

## Kajian Literatur: Validasi Metode Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR) pada Identifikasi Babi

### Review Article: Validation of Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) Method in Pork Identification

Chandra kartika Nawangsari<sup>1</sup>, Rochmy Istikharah<sup>1</sup>, Muhammad Hatta Prabowo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Farmasi, Universitas Islam Indonesia, 55574

<sup>a</sup>Korespondensi : Chandra Kartika Nawangsari, E-mail: 24924026@students.uui.ac.id

Diterima: 14 – 08 – 2025 , Disetujui: 30 – 10 – 2025

#### ABSTRACT

Intentional mixing or contamination by other animal species in products often occurs for various purposes. In Indonesia, where religious freedom is highly valued, halal compliance is a sensitive issue, making halal assurance essential. To detect pork contamination, a validated, efficient, and reliable method is required. One such method is the multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction (multiplex Real-Time PCR). This scoping review aims to identify biomarkers used for porcine DNA analysis with this method. The findings show that its effectiveness is influenced by the detection basis, number of cycles, and annealing temperature. Variation in target DNA also affects analysis results, as target selection determines specificity and sensitivity. Overall, multiplex Real-Time PCR can detect small amounts of DNA with high accuracy, making it relevant for food monitoring and halal authentication. Hence, this study provides insights for stakeholders in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries regarding more accurate detection of pork contamination using multiplex Real-Time PCR.

**Keywords:** Multiplex, Real Time PCR, Identification, Pork, Method Validation

#### ABSTRAK

Pencampuran secara sengaja maupun kontaminasi oleh keberadaan hewan lain dalam suatu produk kerap terjadi dengan berbagai tujuan. Sebagai negara yang menjunjung tinggi kebebasan beragama, isu penegakan syariat Islam seperti kehalalan menjadi topik sensitif dimasyarakat. Hal ini menyebabkan penting adanya penjaminan halal bagi masyarakat Indonesia. Sebagai upaya deteksi kontaminasi babi, diperlukan metode yang tervalidasi, efisien, serta hadal. Salah satu metode handal yang dapat digunakan adalah *multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction (multiplex Real Time PCR)*. *Scoping review* ini bertujuan mengidentifikasi biomarker yang digunakan dalam analisis DNA babi menggunakan metode tersebut. Hasil menunjukkan bahwa efektivitas *multiplex Real Time PCR* dipengaruhi oleh basis metode deteksi, jumlah siklus, dan suhu *annealing*. Selain itu, penggunaan target DNA yang berbeda juga menghasilkan variasi dalam analisis, karena pemilihan target DNA sangat menentukan tingkat spesifisitas dan sensitivitas. Secara keseluruhan, metode *multiplex Real Time PCR* terbukti mampu mendeteksi DNA dalam jumlah kecil dengan akurasi tinggi, sehingga relevan untuk diterapkan dalam pengawasan produk pangan dan analisis kehalalan. Oleh karena itu, kajian ini akan memberikan pandangan pada pelaku usaha pangan, kosmetika, dan farmasi mengenai pengujian yang lebih akurat untuk cemaran babi menggunakan metode *multiplex Real Time PCR*.

**Kata kunci:** Multipleks, *Real Time PCR*, Identifikasi, Babi, Validasi Metode

---

Nawangsari, C. K., Istikharah, R., & Prabowo, M. H. Kajian Literatur: Validasi Metode Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR) Pada Identifikasi Babi. *Jurnal Ilmiah Pangan Halal*, 7(3), 390–404. <https://doi.org/10.30997/jiph.v7i3.21356>

---

## PENDAHULUAN

Produk dari hewan merupakan salah satu pemenuh kebutuhan gizi setiap individu. Namun, tidak jarang dalam prosesnya, dilakukan pencampuran dari bahan yang tidak sesuai dengan yang tertera pada label maupun terkontaminasi produk yang dilarang untuk dikonsumsi oleh sebagian individu (Indriati *et al.*, 2019). Sebagai contoh, pemeluk agama Islam tidak dapat mengonsumsi makanan yang mengandung ataupun berpotensi mengandung babi.

Dimasa kini, perkembangan jaminan halal secara global menunjukkan adanya peningkatan kepedulian berbagai negara terhadap kepentingan masyarakat muslim. Upaya tersebut memungkinkan umat muslim diseluruh dunia untuk mengonsumsi atau menggunakan suatu produk tanpa khawatir akan status halal suatu produk. Beberapa negara diketahui telah membentuk lembaga pengawas serta menerapkan regulasi yang mengatur penjaminan halal, seperti American Halal Foundation (AHF) di Amerika Serikat, Department of Islamic Development Malaysia (JAKIM) di Malaysia, Badan Penyelenggara Jaminan Produk Halal (BPJPH) di Indonesia (Azam & Abdullah, 2021). Kehadiran berbagai lembaga dan regulasi tersebut menunjukkan bahwa isu penjaminan halal tidak hanya menjadi perhatian bagi masyarakat Indonesia serta isu penjaminan halal telah berkembang menjadi perhatian global, khususnya bagi masyarakat Muslim di seluruh dunia.

