



# Desain Primer Gen 12S sRNA dari DNA Mitrokondria Babi (*Sus scrofa*) secara In Silico sebagai Kandidat Primer dalam Analisis Molekuler Kehalalan Produk

(Design of 12S rRNA gene primer from pork mitochondrial dna (*sus scrofa*) through in silico as primer candidates in molecular analysis of product halalness)

Taufik Muhammad Fakhil\*, Salsabilla Wijaya & Sani Ega Priani

Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Ranggagading No.8, Tamansari, Kec. Bandung Wetan, Kota Bandung, Jawa Barat

**ABSTRACT:** Several products such as medicine, food, and cosmetics, especially collagen, can potentially contain pork derivatives, thus a halal analysis is needed. Polymerase Chain Reaction (PCR) is a method that can be used to perform molecular analysis of samples. This study aimed to design a primer candidate for the 12S rRNA pork gene through *in silico*. The method used was tracing the 12S rRNA gene data through the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website, then the 12S rRNA gene sequence was analyzed using the Integrated DNA Technologies (IDT) webserver and MFEprimer-3.1 to select the best primer candidate. The selected primer candidates were then identified using the SnapGene Viewer webserver to observe the ability of the primer candidate to attach to the target sequence. In the last stage, the primer candidate evaluation is carried out using the OligoAnalyzer™ Tool webserver to obtain the best primer candidate pair that meets the good primer criteria. The best primer candidates are forward primer rRNA-5 (5' GTACTACTCGCAACTGCCTAAA 3') and reverse primer rRNA-6 (5'GCAAGGGTTGGTAAGGTCTATC 3') because they meet the ideal primer requirements. Therefore, these primer candidates can be used for *in vitro* sample characterization using the PCR technique.

**Keywords:** 12S rRNA gene; pork derivatives; Polymerase Chain Reaction (PCR); primer candidate; in silico study.

**ABSTRAK:** Beberapa produk seperti obat, makanan, dan kosmetika khususnya kolagen dapat berpotensi mengandung turunan babi sehingga diperlukan adanya analisis kehalalan. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode yang dapat digunakan untuk melakukan analisis sampel secara molekuler. Tujuan dari penelitian ini adalah mendesain kandidat primer dari gen 12S rRNA babi secara *in silico*. Metode yang digunakan adalah penelusuran data gen 12S rRNA melalui situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), kemudian sekuen gen 12S rRNA dianalisis menggunakan server web *Integrated DNA Technologies* (IDT) dan MFEprimer-3.1 untuk dilakukan pemilihan kandidat primer terbaik. Kandidat primer terpilih kemudian diidentifikasi menggunakan server web SnapGene Viewer untuk mengamati kemampuan penempelan kandidat primer pada sekuen target. Pada tahap terakhir dilakukan evaluasi kandidat primer menggunakan server web OligoAnalyzer™ Tool agar diperoleh pasangan kandidat primer terbaik yang memenuhi kriteria primer yang baik. Kandidat primer yang terbaik adalah primer *forward* rRNA-5 (5' GTACTACTCGCAACTGCCTAAA 3') dan primer *reverse* rRNA-6 (5'GCAAGGGTTGGTAAGGTCTATC 3') karena memenuhi persyaratan primer ideal. Dengan demikian, kandidat primer tersebut dapat digunakan untuk karakterisasi sampel secara *in vitro* menggunakan teknik PCR.

**Kata kunci:** gen 12S rRNA; turunan babi; Polymerase Chain Reaction (PCR); kandidat primer; studi in silico.

## Pendahuluan

Banyaknya populasi muslim di dunia bahkan di Indonesia mengakibatkan kebutuhan terhadap produk halal mengalami peningkatan, diantaranya produk kosmetika [1,2]. Kosmetika merupakan produk yang digunakan pada bagian luar tubuh melalui kulit dan berpotensi mengandung bahan yang menjadikannya haram untuk digunakan [3]. Salah satu produk kosmetika

yang banyak mengandung turunan babi adalah kolagen [4]. Kolagen dapat ditambahkan pada produk kosmetika baik dalam bentuk krim kolagen ataupun lotion untuk mencegah terjadinya penuaan dini [5-7]. Kolagen merupakan protein yang dapat diperoleh dari jaringan ikat atau daging mamalia [8].

