Ludes, B. (2012). Detection of genetic variation in KCNQ1 gene by high-resolution *melting* analysis in a prospective-based series of postmortem negative sudden death: Comparison of results obtained in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *International Journal of Legal Medicine*, 126(4), 649–657. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0688-4>
- Formaggioni, A., Luchetti, A., & Plazzi, F. (2021). Mitochondrial genomic landscape: A portrait of the mitochondrial genome 40 years after the first complete sequence. *Life*, 11(7), Article 663. <https://doi.org/10.3390/life11070663>
- Fridovich-Keil, J. L. (2022). Human genome. *Encyclopedia Britannica*. [Online] Diakses pada 10 Agustus 2025. <https://www.britannica.com/science/human-genome>
- Galina, C. S., & Geffroy, M. (2023). Dual-purpose cattle raised in tropical conditions: What are their shortcomings in sound productive and reproductive function? *Animals*, 13(13), 2224. <https://doi.org/10.3390/ani13132224>
- Garafutdinov, R. R., Galimova, A. A., & Sakhabutdinova, A. R. (2020). The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 39(9), 1251–1269. <https://doi.org/10.1080/15257770.2020.1803354>
- García-Carnero, L. C., Ramírez-Sotelo, U., VargasMacías, A. P., Martínez-Álvarez, J. A., & Mora-Montes, H. M. (2024). DNA cloning vectors. In *Handbook of molecular biotechnology* (pp. 51-65. <https://doi.org/10.1201/9781003055211-7>
- GBIF. (2024a). *Bos taurus* Linnaeus, 1758. [Online] Diakses pada tanggal 9 September 2025, dari <https://www.gbif.org/species/2441022>
- GBIF. (2024b). *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758). [Online] Diakses pada tanggal 9 September 2025, dari <https://www.gbif.org/species/9326020>.
- GBIF. (2024c). *Rattus argentiventer* (Robinson & Kloss, 1916). [Online] Diakses pada tanggal 9 September 2025, dari <https://www.gbif.org/species/2439275>.
- GBIF. (2024d). *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769). [Online] Diakses pada tanggal 9 September 2025, dari <https://www.gbif.org/species/2439261>.
- GBIF. (2024e). *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758). [Online] Diakses pada tanggal 9 September 2025, dari <https://www.gbif.org/species/2439270>.

- GBIF. (2024f). *Sus scrofa* Linnaeus, 1758. [Online] Diakses pada tanggal 9 September 2025, dari <https://www.gbif.org/species/7705930>.
- GBIF. (2024g). *Sus scrofa domesticus* Erxleben, 1777. Diakses pada tanggal 9 September 2025, dari <https://www.gbif.org/species/9104700>.
- Giralt, M., & Villarroya, F. (2015). Mitochondrial uncoupling and the regulation of glucose homeostasis. *Current Diabetes Reviews*, 12. <https://doi.org/10.2174/1573399812666160217122707>
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D., & Wolff, A. (2007). Comparison of multiple DNA dyes for Real-Time PCR: Effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research*, 35(19), e127. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm671>
- Guinot, F., Szafranski, M., & Ambroise, C. (2024). Structured compression of genetic information and genome-wide association study by additive models. In *Biological data integration: Computer and statistical approaches* (pp. 117–149). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781394257317.ch5>
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence *Alignment* Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Harrington, J. S., Ryter, S. W., Plataki, M., Price, D. R., & Choi, A. M. K. (2023). Mitochondria in health, disease, and aging. *Physiological Reviews*, 103(4), 2349–2422. <https://doi.org/10.1152/physrev.00058.2021>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Hu, Y., Xia, H., Li, M., Xu, C., Ye, X., Su, R., Zhang, M., Nash, O., Sonstegard, T. S., Yang, L., Liu, G. E., & Zhou, Y. (2020). Comparative analyses of copy number variations between *Bos taurus* and *Bos indicus*. *BMC Genomics*, 21(1), 682. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07097-6>
- Hua, J., Smith, D. R., Borza, T., & Lee, R. W. (2012). Similar relative mutation rates in the three genetic compartments of *Mesostigma* and *Chlamydomonas*. *Protist*, 163(1), 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.04.003>
- Iannucci, A. (2022). On the authorship, availability, and improper use of *Sus scrofa ferus* for referring to wild pigs. *Taxonomy*, 2(1), 91–98. <https://doi.org/10.3390/taxonomy2010007>
- iNaturalist. (n.d.). Ricefield rat (*Rattus argentiventer*). Diakses pada 11 Agustus 2025, from <https://www.inaturalist.org/taxa/44589-Rattus-argentiventer>
- Incharoen, T., Nakhen, W., & Yaemkong, S. (2022). Qualitative and quantitative phenotype of Kai Tor-Kai Tang (*Gallus gallus*) in the lower-northern region of Thailand. *Biodiversitas*, 23(10), 5387–5395. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d231049>
- Integra Biosciences. (2022). How to design primers for PCR. Integra Biosciences. [Online] Diakses pada tanggal 5 Agustus 2025. <https://www.integra-biosciences.com/global/en/blog/article/how-design-primers-pcr>
- Joshi, M., Deshpande J. D., (2010). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles, and Application. *International Journal of Biomedical Research*. 81-97.