Di Indonesia, sebagai langkah perlindungan, Indonesia mengeluarkan regulasi mengenai perlindungan konsumen yang tertuang dalam Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 33 Tahun 2014 Tentang Jaminan Produk Halal yang mengatur mengenai kepastian produk halal bagi masyarakat Indonesia. Selain itu, regulasi lain mengenai penjaminan halal telah tercantumkan secara tegas pada Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 42 Tahun 2024 Tentang Penyelenggaraan Bidang Produk Halal. Regulasi tersebut menerangkan bahwasannya, produk non-halal harus terpisahkan dengan produk halal. Disamping itu, adanya ancaman yang menyertai mengenai kontaminasi babi pada produk menunjukkan keseriusan dalam penjaminan halal di Indonesia.

Menurut Badan Standardisasi Nasional (2024), identifikasi cemaran/kontaminasi babi dapat dilakukan dengan instrumen *Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR)*. Instrumen *Real Time PCR* diketahui memiliki kemampuan sensitivitas yang lebih baik dibandingkan instrumen PCR konvensional (Artika *et al.*, 2022; Hanifehpour *et al.*, 2024; Lubis *et al.*, 2018). Tidak hanya kemampuan sensitivitasnya, keterbatasan lain dari PCR konvensional adalah proses pembacaan elektroforesis yang beresiko terjadi kontaminasi silang. Hal ini dapat menyebabkan kerusakan pada gel agarose, sehingga proses analisis dapat terhambat (Artika *et al.*, 2022). Oleh karena itu, analisis *Real Time PCR* dapat menjadi salah satu pilihan dalam mendeteksi kontaminasi kandungan babi dalam produk yang diketahui membutuhkan metode dengan kemampuan akurasi yang tinggi.

Salah satu upaya dalam meningkatkan efisiensi kerja pada *Real Time PCR* yaitu, dilakukan analisis dengan *multiplex* atau memasukkan primer berbagai target DNA dalam satu reaksi (Indriati *et al.*, 2019). Pendekatan tersebut memungkinkan adanya efisiensi waktu, bahan, biaya, hingga tenaga. Akan tetapi, analisis metode *multiplex* dalam identifikasi babi termasuk jarang dilakukan. Hal ini dikarenakan, banyaknya target DNA dan berbagai jenis primer yang disertakan dapat meningkatkan risiko kemunculan primer dimer hingga kegagalan amplifikasi (Wolff *et al.*, 2020). Kelebihan metode analisis *multiplex* ini dapat memberikan hasil yang akurat dan lebih efisien dalam mendeteksi berbagai macam target DNA (Mas-Carrió *et al.*, 2025). Oleh karena itu, perlu adanya metode yang tervalidasi, handal, cepat, efisien, dan akurat untuk mendeteksi kontaminasi kandungan babi. Pada uji kualitatif untuk identifikasi, perlu dilakukan uji sensitivitas dan uji spesifisitas untuk mengetahui kualitas suatu metode (FDA, 2023; ICH, 2022).

Melalui tinjauan ini, diharapkan dapat memberikan pemahaman yang komprehensif mengenai salah satu metode dalam mengidentifikasi cemaran babi pada suatu produk. Kajian ini bertujuan untuk menelusuri keunggulan, keterbatasan, serta efektivitas metode *multiplex Real Time PCR* yang dapat dimanfaatkan oleh industri pangan, kosmetika, dan farmasi dalam menjaga mutu, keamanan, dan menjamin kehalalan produk.

## MATERI DAN METODE

Metode pengumpulan data pada artikel ini melalui kajian literatur ilmiah. Data diperoleh melalui pencarian secara daring menggunakan aplikasi *Publish or Perish 7* yang terhubung dengan berbagai database (*PubMed*, *Science Direct*, dan *Google Scholar*). Selain itu, dilakukan pengumpulan data melalui pencarian secara manual pada database dan *hand searching*. Pencarian literatur menggunakan kata kunci *multiplex*, *Real Time Polymerase Chain Reaction*, *Real Time PCR*, *pork*, *animal*, dan *food* yang dikombinasikan satu sama lain dengan kata hubung *AND* pada antar kata.