Teknik yang sudah banyak digunakan untuk analisis kehalalan suatu produk adalah *Polymerase*

### Article history

Received: 02 Agust 2021

Accepted: 09 Des 2021

Published: 16 Des 2021

### Access this article



\*Corresponding Author: Taufik Muhammad Fakhil

Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Ranggagading No.8, Kec., Kota Bandung, Jawa Barat, 40116 | Email: [taufikmuhammadf@gmail.com](mailto:taufikmuhammadf@gmail.com)

*Chain Reaction* (PCR) [9]. Teknik tersebut dianggap valid karena dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies termasuk turunan babi secara molekuler dari level asam deoksiribonukleat (DNA) [10]. Di samping itu, kelebihan teknik PCR antara lain memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi jika dibandingkan dengan teknik lainnya [11,12]. Kemudian, PCR juga mampu mengidentifikasi sampel dalam jumlah banyak dengan sedikit resiko kontaminasi [13]. Namun, kelemahannya adalah dalam proses pengujian memerlukan DNA probe (suatu fragmen DNA atau RNA atau protein pelacak target gen) agar hasilnya optimal [14].

Desain primer merupakan langkah awal dalam melakukan amplifikasi dan analisis segmen DNA [15]. Desain primer pada proses PCR merupakan hal yang sangat penting karena primer tersebut yang akan menempel pada DNA *template* lalu mengamplifikasi sekuen target. Sepasang primer oligonukleotida yaitu primer *forward* dan primer *reverse* menempel pada DNA target dalam proses annealing [16,17]. Urutan basa nukleotidanya harus berkomplemen dengan urutan basa nukleotida sekuen target [18]. Studi *in silico* merupakan gabungan dari ilmu biologi dan komputasi yang dibantu dengan komputer serta perangkat lunak yang salah satunya dapat dimanfaatkan untuk merancang sebuah kandidat primer [19,20].

Gen yang digunakan untuk mendesain kandidat primer adalah gen 12S rRNA babi [21]. Gen tersebut merupakan salah satu dari 37 gen DNA mitokondria (mtDNA) yang merupakan daerah pengkode suatu

informasi genetika (*coding region*) [22]. Sekuen gen ini pada mtDNA vertebrata tidak menunjukkan daerah lestari (*conserved region*) yang sangat tinggi dan memiliki panjang basa antara 945-975 bp tergantung pada spesiesnya. Gen 12S rRNA juga menempati 1/16 dari seluruh genom mitokondria dan memiliki substitusi nukleotida [23,24]. Dengan demikian, diharapkan melalui penelitian ini dapat diperoleh kandidat primer yang dapat dimanfaatkan untuk melakukan analisis kehalalan dengan mengembangkan teknik identifikasi kandungan babi dan turunannya pada suatu produk khususnya krim kolagen.

## Metode Penelitian

### Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sekuen 12S rRNA dari DNA mitokondria (mt-DNA) *Sus scrofa* yang diperoleh dari database *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([Gambar 1](#)) [25]. Perangkat lunak yang digunakan pada penelitian ini diantaranya terdapat Sistem Operasi Windows 10 yang dilengkapi dengan beberapa server web seperti *Integrated DNA Technologies* (IDT) [26], MFEprimer-3.1 [27], SnapGene Viewer [28], dan OligoAnalyzer™ Tool [29]. Perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini adalah berupa laptop dengan spesifikasi *Random Access Memory* (RAM) delapan gigabyte (8 GB) Intel® Atom™ Processor Z3735F Quad Core (1.33GHz, 2M Cache) up to 1.83 GHz.

FASTA ▾

### Sus scrofa cristatus isolate ABT/SWFH/1 mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC\_039090.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>NC\_039090.1:587-1544 *Sus scrofa cristatus* isolate ABT/SWFH/1 mitochondrion, complete genome

```
CACAGGTTTGGTCCTGGCCTTCTATTAGTCTTAATAAAATTACACATGCAAGTATCCGGCCCCGGTG
AGAATGCCCTCCAGATCTTAAAGATCAAAAGGAGCAGGTATCAAGCACACCTATAACGGTAGCTCATAAC
GCCTTGCTCAACCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATAAAAAATTAAGCCATGAACGAAAGTTGACTA
AGTTATATTAATCAGAGTTGGTAAATCTGTGCCAGCCACCGGGTCATACGATTAACCCAAATTAATAG
ATCCACGGCGTAAAGAGTGTAAAGAAAAAACCAATAGAGTTAAATTATAACTAAGCTGTAAAAAGCC
CTAGTTAAAAATAAAATACCCACGAAAGTGACTCTAATAATTCTGACACACGATAGCTAGGACCCAACT
GGGATAGATACCCCACTATGCCTAGCCCTAAACCCAAATAGTTACATAACAAAACATTCGCCAGAGTA
CTACTCGCAACTGCCTAAAACCTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTCACATCCACCTAGAGGAGCCTGTTCTAT
AATCGATAAACCCGATAGACCTTACCAACCTTGCCCAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAAC
CCTAAAAAGGAACAATAGTAAGCACAATCATAACACATAAAAAAGTTAGGTCAAGGTGTAGCTTATGGGT
TGGAAAGAAATGGGCTACATTTTCTACATAAAGAACACCCACCACATACGAAAGTTTTATGAACTAAAAAC
CAAAGGAGGATTTAGCAGTAAATCAAGAATAGAGTGCTTGATTGAATAAGGCCATGAAGCACGCACACAC
CGCCCGTCACCCCTCTCAAGCATGTAGTAATAAAAAATAACCTATATTTAATTACACAACCATGCAAGAAG
AGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAAGTGTGCTTGGACTAC
```