- Joy, R. A., Thelakkattuserry, S. K., Vikkath, N., Bhaskaran, R., Krishnan, S., Vasudevan, D., & Ariyannur, P. S. (2020). Somatic mutation detection

- efficiency in EGFR: A comparison between high resolution *melting* analysis and Sanger sequencing. *BMC Cancer*, 20(1), Article 902. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07411-1>
- Kalendar, R., Shevtsov, A., Otarbay, Z., & Ismailova, A. (2024). In silico PCR analysis: A comprehensive bioinformatics tool for enhancing nucleic acid amplification assays. *Frontiers in Bioinformatics*, 4, 1464197. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2024.1464197>
- Kang, S.-T., Hsieh, Y.-S., Feng, C.-T., Chen, Y.-T., Yang, P. E., & Chen, W.-M. (2018). miPrimer: An empirical-based qPCR primer design method for small noncoding microRNA. *RNA*, 24(3), 304–312. <https://doi.org/10.1261/rna.061150.117>
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: Multiple sequence *alignment*, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kaufholz, T., Franz, M., Hammerstein, P., Müller-Graf, C., & Selhorst, T. (2021). Community structure of domesticated pigs in livestock facilities. *Preventive Veterinary Medicine*, 188, 105260. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105260>
- Kim, N., Kwon, J.-S., Kang, W.-H., & Yeom, S.-I. (2023). High-resolution *melting* (HRM) genotyping. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2638, pp. 337–349). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3024-2_24
- Kremer, A., Caron, H., Cavers, S., Colpaert, N., Gheysen, G., Gribel, R., Lemes, M., Lowe, A. J., Margis, R., Navarro, C., & Salgueiro, F. (2005). Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers. *Heredity*, 95(4), 274–280. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800738>
- Kua, J. M., Azizi, M. M. F., Abdul Talib, M. A., & Lau, H. Y. (2022). Adoption of analytical technologies for verification of authenticity of halal foods—a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39(12), 1906–1932.
- Kusumawaty, D., Faridah, N., Fibriani, A., Priyandoko, D., Dzikrina, H., & Tallei, T. E. (2024). Successful primer picking and *pooling* for the design of *multiplex* PCR primers specific to pork, beef, chicken, and rat DNA. *HAYATI Journal of Biosciences*, 31(4), 678–686. <https://doi.org/10.4308/hjb.31.4.678-686>
- Lane, C. E., Hulgán, D., O’Quinn, K., & Benton, M. G. (2015). CEMAsuite: Open source degenerate PCR primer design. *Bioinformatics*, 31(22), 3688–3690. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv420>
- Li, L., He, J.-A., Wang, W., Xia, Y., Song, L., Chen, Z.-H., Zuo, H.-Z., Tan, X.-P., Ho, A. H.-P., Kong, S.-K., Loo, J. F.-C., Li, H.-W., & Gu, D. (2019). Development of a direct *reverse*-transcription quantitative PCR (dirRT-qPCR) assay for clinical Zika diagnosis. *International Journal of Infectious Diseases*, 85, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.06.007>
- Li, X.-Q. (2016). Somatic genome variation: What it is and what it means for agriculture and human health. In *Somatic genome variation in animals, plants, and microorganisms* (pp. 377–403). <https://doi.org/10.1002/9781118647110.ch18>
- Li, Y., Zhang, H., Yu, C., Dong, X., Yang, F., Wang, M., Wen, Z., Su, M., Li, B., & Yang, L. (2024). New insights into mitochondria in health and diseases.