Artikel terpilih merupakan artikel 10 tahun terakhir dengan kriteria inklusi berupa, artikel penelitian eksperimental mengenai identifikasi hewan melalui analisis DNA serta metode analisis yang digunakan berupa *multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction* atau *multiplex Quantitative Polymerase Chain Reaction* (m-qPCR). Disisi lain, artikel yang diulas telah disinkronisasi melalui pengecualian berdasar kriteria eksklusi berupa; penelitian identifikasi DNA selain babi, bukan penelitian metode validasi pada identifikasi keberadaan babi, merupakan artikel metode kuantifikasi DNA, dan dipublikasikan dalam bahasa selain bahasa Indonesia dan bahasa Inggris. Artikel yang didapatkan kemudian ditinjau secara manual untuk disesuaikan dengan topik kajian. Hasil peninjauan artikel terpilih akan digabungkan menjadi data yang padu dan mencerminkan metode *multiplex Real Time PCR* pada identifikasi DNA babi yang tervalidasi.

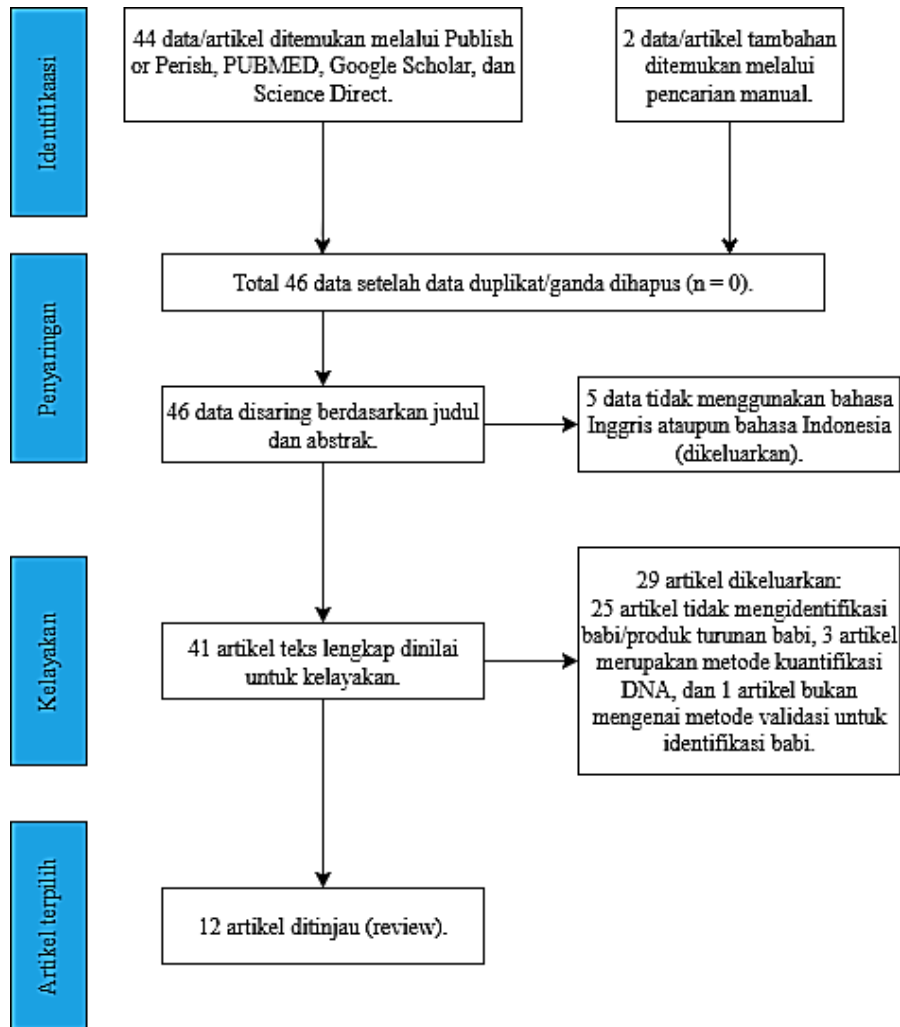
### Strategi pencarian dan kriteria seleksi

Pencarian artikel dilakukan guna mendukung *scoping review* dengan studi seleksi melalui aplikasi, database, serta manual menggunakan logika Boolean (AND, OR, NOT) dengan menghubungkan kata kunci terkait. Strategi pencarian tertera sebagaimana pada Tabel 1.