**Gambar 1.** Sekuen gen 12S rRNA dari DNA mitokondria (mt-DNA) *Sus scrofa cristatus*

**Tabel 1.** Hasil Identifikasi Kandidat Primer

Set	Panjang Amplikon	Primer Forward	Primer Reverse
1	109 bp	5' GTACTACTCGCAACTGCCTAAA 3'	5' GCAAGGGTTGGTAAGGTCTATC 3'
2	112 bp	5' TTTGGTCTGGCCTTTCTATT 3'	5' GTGCTTGATACCTGCTCCTT 3'
3	100 bp	5' GTGCTTCACATCCACCTAGAG 3'	5' GCTGAAGATGGCGGTATATAGG 3'
4	137 bp	5' CACGGGAAACAGCAGTGATA 3'	5' CTCTTTACGCCGTGGATCTATT 3'
5	147 bp	5' CAGCCTATATACGCCATCTTC 3'	5' TCGTATGGTGGGTGTTCTTATG 3'

**Penelusuran Sekuen Gen 12S rRNA pada NCBI**

Sekuen gen 12S rRNA diperoleh dari database *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) yang dapat diakses melalui situs web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [25]. Kemudian pada kolom pencarian digunakan kata kunci 12S rRNA *Sus scrofa*. Setelah itu dipilih 12S ribosomal RNA (*Sus scrofa cristatus*) untuk mendapatkan data nukleotida 12S rRNA dalam bentuk FASTA-nya.

**Identifikasi Kandidat Primer menggunakan Integrated DNA Technologies (IDT)**

Data sekuen 12S rRNA yang sudah diunduh dari situs web NCBI kemudian dilakukan analisis menggunakan server web *Integrated DNA Technologies* (IDT) melalui situs web <https://sg.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index> untuk mendapatkan kandidat primer yang dipilih berdasarkan panjang amplikon [26].

**Analisis Pasangan Kandidat Primer menggunakan MFEprimer-3.1**

Kandidat primer yang sudah didapatkan dari server

web IDT kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan server web MFEprimer-3.1 melalui situs web <https://mfeprimer3.igenetech.com/spec/> untuk mengetahui banyaknya kandidat primer yang memiliki potensial amplikon berdasarkan panjang amplikonnya [27].