- International Journal of Molecular Sciences, 25(18), Article 9975.
<https://doi.org/10.3390/ijms25189975>
- Liang, X.-Y., Liang, Z.-C., Zhang, Z., Zhou, J.-J., Liu, S.-Y., & Tian, S.-L. (2015). Construction of a directional T vector for cloning PCR products and expression in *Escherichia coli*. *Plasmid*, 79, 15–21.
<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.01.003>
- Liu, D. (2024). DNA structure and function. In *Handbook of molecular biotechnology* (pp. 19-25). <https://doi.org/10.1201/9781003055211-3>
- Liu, N., Wu, X.-L., Zhang, R.-B., Wang, J., Yang, Q.-S., Cheng, J.-L., Wen, Z.-X., Xia, L., Abramov, A. V., & Ge, D.-Y. (2025). Genomic differentiation and gene flow among *Rattus* species distributed in China and adjacent regions. *Journal of Systematics and Evolution*, 63(2), 307–318.
<https://doi.org/10.1111/jse.13123>
- Lubischer, J. L. (2007). The cell cycle, principles of control (D. O. Morgan). *Integrative and Comparative Biology*, 47(5), 794-795.
<https://doi.org/10.1093/icb/icm066>
- Mardalisa, S., Suhandono, S., Yanti, N., Rozid, F., Nova, F., & Primawati. (2021). Bioinformatic analysis in designing mega-primer in overlap extension PCR cloning (OEPC) technique. *International Journal on Informatics Visualization*, 5(2), 139-143.
- Meier-Stephenson, V., Badmalia, M. D., Mrozowich, T., Lau, K. C. K., Schultz, S. K., Gemmill, D. L., Osiowy, C., van Marle, G., Coffin, C. S., & Patel, T. R. (2021). Identification and characterization of a G-quadruplex structure in the pre-core promoter region of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100589.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100589>
- Mizuno, H., Tanaka, H., Furuta, Y., & Muramoto, N. (2025). Noninvasive reconstruction of complete mitochondrial genomes from aquatic environmental DNA using PCR-free long-read sequencing. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2025.06.24.661187>
- Moldovan, E., & Moldovan, V. (2020). Controls in real-time polymerase chain reaction-based techniques. *Acta Marisiensis – Seria Medica*, 66(3), 79–82.
<https://doi.org/10.2478/amma-2020-0025>
- Monteiro, C. S., Deconinck, D., Eljasik, P., Sobczak, M., Derycke, S., Panicz, R., Kane, N., Mazloomrezaei, M., Devlin, R. H., & Faria, M. A. (2021). A fast HRMA tool to authenticate eight salmonid species in commercial food products. *Food and Chemical Toxicology*, 156, 112440.
- Morinha, F., Travassos, P., Seixas, F., Santos, N., Sargo, R., Sousa, L., Magalhães, P., Cabral, J. A., & Bastos, E. (2013). High-resolution *melting* analysis for bird sexing: A successful approach to molecular sex identification using different biological samples. *Molecular Ecology Resources*, 13(3), 473–483.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12081>
- Mustika, M., Chandra, B., Maryanti, T., & Wahyuni, S. (2023). Deteksi DNA Babi Pada Produk Mie Instan Import Dengan Metode Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Jurnal Farmasi Higea*, 15(1), 7-15.
- Naidenova, E. V., Dedkov, V. G., Agafonov, D. A., Senichkina, A. M., Safonova, M. V., & Kutyrev V. V. (2021). Development and testing of a method for detecting lujo virus RNA by *reverse* transcription and real-time polymerase

- chain reaction. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii*, 1(110-115). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-110-115>
- Naroeni, A. ., Seprianto, & Moda, K. F. (2022). *In silico* Analysis of Sox2 Gene for Pluripotency Detection at Mouse Embryonic Fibroblast and induced Pluripotent Stem Cell (iPSC). *Nusantara Science and Technology Proceedings*, 1-10. <https://doi.org/10.11594/nstp.2022.2101>
- Nasheuer, H. P., & Meaney, A. M. (2024). Starting DNA synthesis: Initiation processes during the replication of chromosomal DNA in humans. *Genes*, 15(3), Article 360. <https://doi.org/10.3390/genes15030360>
- Nashirun. (2020). Makanan halal dan haram dalam perspektif Al Qur'an. *Halalan Thayyiban: Jurnal Kajian Manajemen Halal dan Pariwisata Syariah*, 3(2), 1-10.