Tabel 1. Kata kunci pencarian artikel ilmiah

Sarana pencarian	Kata kunci pencarian	Jumlah artikel
Aplikasi <i>Publish or Perish</i> pada database <i>Scopus</i>	<i>Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction</i>	2
	<i>Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction AND pork</i>	4
	<i>Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction AND animal</i>	5
	<i>Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction AND food</i>	3
Aplikasi <i>Publish or Perish</i> pada database <i>PubMed</i>	<i>Multiplex AND Real Time PCR and Pork</i>	6
	<i>Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction AND food</i>	2
	<i>Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction AND animal</i>	1
Aplikasi <i>Publish or Perish</i> pada database <i>Google Scholar</i>	<i>Multiplex AND Real Time PCR and Pork</i>	4
	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction And animal AND Multiplex</i>	4
	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction And Pork AND Multiplex</i>	5
	<i>multiplex real time polymerase chain reaction AND animal</i>	1
	<i>Multiplex AND Real Time PCR and Pork</i>	6
Database <i>Science Direct</i>	<i>Multiplex AND Real Time PCR and Pork</i>	2
Manual, pencarian pada sitasi artikel	-	2

Total artikel yang didapatkan berjumlah 46 artikel. Artikel terpilih kemudian dilakukan *skrining* artikel dengan kriteria inklusi dan eksklusi, sehingga didapatkan sejumlah 12 artikel yang relevan dengan topik kajian seperti pada Gambar 1. Artikel tersebut selanjutnya akan direview secara mendalam.



Gambar 1. Diagram Metodologi Pencarian Artikel

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### ***Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR)***

*Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR)* merupakan salah satu teknik identifikasi berbasis molekular dengan cara menggandakan DNA melalui serangkaian siklus perubahan suhu sebagaimana *thermal cyclers* pada umumnya. Analisis dengan *Real Time PCR* dapat dilakukan melalui 2 metode yaitu, metode *single-plexing* atau simpleks dan *multiplexing*. Simpleks merupakan metode analisis pada satu target per-reaksi. Sementara itu, *multiplex* merupakan suatu simulasi pengujian atau evaluasi terhadap beberapa unsur eksperimen dalam satu kali percobaan (Grohmann *et al.*, 2021). Perbedaan metode simpleks dan multipleks tercantumkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Perbedaan metode multiplex dan simpleks.

	<b>Metode <i>simplex</i></b>	<b>Metode <i>multiplex</i></b>
<b>Kelebihan</b>	Penggunaan satu set primer/ probe pada reaksi menjadikan metode ini memiliki risiko kecil terkait interaksi antar primer (primer dimer). Selain itu, kemampuan identifikasi setiap reaksi menjadikan data yang dihasilkan sederhana, stabil untuk konsentrasi rendah, meningkatkan sensitivitas reaksi, memiliki kemampuan spesifisitas yang baik karena hanya satu target yang diidentifikasi (Mas-Carrió <i>et al.</i> , 2025).	Metode <i>multiplex</i> dapat memungkinkan analisis 2 atau lebih target dalam satu reaksi yang sama, sehingga dapat meningkatkan efisiensi kerja, mengurangi beban waktu dan biaya, dan meningkatkan hasil analisis (Osadare <i>et al.</i> , 2025).
<b>Kekurangan</b>	Pada analisis lebih dari satu target membutuhkan lebih banyak reaksi, sehingga konsumsi reagen, waktu, dan tenaga untuk preparasi menjadi lebih banyak (Alary <i>et al.</i> , 2002).	Banyaknya set primer yang digunakan untuk mendeteksi 2 atau lebih target menjadikan risiko kejadian primer dimer akan meningkat. Selain itu, banyaknya target yang ingin diidentifikasi secara bersamaan menjadikan adanya risiko kompetisi antara target yang dapat menurunkan kemampuan sensitivitas metode (Tombuloglu <i>et al.</i> , 2022).

### Dasar Deteksi Pada *Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR)*

Basis deteksi pada *Real Time PCR* terbagi berdasarkan mekanisme sinyal fluoresensi selama proses amplifikasi/penggandaan DNA. Basis deteksi tersebut terbagi menjadi 2 klasifikasi. Klasifikasi pertama adalah berbasis *dye* yang memanfaatkan peristiwa interkalasi saat *dye* terjebak dalam untai ganda DNA pada saat proses amplifikasi (Dunbar & Das, 2019). Menilik pada mekanisme sinyal fluoresensi, pada basis deteksi ini perlu dilakukan analisis *temperature melting* ( $T_m$ ) untuk melihat kemampuan spesifisitas dari metode dengan cara melakukan pemanasan secara bertahap hingga didapati seluruh produk teruraikan menjadi untai tunggal.

Klasifikasi kedua adalah berbasis probe atau penandaan yang memanfaatkan proses penempelan probe spesifik pada target selama proses amplifikasi (Navarro *et al.*, 2015). Berbanding terbalik dengan metode berbasis *dye*, pada metode ini tidak dapat dilakukan analisis *temperature melting*. Kondisi ini disebabkan karena pada proses amplifikasi, *fluoresense* akan terpisah dengan reporternya yang menjadikan pendaran sinyal fluoresensi tetap terjadi sekalipun dilakukan penguraian untai ganda DNA. Uraian rinci mengenai hal tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Uraian basis deteksi pada *Real Time* PCR.