**Evaluasi Penempelan Kandidat Primer menggunakan SnapGene Viewer**

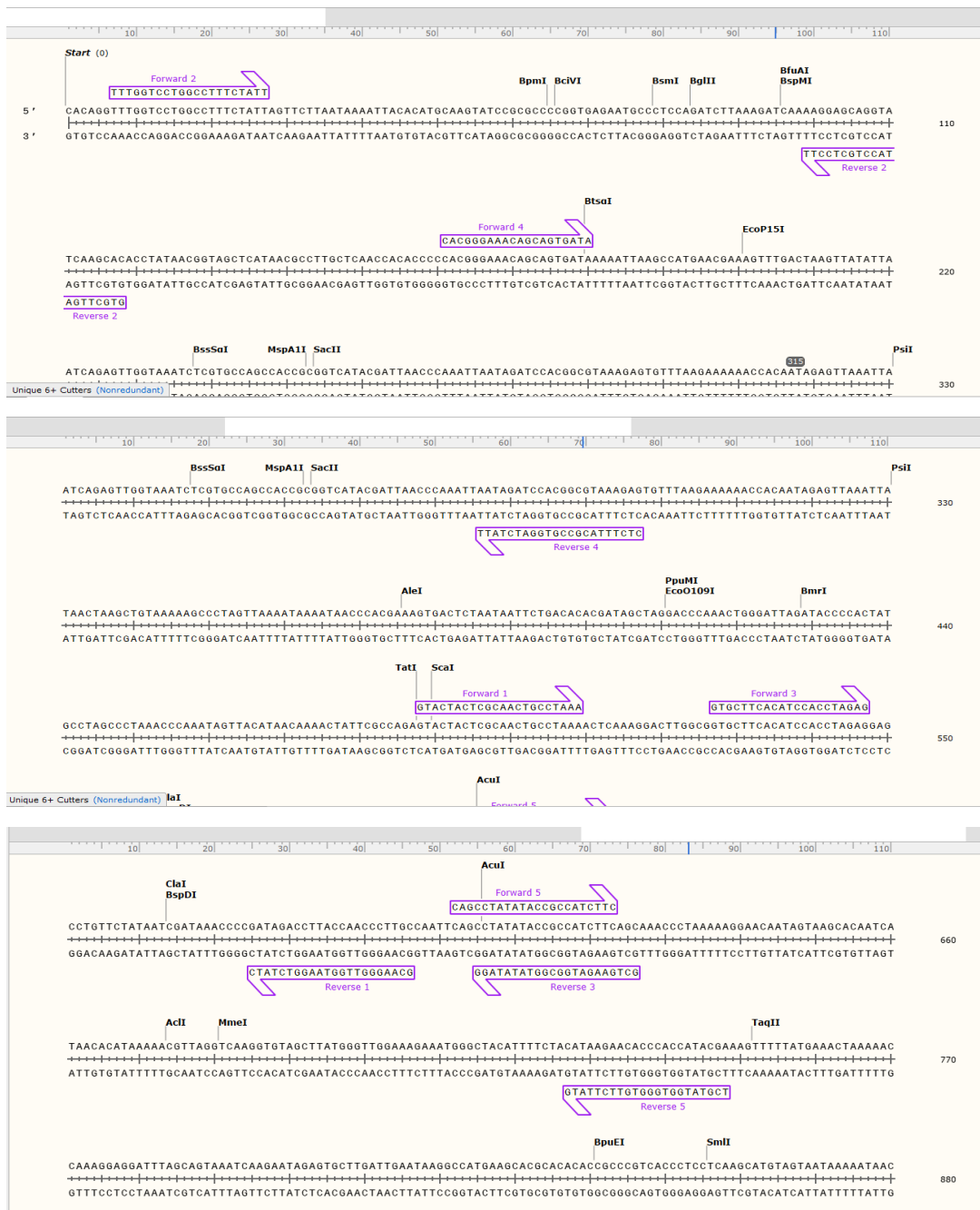
Kandidat primer yang sudah diperoleh dari server web MFEprimer-3.1 terdiri dari primer *forward* dan primer *reverse*. Pasangan primer tersebut kemudian dievaluasi menggunakan server web SnapGene Viewer melalui situs web <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/> untuk dilakukan analisis terhadap kemampuan penempelannya pada DNA *template* [28].

**Penentuan Sifat Kandidat Primer menggunakan**

Pasangan primer *forward* dan primer *reverse* dari kandidat primer yang sudah didapatkan dari server web MFEprimer-3.1 kemudian ditentukan sifat-sifatnya menggunakan server web OligoAnalyzer™ Tool melalui

**Tabel 2.** Hasil Penentuan Sifat Primer Kandidat Primer

Kode Primer	Pasangan Primer	Urutan Primer	Panjang Produk	Panjang Basa	%GC (%)	Titik Leleh (Tm) (°C)
rRNA-1	Forward	5' GTACTACTCGCAACTGCCTAAA 3'	139	22	45,5	54,5
rRNA-2	Reverse	5' GCTGAAGATGGCGGTATATAGG 3'		22	50	54,9
rRNA-3	Forward	5' CACGGGAAACAGCAGTGATA 3'	137	20	50	54,9
rRNA-4	Reverse	5' CTCTTTACGCCGTGGATCTATT 3'		22	45,5	54,4
rRNA-5	Forward	5' GTACTACTCGCAACTGCCTAAA 3'	109	22	45,5	54,5
rRNA-6	Reverse	5' GCAAGGGTTGGTAAGGTCTATC 3'		22	50	55,2
rRNA-7	Forward	5' GTGCTTCACATCCACCTAGAG 3'	100	21	52,4	55,1
rRNA-8	Reverse	5' GCTGAAGATGGCGGTATATAGG 3'		22	50	54,9
rRNA-9	Forward	5' TTTGGTCTGGCCTTTCTATT 3'	112	21	42,9	54,2
rRNA-10	Reverse	5' GTGCTTGATACCTGCTCCTT 3'		20	50	54,8



Gambar 2. Hasil penentuan kemampuan penempelan kandidat primer

situs web <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer/> dengan parameter berupa beberapa sifat primer yang meliputi panjang produk, panjang basa nukleotida, persentase G dan C (%GC), titik leleh (Tm), dan sifat sekunder yaitu hairpin, self-dimer, dan heterodimer [29].