- New England Biolabs. (2016). How long should my amplicon be for qPCR? [Online] Diakses pada tanggal 9 Agustus 2025. <https://www.neb.com/en/faqs/2016/11/14/how-long-should-my-amplicon-be-for-qpcr>
- New England Biolabs. (2022). Four tips for PCR amplification of GC-rich sequences. [Online] Diakses pada tanggal 9 Agustus 2025. <https://www.neb.com/en/nebinspired-blog/four-tips-for-pcr-amplification-of-gc-rich-sequences>
- Nikodem, D., Cłapa, T., & Narożna, D. (2021). High Resolution *Melting* Analysis (HRM-PCR)-method and its application. *Postepy Biochemii*, 67(1), 54-58.
- O'Leary, N. A., Cox, E., Holmes, J. B., Anderson, W. R., Falk, R., Hem, V., Tsuchiya, M. T. N., Schuler, G. D., Zhang, X., Torcivia, J., Ketter, A., Breen, L., Cothran, J., Bajwa, H., Tinne, J., Meric, P. A., Hlavina, W., & Schneider, V. A. (2024). Exploring and retrieving sequence and metadata for species across the tree of life with NCBI Datasets. *Scientific Data*, 11, 732. <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03571-y>
- Otto, G. M., Franklin, C. L., & Clifford, C. B. (2015). Biology and diseases of rats. In J. G. Fox, L. C. Anderson, G. Otto, K. R. Pritchett-Corning, & M. T. Whary (Eds.), *Laboratory animal medicine* (3rd ed., pp. 151–207). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00004-3>
- Penga, C., Amalo, F., Nitbani, H., & Maha, I. (2022). Gambaran Histologi Dan Histomorfometri Otot Babi Timor (*Sus Scrofa domesticus*). *Jurnal Veteriner Nusantara*, 5(1), 122-132. <https://doi.org/10.35508/jvn/vol5iss1pp122-132>.
- Persson, S., Larsson, C., Simonsson, M., & Ellström, P. (2022). rprimer: An R/bioconductor package for design of degenerate oligos for sequence variable viruses. *BMC Bioinformatics*, 23, Article 239. <https://doi.org/10.1186/s12859-022-04781-0>
- Peters, J., Lebrasseur, O., Deng, H., & Larson, G. (2016). Holocene cultural history of red jungle fowl (*Gallus gallus*) and its domestic descendant in East Asia. *Quaternary Science Reviews*, 142, 102–119. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2016.04.004>
- Pico-Mendoza, J., Madrid, L., Limongi, R., Peña, G., Flor, J., Vélez, A., Quiroz, K., Arevalo, B., & Carrasco, B. (2022). Development of simple sequence repeat markers (SSR) in *Annona deceptrix* Westra H. Rainer (Annonaceae) endangered species in Ecuador. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2227320/v1>

- Poma, F. C. G., & Poma, M. G. G. (2022). Implementation of physical barriers to control rodents in peripheral *family* residences to food supply centers [Implementación de barreras físicas para el control de roedores en residencias familiares periféricas a centros de abastecimiento de alimentos]. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 62(6), 1348–1355. <https://doi.org/10.52808/bmsa.7e6.626.029>
- Portin, P. (2014). The birth and development of the DNA theory of inheritance: Sixty years since the discovery of the structure of DNA. *Journal of Genetics*, 93(1), 293–302. <https://doi.org/10.1007/s12041-014-0337-4>
- Promega Corporation. (n.d.). pGEM®-T vector sequence [Informasi produk]. Promega Corporation. [Online] Diakses 7 Agustus 2025, dari <https://www.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-vector-systems/~media/45EEEDF45CAB47AE8A5875A45EB7D44A.ashx>
- Purwanto, A., Asbari, M., & Sulaiman, A. (2023). Penerapan Sistem Jaminan Halal HAS-23000 di Industri Kemasan Makanan. *Journal of Community Service and Engagement*, 3(2), 12-16.