	<b>Metode deteksi berbasis <i>dye</i> (pewarnaan)</b>	<b>Metode deteksi berbasis <i>probe</i> (penandaan)</b>
<b>Mekanisme fluoresensi</b>	Interkalasi antara fluorophore dengan untai ganda selama proses amplifikasi yang menyebabkan pelepasan energi cahaya dengan gelombang panjang yang lebih jauh (Dunbar & Das, 2019; Wong <i>et al.</i> , 2015).	Degradasi reporter/ <i>quencher</i> dengan fluorophore atau donor yang menjadikan energi cahaya akan berhamburan, sehingga sinyal fluoresensi yang berasal dari energi cahaya yang berhamburan dapat dideteksi oleh instrumen (Navarro <i>et al.</i> , 2015).
<b>Kelebihan</b>	Metode ini dikenal memiliki sensitivitas yang baik, mudah untuk digunakan, serta murah dari sisi ekonomi (Artika <i>et al.</i> , 2022).	<i>Probe</i> yang didesain spesifik pada target menjadikan kemampuan spesifisitas metode ini lebih baik (Artika <i>et al.</i> , 2022).
<b>Kekurangan</b>	Menilik pada mekanismenya, metode ini berisiko tinggi menghasilkan positif palsu dan kurang spesifik karena sifat <i>dye</i> yang dapat berinterkalasi dengan seluruh untai ganda. Kondisi tersebut menjadikan perlu adanya analisis <i>temperature melting</i> ( $T_m$ ) yang menyebabkan adanya peningkatan waktu analisis untuk melihat spesifisitas metode. Selain itu, perlu dipastikan terkait instrumen <i>Real Time</i> PCR yang digunakan kompatibel untuk analisis <i>temperature melting</i> ( $T_m$ ) selama proses analisis (Artika <i>et al.</i> , 2022).	Perlu adanya desain <i>probe</i> yang spesifik pada DNA target menjadikan perlu adanya peningkatan kebutuhan waktu dan biaya, serta perlu kemampuan khusus dalam mendesain <i>probe</i> (Bustin & Nolan, 2004).
<b>Contoh jenis fluorophore</b>	SYBR Green, EvaGreen, dan ResoLight.	TaqMan probe.

### **Metode *Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR)*.**

Berdasarkan 12 artikel penelitian yang dianalisis, terdapat 4 artikel yang menggunakan metode berbasis *dye* atau pewarnaan dan 8 artikel yang menggunakan metode berbasis *probe* atau penanda. Penggunaan metode tersebut memiliki persamaan dan perbedaan baik secara prinsip hingga kemampuan analisis sebagaimana yang tercantum pada Tabel 4 dan Tabel 5.

### **Analisis Identifikasi Dengan Basis *Dye* (Pewarnaan)**

Metode berbasis *dye* atau pewarnaan merupakan suatu metode amplifikasi yang memanfaatkan suatu *dye* dalam analisis. Metode ini merupakan metode yang menggunakan prinsip *double-stranded DNA intercalating molecules* (Artika *et al.*, 2022). Metode dengan basis tersebut diantaranya SYBR Green, EvaGreen, dan ResoLight. Pada prinsipnya, metode tersebut memanfaatkan kejadian interkalasi pada fluorophore dengan DNA yang teramplifikasi (Siew, 2023). Pada proses interkalasi, fluorophore akan mengeluarkan cahaya yang akan ditangkap oleh detektor instrumen. Kelebihan metode ini adalah harganya yang ekonomis, mudah digunakan, serta memiliki sensitivitas yang baik (Artika *et al.*, 2022). Akan tetapi, metode ini kurang spesifik karena dapat berinteraksi dengan seluruh DNA yang teramplifikasi seperti primer dimer ataupun amplicon nonspesifik (Artika *et al.*, 2022).

Tabel 4. Hasil analisis *scoping review* berdasarkan metode deteksi berbasis *dye* (pewarna).