### Hasil dan Diskusi

Perancangan primer digunakan sebagai pembatas dalam amplifikasi segmen asam deoksiribonukleat

(DNA). Perancangan primer yang baik dilakukan secara *in silico* dengan basis ilmu bioinformatika. Primer digunakan dalam teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang berfungsi untuk berhibridisasi dengan DNA *template* dan menentukan daerah yang akan diamplifikasi dan merupakan tempat penempelan DNA polimerase untuk melakukan amplifikasi gen target [30]. Desain primer adalah langkah awal dalam perolehan sekuen primer terbaik untuk amplifikasi DNA sehingga dapat digunakan untuk analisis sampel secara *in vitro* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Di samping itu, PCR juga

digunakan untuk memvalidasi hasil dari pengujian ekspresi gen dan mampu menghasilkan data dalam jumlah yang besar [31,32].

Sekuen gen 12S rRNA dari DNA mitokondria (mt-DNA) *Sus scrofa cristatus* yang telah diperoleh dari situs web *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dimasukkan ke dalam server web *Integrated DNA Technologies* (IDT) untuk menghasilkan 5 set kandidat primer yang terdiri dari primer *forward* dan primer *reverse*. Masing-masing kandidat primer terdiri dari susunan basa nukleotida dan memiliki panjang amplicon sebagaimana yang ditunjukkan pada [Tabel 1](#). Panjang amplicon dengan metode PCR menandakan panjang basa yang dihasilkan dalam proses pemanjangan atau amplifikasi. Panjang amplicon standar PCR yaitu 100-500 bp sedangkan untuk panjang amplicon RT-PCR yang baik yaitu dalam rentang 80-200 bp [33]. Oleh karena itu, keseluruhan set kandidat primer yang diperoleh telah memenuhi persyaratan.

Kandidat pasangan primer tersebut dimasukkan ke dalam server web *MFEprimer-3.1* untuk dipilih kandidat primer potensial amplicon dan menghasilkan 35 pasangan primer. Namun, hanya 5 pasangan kandidat primer yang dipilih karena panjang ampliconnya termasuk ke dalam rentang 80-200 bp dan dipastikan terdiri dari primer *forward* dan primer *reverse*. Setiap kandidat primer kemudian dimasukkan ke dalam server web *SnapGene Viewer* untuk membandingkan urutan nukleotida dari kandidat primer dan urutan nukleotida 12S rRNA *Sus scrofa* dalam bentuk FASTA yang diharapkan menempel. Diperoleh hasil bahwa semua kandidat primer menempel pada sekuen target sebagaimana yang ditunjukkan oleh [Gambar 2](#). Selanjutnya setiap kandidat primer dianalisis profilnya

menggunakan server web *OligoAnalyzer™ Tool* agar dapat dipilih kandidat primer terbaik.

Kandidat primer dengan panjang basa 18-28 bp merupakan primer yang menghasilkan amplifikasi terbaik. Semakin panjang suatu basa tidak akan menyebabkan bertambahnya spesifitas dari suatu primer [34]. Selain itu, semakin panjang primer maka amplicon yang dihasilkan semakin sedikit karena membutuhkan waktu yang lama untuk proses pemanjangan ampliconnya. Sementara, apabila primer terlalu panjang maka tidak akan meningkatkan spesifitasnya namun dapat menyebabkan biaya produksi yang lebih besar. Persentase G dan C (%GC) adalah persentase jumlah guanin dan sitosin dalam suatu primer. Nilai %GC untuk suatu primer yang baik berada pada rentang 40-60% [35]. Jika nilai %GC rendah maka primer tidak akan dapat menempel secara selektif pada target, sedangkan jika %GC terlalu tinggi dapat menyebabkan hasil yang diperoleh tidak spesifik.

Nilai titik leleh ( $T_m$ ) yang optimal untuk sebuah primer sebaiknya berada pada rentang 50-65°C. Nilai  $T_m$  perlu diperhatikan pada perancangan atau desain primer karena nilai  $T_m$  merupakan temperatur dimana 50% untai gandanya terpisah yang menyebabkan primer dapat masuk dan beramplifikasi [36]. Kemudian nilai  $T_m$  juga sangat berpengaruh pada pemilihan suhu annealing pada proses PCR. Apabila nilai  $T_m$  lebih besar dari 65°C maka akan mengurangi efektivitas suhu annealing yang dapat mengakibatkan kurang baiknya proses amplifikasi DNA dan nilai  $T_m$  yang rendah akan mengakibatkan mudah menempel di tempat lain sehingga hasilnya menjadi tidak spesifik.