- Quick, J., Grubaugh, N., Pullan, S. (2017). *Multiplex* PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc* 12, 1261–1276. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.066>
- Rahayu, R., & Yusup, A. (2022). Analisis Kesadaran Hukum dan Perlindungan Pelaku Usaha terhadap Konsumen tentang Kepemilikan Sertifikat Halal. *Jurnal Riset Ekonomi Syariah*, 129-136.
- Rahman, M. M., Ahmad, Z., & Mustafa, S. (2023). DNA-Based Platform for Halal Authentication and Combat Food Threat. *Journal of Halal Industry & Services*, 6(1).
- Rakhmirianti, S. T. (2020). DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI EFEKTIF BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PATOGEN (Doctoral dissertation, Universitas Pendidikan Indonesia).
- Rangwala, S. H., Kuznetsov, A., Ananiev, V., Asztalos, A., Borodin, E., Evgeniev, V., Joukov, V., Lotov, V., Pannu, R., Rudnev, D., Shkeda, A., Weitz, E. M., & Schneider, V. A. (2021). Accessing NCBI data using the NCBI Sequence Viewer and Genome Data Viewer (GDV). *Genome research*, 31(1), 159–169. <https://doi.org/10.1101/gr.266932.120>
- Rezaei, H., Tavassoli, M., & Esmaeilnejad, B. (2022). Phylogenetic Diversity of *Dermanyssus gallinae* (Dermanyssidae) based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase-1 Gene Sequence Collected from Different Bird Species in Iran. *Archives of Razi Institute*, 77(3), 1091.
- Rincon, A. L., Romero, C. A. P., Maldonado, L. M., Claassen, E., Garssen, J., Kraneveld, A. D., & Tonda, A. (2021). Design of specific primer sets for SARS-CoV-2 variants using evolutionary algorithms. In *GECCO 2021 - Proceedings of the 2021 Genetic and Evolutionary Computation Conference* (pp. 982–990). <https://doi.org/10.1145/3449639.3459359>
- Rolando, J. C., Jue, E., Barlow, J. T., & Ismagilov, R. F. (2020). Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification. *Nucleic acids research*, 48(7), e42-e42.
- Salsabila, N., Fadilah, Permana, R. C., Muti'atul K. A, S., Romzalis, A. A., Ramadhani, D. N., Rachmawati, Y., & 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*, 2(1), 15-21. <https://doi.org/10.15642/ijsl.v2i1.1233>
- Sasmitha, L. V., Yustiantara, P. S., Yowani, S. C. (2018). Desain DNA Primer Secara *In silico* Sebagai Pendeteksi Mutasi Gen *gyrA* *Mycobacterium tuberculosis*. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 6(1), 63-68.
- Sembor, S. M. & Tinangon, R. M. (2022). *Industri Olahan Daging*. Bandung: Patra Media Grafindo Bandung.
- Septiasari, N. P. S., & Dewi, N. P. Y. A. (2024). Primer design and *in silico* PCR for detection microsatellite locus on cassava (*Manihot esculenta*) as an early study of genetic diversity of gluten free food crops. *Advances in Tropical Biodiversity and Environmental Sciences*, 8(1), 20-25. <https://doi.org/10.24843/ATBES.2024.v08.i01.p04>
- Septiyanto, A. F., Cahyono, Y. F. C., Sarno, R., Taufany, F., Larekeng, S. H., Sungkono, K. R., Syahrudin, K., Lestari, E. G., & Sholiq. (2022). An improved method for prioritizing polymerase chain reaction (PCR) primer design in Sanger sequencing. In *Proceeding - 6th International Conference on Information Technology, Information Systems and Electrical Engineering: Applying Data Sciences and Artificial Intelligence Technologies for Environmental Sustainability, ICITISEE 2022* (pp. 443–448). <https://doi.org/10.1109/ICITISEE57756.2022.10057821>
- Setyawati, R., Zubaidah, S. (2021). Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu *Annealing* dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*.