No.	Jenis Sampel Uji	Jenis fluorophore	Kondisi Instrumen	Hasil Analisis (suhu T <sub>m</sub> ) babi (°C)	Author
1	Darah dan daging	ResoLight® dye	Suhu <i>annealing</i> 56°C selama 30 detik sebanyak 27 siklus	80.57-81.60	(Denyinghot et al., 2021)
2	Daging	SYBR Green	Suhu <i>annealing</i> 57°C selama 45 detik sebanyak 30 siklus	80.61	(Li et al., 2021)
3	Darah, rambut, saliva, jaringan testikuler, jaringan ovarium, otot, dan tulang	SYBR Green	Suhu <i>annealing</i> 60°C selama 20 detik sebanyak 40 siklus	77.19	(Ishida et al., 2018)
4	Daging	Evagreen	Suhu <i>annealing</i> 62°C selama 5 detik sebanyak 33 siklus	74.40 ± 0.35	(Thanakiatkrai & Kitpipit, 2017)

Pada metode ini sangat disarankan untuk dilakukan analisis *melting curve* atau *Temperature melting* (T<sub>m</sub>) untuk melihat kemampuan spesifisitasnya. Berdasarkan 4 artikel yang diulas, seluruh artikel melakukan analisis *Temperature melting* (T<sub>m</sub>) untuk melihat kemampuan spesifisitas metode. Suhu leleh primer yang didapatkan berkisar 74,40 – 81,60°C. Sementara itu, siklus yang digunakan pada analisis berkisar 27 – 40 siklus dengan suhu *annealing* yang digunakan berkisar 56 - 62°C. Akan tetapi, seluruh artikel yang melakukan analisis dengan metode berbasis *dye* tidak menyertakan nilai *Cycle quantification* (C<sub>q</sub>).

#### Analisis Identifikasi Dengan Basis *Probe* (Penanda)

Tabel 5. Hasil analisis *scoping review* berdasarkan metode deteksi berbasis probe (penanda) dengan jenis TaqMan Probe.

No.	Jenis Sampel Uji	Kondisi Instrumen	Hasil Analisis (nilai C <sub>q</sub> )	Author
1	CRM (Bahan baku terverifikasi)	Suhu <i>annealing</i> 60°C selama 30 detik sebanyak 40 siklus.	22.64±0.04	(Chang et al., 2025)
2	Daging	Suhu <i>annealing</i> 60°C selama 20 detik sebanyak 40 siklus .	20.52 ± 0.005	(Yadav et al., 2024)
3	Daging	Suhu <i>annealing</i> 60°C selama 34 detik sebanyak 40 siklus.	13.79	(Guo et al., 2022)
4	Otot <i>biceps femoris</i>	Suhu <i>annealing</i> 60°C selama 30 detik sebanyak 47 siklus.	28.68 ± 0.26	(Nesvadbova et al., 2022)
5	Bubuk gelatin	Suhu <i>annealing</i> 59°C selama 60 detik sebanyak 45 siklus.	20.47 ± 0.77	(Sultana et al., 2020)
6	Daging	Suhu <i>annealing</i> 60°C selama 20 detik sebanyak 40 siklus.	18.89 ± 0.27	(Kim & Kim, 2019)
7	Daging	Suhu <i>annealing</i> 59°C selama 25 detik sebanyak 40 siklus.	21.34 ± 0.06	(Xu et al., 2018)
8	Daging	Suhu <i>annealing</i> 60°C selama 60 detik sebanyak 40 siklus.	14.80 ± 0.05	(Hossain et al., 2017)

Metode berbasis penanda (*probes*) yang mengikat pada oligonukleutida secara spesifik (Artika et al., 2022). Pada metode ini terdiri atas *hydrolysis probes* (*TaqMan probes*), *dual hybridization probes*, *molecular beacons*, dan *scorpion probes* (Artika et al., 2022). Sementara

itu, fluorophore merupakan suatu molekul *fluorescence* yang dapat mengabsorpsi energi cahaya dan kemudian dilepaskan pada panjang gelombang tertentu (Artika *et al.*, 2022). Fluorophore atau *probes* terdiri atas donor atau reporter dan *acceptor* atau *quencher*. Prinsip kerja fluorophore yaitu, fluorophore donor akan menyerap energi cahaya hingga mencapai keadaan eksitasi. Energi yang terserap, selanjutnya akan dilepaskan. Emisi energi yang terlepas akan menjadi *fluorescence* yang terdeteksi oleh detektor (Artika *et al.*, 2022).

Pada identifikasi dengan *Real Time PCR*, seringkali digunakan *TaqMan Probe* yang termasuk ke dalam *hydrolysis probes*. Metode ini terdiri atas reporter dan quencher akan menempel secara spesifik ketika proses *annealing*. Pada proses *extension*, enzim *DNA Polymerase* akan mulai mensintesis DNA, sehingga fluorophore yang terlekat pada DNA akan mengalami degradasi. Proses degradasi tersebut menyebabkan reporter terpisah dari *quencher* dan mengalami *fluorescence* (Navarro *et al.*, 2015). Sesuai dengan sifatnya, fluorophore akan melekat pada target secara spesifik, sehingga kemampuan spesifik metode ini lebih baik dibandingkan metode berbasis pewarnaan (Artika *et al.*, 2022). Disisi lain, menilik mekanisme kerja *probe* menjadikan metode ini memiliki keterbatasan dalam menganalisis *melting curve* serta artefak yang dapat mengganggu efisiensi amplifikasi (Bustin & Nolan, 2004). Disamping itu, metode ini membutuhkan waktu serta biaya yang lebih banyak untuk mendesain *probe* yang spesifik terhadap setiap target (Bustin & Nolan, 2004).