**Tabel 3.** Hasil Penentuan Sifat Sekunder Kandidat Primer

Kode Primer	Pasangan Primer	Urutan Primer	Hairpin (kcal/mol)	Self-dimer (kcal/mol)	Heterodimer (kcal/mol)
rRNA-1	Forward	5' GTACTACTCGCAACTGCCTAAA 3'	-0,58	-5,09	
rRNA-2	Reverse	5' GCTGAAGATGGCGGTATATAGG 3'	1,81	-5,83	-6,75
rRNA-3	Forward	5' CACGGGAAACAGCAGTGATA 3'	-0,25	-3,61	
rRNA-4	Reverse	5' CTCTTTACGCCGTGGATCTATT 3'	0,95	-4,95	-9,98
rRNA-5	Forward	5' GTACTACTCGCAACTGCCTAAA 3'	-0,58	-5,09	
rRNA-6	Reverse	5' GCAAGGGTTGGTAAGGTCTATC 3'	0,03	-3,9	-5,24
rRNA-7	Forward	5' GTGCTTCACATCCACCTAGAG 3'	0,64	-4,16	
rRNA-8	Reverse	5' GCTGAAGATGGCGGTATATAGG 3'	1,81	-5,83	-7,07
rRNA-9	Forward	5' TTTGGTCTGGCCTTTCTATT 3'	-0,86	-9,28	
rRNA-10	Reverse	5' GTGCTTGATACCTGCTCCTT 3'	-0,29	-3,14	-4,41

Hairpin merupakan interaksi intramolekular di dalam primer dan dapat mengganggu proses penempelan primer pada *template* saat proses PCR. Analisis hairpin dilakukan untuk mengetahui hairpin yang terbentuk dan terbentuknya hairpin harus dihindari karena dapat mengurangi efektivitas dari suatu primer. Nilai hairpin yang dipersyaratkan adalah kurang dari  $-3$  kkal/mol [37]. Penempelan primer dapat mempengaruhi stabilitasnya karena jika primer tersebut stabil maka dapat menempel pada *template* atau sekuen target.

Dimer menunjukkan adanya proses hibridisasi antar primer yang identik. Analisis *self-dimer* dapat dilakukan dengan cara membentuk ikatan antar primer sejenis, seperti primer *forward* ke primer *forward* dan primer *reverse* ke primer *reverse*. Parameter yang dilihat adalah energi bebas atau  $\Delta G$ . Nilai  $\Delta G$  pada *self-dimer* harus lebih besar dari  $-6$  kkal/mol [38]. Sementara, analisis heterodimer dilakukan dengan membentuk dua jenis ikatan primer yang berbeda, yaitu primer *forward* ke primer *reverse* dengan nilai  $\Delta G$  nya harus lebih besar dari  $-6$  kkal/mol. Jika nilai  $\Delta G$  kurang dari  $-6$  kkal/mol akan mengakibatkan primer sulit menempel pada daerah target.

Hasil dari urutan nukleotida setiap kandidat primer menyatakan bahwa sifat primer dan sifat sekunder primer sebagaimana ditunjukkan oleh Tabel 2 dan Tabel 3 memiliki panjang basa, %GC, nilai  $T_m$ , dan hairpin yang memenuhi persyaratan. Namun, pada hasil *self-dimer*, kandidat primer rRNA-9 memiliki nilai lebih kecil dari  $-6$  kkal/mol, sehingga tidak bisa digunakan atau perlu dianalisis lebih lanjut menggunakan PCR. Sementara nilai  $\Delta G$  yang lebih besar dari  $-6$  kkal/mol untuk heterodimer hanya terdapat pada kandidat pasangan primer rRNA-5–rRNA-6 dan rRNA-9–rRNA-10. Akan tetapi, karena kandidat primer rRNA-9 memiliki nilai  $\Delta G$  untuk *self-dimer* lebih kecil dari  $-6$  kkal/mol maka tidak bisa dijadikan kandidat primer. Dengan demikian, hanya pasangan kandidat primer *forward* rRNA-5 dengan urutan sekuen 5' GTACTACTCGCAACTGCCTAAA 3' dan primer *reverse* rRNA-6 dengan urutan sekuen 5' GCAAGGGTTGGTAAGGTCTATC 3' yang menjadi kandidat primer terbaik. Analisis lebih lanjut secara *in vitro* melalui teknik PCR diperlukan untuk membuktikan bahwa kandidat primer terbaik yang diperoleh dapat digunakan untuk analisis kehalalan pada produk khususnya krim kolagen.