- Silas S. Brown, Yun-Wen Chen, Ming Wang, Alexandra Clipson, Eguzkine Ochoa, and Ming-Qing Du (2017). *PrimerPooler: automated primer pooling to prepare library for targeted sequencing*. *Biology Methods and Protocols*. Oxford University Press. 2(1). doi:10.1093/biomethods/bpx006
- Šimon, M., Čater, M., Kunej, T., Morton, N. M., & Horvat, S. (2025). A bioinformatics toolbox to prioritize causal genetic variants in candidate regions. *Trends in Genetics*, 41(1), 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2024.09.007>
- Singh, H. (2016). Bioinformatics: Benefits to mankind. *International Journal of PharmTech Research*, 9(4), 242–248.
- Skrzypczak-Zielinska, M., Borun, P., Bartkowiak-Kaczmarek, A., Zakerska-Banaszak, O., Walczak, M., Dobrowolska, A., Kurzawski, M., Waszak, M., Lipinski, D., Plawski, A., & Slomski, R. (2016). A Simple Method for TPMT and ITPA Genotyping Using *Multiplex* HRMA for Patients Treated with Thiopurine Drugs. *Molecular diagnosis & therapy*, 20(5), 493–499. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0217-0>
- Smith, R., & Johnson, L. (2022). The role of GC content and melting temperature in the efficiency of *multiplex* PCR. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 12-18. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00215-9>

- So, K. Y. K., Fong, J. J., Lam, I. P. Y., & Dudgeon, D. (2020). Pitfalls during *in silico* prediction of primer specificity for eDNA surveillance. *Ecosphere*, 11(7), e03193. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3193>
- Stothard P., (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.
- Sugiyono. (2022). Metode Penelitian Kuantitatif. Bandung: Alfabeta.
- Sumarlina, & Napitupulu, T. S. (2023). Evaluasi Aplikasi DNA Barcode Lokus psbA-trnH pada Genus Momordica. *Jurnal Biotek*, 11(2), 182-195. <https://doi.org/10.24252/jb.v11i2.37914>
- Sunardi, D., Bhari, A., & Wakil, M. N. B. A. (2024). Legal awareness of micro and small enterprise operators regarding halal certification: A maslaha perspective. *Ijtihad: Jurnal Wacana Hukum Islam dan Kemanusiaan*, 24(1), 23–45. <https://doi.org/10.18326/ijtihad.v24i1.23-45>
- Supian, K. (2018). Cross-contamination in processing, packaging, storage, and transport in halal supply chain. In J. S. Smith & Y. H. Hui (Eds.), *Preparation and processing of religious and cultural foods* (pp. 309–321). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101892-7.00016-X>
- Susilowati, T. (2020). Deteksi Kontaminan DNA Babi Pada Sampel Penggilingan Daging Di Pasar Surya Kota Surabaya Menggunakan Real-Time Polymerase Chain Reaction (Doctoral dissertation, Thesis. <https://digilib.uinsby.ac.id>. Accessed on 20th of September).
- Syamsidi, A., Aanisah, N., Fiqam, R., & Al Jultri, I. (2021). Primer design and analysis for detection of mecA gene. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 5(3), 245-253.
- Syarif, F., (2019). Pertumbuhan dan Keberlanjutan Konsep Halal Economy di Era Moderasi Beragama. *Jurnal Bimas Islam*. Vol 12 No 1.
- Tan, L. L., Ahmed, S. A., Ng, S. K., Citartan, M., Raabe, C. A., Rozhdestvensky, T. S., & Tang, T. H. (2020). Rapid detection of porcine DNA in processed food samples using a streamlined DNA extraction method combined with the SYBR Green Real-Time PCR assay. *Food chemistry*, 309, 125654.
- Telatin, A., Fariselli, P., & Birolo, G. (2021). SeqFu: A suite of utilities for the robust and reproducible manipulation of sequence files. *Bioengineering*, 8(5), 59. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050059>
- Umar, A. R. (2020). Polisi Amankan Penjual Bakso Daging Tikus di Mamuju Tengah. <https://www.liputan6.com/regional/read/4191979/polisi-amankan-penjual-bakso-daging-tikus-di-mamuju-tengah> [Online: diakses pada 2 Januari 2025].