Berdasarkan 8 artikel yang menggunakan metode *TaqMan Probe*, hasil pengujian dilaporkan dalam bentuk nilai *Cycle quantification (Cq)* atau *Crossing threshold (Ct)*. Nilai *Cq* yang didapatkan berkisar 13,79-28,68. Pada metode ini, tidak dapat dilakukan analisis *temperature melting*, sehingga kemampuan spesifisitas metode ditunjukkan melalui kemampuan amplifikasi. Pada metode ini, suhu yang digunakan pada proses *annealing* untuk deteksi babi berkisar 59-60°C dengan jumlah siklus berkisar 40-47 siklus.

Pada konteks metode, pemilihan basis metode deteksi; penggunaan suhu *annealing*; serta penerapan jumlah siklus dapat mempengaruhi keberhasilan dalam analisis. Hal ini dikarenakan kemampuan spesifisitas dipengaruhi oleh pemilihan basis metode deteksi. Pada analisis dengan metode berbasis *probe* memiliki kemampuan spesifisitas lebih tinggi dibandingkan dengan metode berbasis *dye*. Sementara itu, kemampuan spesifisitas dipengaruhi oleh suhu *annealing* serta jumlah siklus yang digunakan. Jumlah siklus yang sedikit dapat menghasilkan amplifikasi yang kurang memadai serta kemampuan deteksi analit pada kadar kecil yang lebih rendah dibandingkan jumlah siklus yang banyak (Hilscher *et al.*, 2005). Akan tetapi, jumlah siklus yang banyak juga dapat menyebabkan adanya amplifikasi non spesifik (Hilscher *et al.*, 2005). Pada penentuan suhu *annealing*, setiap primer memiliki suhu *annealing* yang berbeda. Oleh karena itu, diperlukan pemilihan suhu *annealing* yang optimal.

### Identifikasi target DNA babi pada perspektif parameter validasi spesifisitas

Berdasarkan 12 jurnal yang didapatkan, 10 jurnal menggunakan target DNA pada DNA mitokondria dan 2 jurnal menggunakan DNA nukleus. Penggunaan target DNA tersebut memiliki persamaan dan perbedaan seperti yang tercantum pada Tabel 6 dan Tabel 7.

### Identifikasi DNA Babi pada DNA Mitokondria

Tabel 6. Hasil analisis *scoping review* berdasarkan target DNA mitokondria

No.	Target DNA babi	Sekuen primer Babi dan probe	LOD	Author
1	ND5	<p><b>Primer forward =</b>                      5'- GCGCCATCCCAATTATAATATCCAAC -                      3';</p> <p><b>primer reverse =</b>                      5'- TGATTATTTCTTGGCCTGTGTGT - 3'</p>	0.001 ng	(Denyinghot <i>et al.</i> , 2021)