## Kesimpulan

Pada penelitian ini telah dilakukan perancangan kandidat primer sekuen gen 12S rRNA dari DNA

mitokondria (mt-DNA) *Sus scrofa* secara *in silico* untuk menganalisis kehalalan pada produk krim kolagen. Hasil yang diperoleh yaitu terdapat kandidat primer dengan 5 pasangan primer yang memiliki potensial ampikon. Kandidat primer terbaik untuk identifikasi turunan babi yaitu primer *forward* rRNA-5 (5' GTACTACTCGCAACTGCCTAAA 3') dan primer *reverse* rRNA-6 (5' GCAAGGGTTGGTAAGGTCTATC 3') karena memiliki sifat primer dan sifat sekunder yang memenuhi persyaratan. Oleh karena itu, pasangan primer ini dapat digunakan untuk menganalisis sampel secara *in vitro* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

## Referensi

- [1]. Widayat W, Winarni Agustini T, Suzery M, Ni'matullah Al-Baarri A, Rahmi Putri S. Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sebagai Alat Deteksi DNA Babi dalam Beberapa Produk Non-Pangan. *Indones J Halal*. 2019;2(1):26. <https://doi.org/10.14710/halal.v2i1.5361>
- [2]. Zabidi AR, Fauzi FN, Abd Razak FN, Rosli D, Jamil MZM, Wan Ibrahim WK, et al. Screening porcine DNA in collagen cream cosmetic products. *Food Res*. 2019;4(February):151–6. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(S1\).S05](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(S1).S05)
- [3]. Khan N, Sarwar A, Tan BC. Determinants of purchase intention of halal cosmetic products among Generation Y consumers. *J Islam Mark*. 2020; <https://doi.org/10.1108/JIMA-11-2019-0248>
- [4]. Sionkowska A, Adamiak K, Musial K, Gadomska M. Collagen based materials in cosmetic applications: A review. Vol. 13, *Materials*. 2020. <https://doi.org/10.3390/MA13194217>
- [5]. Xhaufaire-Uhoda E, Fontaine K, Piérard GE. Kinetics of moisturizing and firming effects of cosmetic formulations. *Int J Cosmet Sci*. 2008;30(2). <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00436.x>
- [6]. Bukhari SNA, Roswandi NL, Waqas M, Habib H, Hussain F, Khan S, et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. Vol. 120, *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188>
- [7]. Miljkovic S, Jeftic B, Sarac D, Matovic V, Slavkovic M, Koruga D. Influence of hyper-harmonized fullerene water complex on collagen quality and skin function. *J Cosmet Dermatol*. 2020;19(2). <https://doi.org/10.1111/jocd.12999>
- [8]. Extraction of acid and pepsin soluble collagen from selected Malaysian freshwater fish muscles: modified Lowry's measurement method. *J Agrobiotechnology*. 2013;4(1).
- [9]. Kim YS, Yu HK, Lee BZ, Hong KW. Effect of DNA extraction methods on the detection of porcine ingredients in halal cosmetics using real-time PCR. *Appl Biol Chem*. 2018;61(5). <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0389-x>
- [10]. Shabani H, Mehdizadeh M, Mousavi SM, Dezfouli EA, Solgi T, Khodaverdi M, et al. Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. *Food Chem*. 2015;184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.140>
- [11]. Hidayati H, Hasbullah H, Hasri S. Methods for Detection of Foods, Cosmetics, and Drugs Through A Mitochondrial DNA Analysis (An Overview of the Molecular and the Qur'anic Aspects). In 2020. <https://doi.org/10.4108/eai.1-10-2019.2291746>
- [12]. Nikzad J, Shahhosseini S, Tabarzad M, Nafissi-Varcheh N, Torshabi M. Simultaneous detection of bovine and porcine DNA in pharmaceutical gelatin capsules by duplex PCR assay for Halal authentication. *DARU, J Pharm Sci*. 2017;25(1). <https://doi.org/10.1186/s40199-017-0171-3>