- Ummami, R., Ramandani, D., Airin, C. M., Husni, A., & Astuti, P. (2022). Uji Kualitas dan Uji Cemaran Daging Babi Pada Daging Sapi di Beberapa Pasar Tradisional di Yogyakarta: Pork Detection Test And Meat Physical Quality In Some Traditional Markets From Yogyakarta. *Jurnal Ilmu Peternakan dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*, 12(2), 151-160.
- Walker, L. A., Morgan, J., Nivens, D. K., & Walker, G. M. (2023). Characterization and Analysis of Mycobacteriophage Cain's Genes.
- Wang, H., Yang, B., Wang, H., & Xiao, H. (2021). Impact of different numbers of microsatellite markers on population genetic results using SLAF-seq data for

- Rhododendron species. *Scientific Reports*, 11(1), 8597. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87945-x>
- Watanabe, S., Yamagata, Y., & Kotoda, N. (2023). Modified High-Resolution *Melting* (HRM) Marker Systems Increasing Discriminability Between Homozygous Alleles. In *Plant Genotyping: Methods and Protocols* (pp. 351-363). New York, NY: Springer US.
- Wehr, N. H., (2020). Historical range expansion and biological changes of *Sus scrofa* corresponding to domestication and feralization. *Mammal Research*. Vol 66, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13364-020-00534-7>
- Xie, N.G., Wang, M.X., Song, P. *et al.* (2022). Designing highly *multiplex* PCR primer sets with Simulated *Annealing* Design using Dimer Likelihood Estimation (SADDLE). *Nat Commun* 13, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29500-4>
- Xie, Z., Huang, A., Xie, J., Yu, S., Chen, M., Cai, J., Huang, R., Zhu, Z., & Ding, Y. (2024). Rapid identification of *Bacteroides dorei* using novel specific target revealed by pan-genome analysis and its application in food. *LWT - Food Science and Technology*, 206, 116557.
- Xu, E. Y., Schneper, L. M., & Notterman, D. A. (2023). A novel metric to improve mismatched primer selection and quantification accuracy in amplifying DNA repeats for quantitative polymerase chain reactions. *PLOS ONE*, 18(10), e0292559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292559>
- Yan, W. (2015). *Multiplex* PCR primer design for simultaneous detection of multiple pathogens. In H. Yang (Ed.), *Methods in molecular biology* (Vol. 1275, pp. 91–101). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_6
- Yu, B., Xu, C., Huang, S., Ni, J., Zhou, J., Zhang, Y., Wu, M., Zhang, J., & Fang, L. (2023). Development of a universal real-time RT-PCR assay for detection of pan-SARS-coronaviruses with an RNA-based internal control. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1181097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1181097>
- Yuniarti, H. & Cholis, B., (2021). Pemilihan Primer Pada Proses PCR Untuk Sekuensing DNA. *Karya Ilmiah Trisakti*. 1-17.
- Zachary Dwight, Robert Palais, Carl T. Wittwer, uMELT: prediction of high-resolution *melting curves* and dynamic *melting* profiles of PCR products in a rich web application, *Bioinformatics*, Volume 27, Issue 7, 1 April 2011, Pages 1019–1020
- Zahrani, A., Mardini, I., & Pane, E. R. (2022). Desain Primer Secara *in silico* Untuk Mengidentifikasi Tikus Dengan Menggunakan Gen Cytochrome Oxidase I. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Terapan*.
- Zambenedetti, M. R., Pavoni, D. P., Dallabona, A. C., Dominguez, A. C., Poersch, C. de O., Fragoso, S. P., & Krieger, M. A. (2017). Internal control for real-time polymerase chain reaction based on MS2 bacteriophage for RNA viruses diagnostics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(5), 339-347. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160365>
- Zangenberg, G., Saiki, R. K., & Reynolds, R. (1999). *Multiplex* PCR: optimization guidelines. *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, 73–94. <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=9aOMfPFHO1EC&oi=fnd&pg=PA73&dq=MULTIPLEX+PCR++OPTIMIZA>

TION+GUIDELINES&ots=dR4UtgDgm0&sig=Kf2e4zB_mey4dj
1Ojylqul-fu7A

Zhou, Y., Ha, S., Xu, Y., Qin, X., Ma, Y., Lu, J., ... & Deng, J. (2025). Establishment of a simple prediction method for DNA *melting* temperature: high-resolution *melting curve* analysis of PCR products. PloS one, 20(4), e0321885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0321885>