

BAB V

SIMPULAN, IMPLIKASI, DAN REKOMENDASI

5.1. Simpulan

Penelitian ini berhasil mendesain dan mengoptimasi primer *multiplex* berbasis *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) untuk mendeteksi DNA ayam, sapi, babi, tikus, dan plasmid pGEM-t sebagai kontrol internal secara *in silico*. Keberhasilan ini didukung dengan cara penentuan sekuens target yang tepat dan lengkap agar primer dapat ditentukan posisinya dalam sekuens tersebut melalui penentuan suhu *annealing* dan panjang ampikon. Sementara itu, optimalisasi dilakukan dengan cara mengevaluasi setiap parameter molekuler primer baik secara individual, pasangan, maupun *multiplex* hingga evaluasi ampikon yang dihasilkan, spesifisitas primer, serta kompatibilitas semua pasangan primer secara *multiplex*.

Simulasi menggunakan uMELT Quartz dan *PrimerPooler* menunjukkan bahwa setiap pasangan primer menghasilkan puncak T_m yang tajam, terpisah, dan tidak tumpang tindih, serta memiliki kompatibilitas yang baik sehingga sistem *multiplex* mampu membedakan DNA masing-masing *species* secara spesifik dalam satu reaksi. Selain itu, verifikasi homologi dengan Primer-BLAST memastikan primer hanya berikatan dengan sekuens target (ayam, sapi, babi, tikus, dan pGEM-t) tanpa amplifikasi silang dengan *species* non-target pada subfilum Vertebrata. Hal ini menegaskan spesifisitas tinggi dari primer yang dirancang. Adapun faktor molekuler utama yang menentukan suhu leleh ampikon adalah komposisi GC dan panjang ampikon. Ampikon dengan GC seimbang dan panjang yang tidak lebih dari 200 bp menghasilkan puncak leleh yang stabil, tajam, dan konsisten. Kondisi ini terbukti paling sesuai untuk mencapai diskriminasi yang efisien dengan metode HRMA *multiplex*.

5.2. Implikasi

Penelitian ini menyediakan metode berbasis DNA yang berpotensi diaplikasikan untuk deteksi kehalalan produk pangan olahan, sehingga dapat

mencegah kontaminasi silang bahan haram sekaligus mendukung sistem jaminan mutu halal sesuai syariat dan regulasi.

5.3. Rekomendasi

Terdapat beberapa saran yang perlu disampaikan agar studi ke depannya dapat dilakukan dengan lebih efisien dan menghasilkan data yang lebih baik. Beberapa saran tersebut antara lain:

1. Evaluasi lanjutan dapat meliputi pengoptimalan konsentrasi setiap primer dalam *multiplex* PCR, validasi menggunakan DNA kombinasi, dan pengujian pada sampel makanan olahan yang memiliki kompleksitas tinggi.
2. Dalam fase awal perancangan primer, peneliti disarankan untuk melakukan analisis kandungan GC pada sekuens target sebelum menetapkan suhu *annealing*. Ini krusial untuk menghindari ketidakcocokan antara suhu *annealing* yang dirancang dan struktur ampikon yang dihasilkan, karena kandungan GC dan distribusinya sangat mempengaruhi stabilitas ikatan serta nilai T_m ampikon yang penting dalam HRMA.
3. Analisis stabilitas struktur sekunder primer juga harus dilakukan, bersama dengan evaluasi potensi pembentukan dimer dan prediksi *hairpin* yang lebih mendalam dengan menggunakan perangkat lunak tambahan seperti OligoAnalyzer.