- [13]. Hall Sedlak R, Jerome KR. The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics. Vol. 14, Expert Review of Molecular Diagnostics. 2014. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.910456>
- [14]. Kameswari S, Brundha MP, Ezhilarasan D. Advantages and disadvantages of RT-PCR in COVID 19. Eur J Mol Clin Med. 2020;7(1).
- [15]. Ma J, Wang YP, Ren S, Zhang Z, Lu S, Wang PW. Cloning flanking sequence by single-primer PCR in transgenic plants. Genet Mol Res. 2014;13(4). <https://doi.org/10.4238/2014.October.20.16>
- [16]. Ahlawat S, Sharma R, Maitra A, Roy M, Tantia MS. Designing, optimization and validation of tetra-primer ARMS PCR protocol for genotyping mutations in caprine Fec genes. Meta Gene. 2014;2. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2014.05.004>
- [17]. Medrano RFV, De Oliveira CA. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. Mol Biotechnol. 2014;56(7). <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9734-4>
- [18]. Vandevanter DR, Warriner P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, et al. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. J Clin Microbiol. 1996;34(7). <https://doi.org/10.1128/jcm.34.7.1666-1671.1996>
- [19]. Padhi BK, Pelletier G, Shwed PS. A bioinformatics workflow for the evaluation of RT-qPCR primer specificity: Application for the assessment of gene expression data reliability in toxicological studies. Regul Toxicol Pharmacol. 2020;111. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104575>
- [20]. Pitaloka DAE, Ramadhan DSF, Arfan, Chaidir L, Fakih TM. Docking-based virtual screening and molecular dynamics simulations of quercetin analogs as enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) inhibitors of mycobacterium tuberculosis. Sci Pharm. 2021;89(2). <https://doi.org/10.3390/scipharm89020020>
- [21]. Cahyadi M, Wibowo T, Pramono A, Abdurrahman ZH. A novel multiplex-pcr assay to detect three non-halal meats contained in meatball using mitochondrial 12s rna gene. Food Sci Anim Resour. 2020;40(4). <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e40>
- [22]. Galal-Khallaif A. Multiplex PCR and 12S rRNA gene sequencing for detection of meat adulteration: A case study in the Egyptian markets. Gene. 2021;764. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145062>
- [23]. Hassab El-Nabi S, Hussein D, Khallafa A. Molecular detection of food fraud targeting mitochondrial 12S rRNA gene sequencing. J Biosci Appl Res. 2021;0(0). <https://doi.org/10.21608/jbaar.2021.167091>
- [24]. Kang SSN, Lee HG, Kim H. Development and comparison of a porcine gelatin detection system targeting mitochondrial markers for Halal authentication. LWT. 2018;97. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.062>
- [25]. Acland A, Agarwala R, Barrett T, Beck J, Benson DA, Bollin C, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 2013;41(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1189>
- [26]. Hu D, Hu S, Wan W, Xu M, Du R, Zhao W, et al. Effective optimization of antibody affinity by phage display integrated with high-throughput DNA synthesis and sequencing technologies. PLoS One. 2015;10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129125>
- [27]. Wang K, Li H, Xu Y, Shao Q, Yi J, Wang R, et al. MFEprimer-3.0: Quality control for PCR primers. Nucleic Acids Res. 2019;47(W1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz351>
- [28]. WANG X, ZHANG H, ZHAO X, ZHAI Z, JU Z, PENG J, et al. Complete genome sequence of mcr-1-harboring Escherichia coli discovered from Mink. Minerva Biotechnol. 2020;32(4). <https://doi.org/10.23736/S1120-4826.20.02649-X>
- [29]. Wang KW, Barker K, Benner S, Betancourt T, Hall CK. Development of a simple coarse-grained DNA model for analysis of oligonucleotide complex formation. Mol Simul. 2018;44(12). <https://doi.org/10.1080/08927022.2018.1469753>
- [30]. Li Y, Zhang J, Wei W, Wang Z, Prinz M, Hou Y. A strategy for co-analysis of microRNAs and DNA. Forensic Sci Int Genet. 2014;12. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.04.011>
- [31]. Yasmon A, Fatmawati NND, Ibrahim F, Bela B. A second generation of RT-PCR assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. Med J Indones. 2010;19(3). <https://doi.org/10.13181/mji.v19i3.397>
- [32]. Razei A, Sorouri R, Mousavi SL, Nazarian S, Amani J, Aghamollaei H. Presenting a rapid method for detection of Bacillus cereus, Listeria monocytogenes and Campylobacter jejuni in food samples. Iran J Basic Med Sci. 2017;20(9). <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.9275>
- [33]. Giménez MJ, Pistón F, Martín A, Atienza SG. Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. Food Chem. 2010;118(2). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.012>
- [34]. Zaid T, Ereqat S, Nasereddin A, Al-Jawabreh A, Abdelkader A, Abdeen Z. Molecular characterization of Anaplasma and Ehrlichia in ixodid ticks and reservoir hosts from Palestine: a pilot survey. Vet Med Sci. 2019;5(2). <https://doi.org/10.1002/vms3.150>
- [35]. Li LY, Li Q, Yu YH, Zhong M, Yang L, Wu QH, et al. A primer design strategy for PCR amplification of GC-rich DNA sequences. Clin Biochem. 2011;44(8-9). <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.02.001>
- [36]. Motta FC, Born PS, Resende PC, Brown D, Siqueira MM. An inexpensive and accurate reverse transcription-PCR-melting temperature analysis assay for real-time influenza virus B lineage discrimination. J Clin Microbiol. 2019;57(12). <https://doi.org/10.1128/JCM.00602-19>
- [37]. Chen H, Takei F, Koay ESC, Nakatani K, Chu JJH. A novel DANP-coupled hairpin RT-PCR for rapid detection of Chikungunya virus. J Mol Diagnostics. 2013;15(2). <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.10.004>
- [38]. Yang Z, Le JT, Hutter D, Bradley KM, Overton BR, McLendon C, et al. Eliminating primer dimers and improving SNP detection using self-avoiding molecular recognition systems. Biol Methods Protoc. 2020;5(1). <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa004>.



Copyright © 2021 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)