2	<i>CO I</i>	<b>Primer forward</b> = 5'- TACTTCTACTATCCCTGCCAGTTC - 3'; <b>primer reverse</b> = 5'- TGATAAAGGATAGGGTCTCCACCA - 3'	0.01 - 0.1 ng	(Li <i>et al.</i> , 2021)
3	<i>tRNA ATPB</i>	<b>Primer forward</b> = 5'- AGCCTAAATCTCCCCTCAATGG -3'; <b>primer reverse</b> = 5'- GGGCTTGCTGGGTATGAGTAG - 3'	0.01 ng	(Ishida <i>et al.</i> , 2018)
4	<i>Cyt b</i>	<b>Primer forward</b> = 5'- ACAACAACAGCTTTCTCATCAGTTACA -3'; <b>primer reverse</b> = 5'- CTCATCCGTAATTTACGTCTCGACA - 3'	0.32 ng	(Thanakiatkrai & Kitpipit, 2017)
5	<i>ND5</i>	<b>Primer forward</b> = 5'- AACCCATTCGCCTCACTCAC-3'; <b>primer reverse</b> = 5'- GCGTAGGATACGGTGGTTT - 3'; <b>Probe</b> = 5' VIC- TAGATGTTTGGATTGGATATTAT-NFQ-MGB	0.0001 ng	(Yadav <i>et al.</i> , 2024)
6	<i>12S rRNA</i>	<b>Primer forward</b> = 5'- CTTACCTTGTTACGACTTGTCTC -3'; <b>primer reverse</b> = 5'- TTGAATAAGGCATGAAGC - 3'; <b>Probe</b> = 5' HEX- TTCTTGCATGGTGTGTAATTGAATATAGGT-TAMRA	0.0005 ng	(Guo <i>et al.</i> , 2022)
7	<i>Cyt b</i>	-	0.005 ng	(Sultana <i>et al.</i> , 2020)
8	<i>D-Loop</i>	<b>Primer forward</b> = 5'- AGCTGGACTTCATGGAATC - 3'; <b>primer reverse</b> = 5'- GCACGTTATGTCCTGTAACC - 3'; <b>Probe</b> = 5' FAM-GATCCGGCAGCACAATCCAA-MGBNFQ	0.0001 ng	(Kim & Kim, 2019)
9	<i>Gen mitochondrial</i>	<b>Primer forward</b> = 5'- CAGCAACCGTATTCACAGGAT - 3'; <b>primer reverse</b> = 5'- GGCTACTGGTTGAATAAATAGGC - 3'; <b>Probe</b> = 5' Cy3 -TTTCTACCACAA+GGAACACCCGCC-BHQ2	0.01 ng	(Xu <i>et al.</i> , 2018)
10	<i>Cyt b</i>	<b>Primer forward</b> = 5'- TATCCCTTATATCGGAACAGACCTC - 3'; <b>primer reverse</b> = 5'- GCAGGAATAGGAGATGTACGG - 3'; <b>Probe</b> = 5' Cy3 - ROX-CCTGCCATTCAATTACCGCCC-TAO-IOWA BLACK RQ	0.003 ng	(Hossain <i>et al.</i> , 2017)

DNA mitokondria (mtDNA) merupakan genom yang berasal dari sel mitokondria (Ferreira & Rodriguez, 2024). mtDNA dikenal berbentuk sirkular yang terbagi menjadi *heavy strand* dan *Light Strand* (Basu *et al.*, 2020; Ferreira & Rodriguez, 2024). mtDNA mengkode 28 dari 37 gen yang terdiri atas 2 *rRNA* (*12S rRNA* dan *16S rRNA*), 14 *tRNA*, dan 12 polipeptida (Ferreira & Rodriguez, 2024). mtDNA diketahui memiliki kemampuan pewarisan matrilinear

serta tidak mengalami rekombinasi yang menjadikan variasi pada nukleotida ditingkat takson yang rendah (Filonzi *et al.*, 2023). Selain itu, jumlah salinan mtDNA yang tinggi dapat mendukung analisis deteksi DNA. Sementara itu, bentuknya yang sirkular menjadikan mtDNA stabil terhadap suhu tinggi dan berpeluang kecil untuk terdegradasi (Filonzi *et al.*, 2023). Di sisi lain, mtDNA dikenal sulit untuk membedakan spesies yang berkerabat dekat (Filonzi *et al.*, 2023).

Berdasarkan 10 artikel identifikasi babi dengan metode Multipleks *Real Time* PCR, diketahui 1 artikel pada target gen mitokondria (universal), 3 artikel pada gen *Cytochrome b* (*Cyt b*), 2 artikel pada gen *ND5*, 1 artikel pada gen *12S rRNA*, 1 artikel pada gen *Cytochrome Oxidase subunit I (CO I)*, dan 1 artikel pada target gen *D-Loop*. Berdasarkan hasil uji spesifisitas pada jenis DNA yang sama, tidak ditemukan adanya *cross reactivity* atau reaksi silang antar target dan primer target. Sementara itu, berdasarkan uji sensitivitas, gen *Cyt b* mampu mengidentifikasi pada kadar terkecil 0.005 ng. Disisi lain, untuk gen *ND5* mampu mengidentifikasi pada kadar 0.0001 ng, gen mitokondria pada kadar 0.01 ng, pada *12S rRNA* pada kadar 0.0005 ng, pada gen *tRNA ATPB* pada kadar 0.01 ng, pada gen *D-Loop* pada kadar 0.0001 ng, dan pada gen *CO I* pada kadar 0.001 ng. Pada parameter spesifisitas, didapati seluruh pengujian spesifik pada DNA target.

### Identifikasi DNA Babi Pada DNA Nukleus

Tabel 7. Hasil analisis *scoping review* berdasarkan target DNA nukleus

No.	Target DNA babi	Sekuen primer Babi dan probe	LOD	Author
1	<i>PNRP</i>	<p><b>Primer forward =</b> 5'- GCAAGGCCAGGGATCGA -3';</p> <p><b>primer reverse =</b> 5'- AGCAGAAACCAGCCATGGATT - 3';</p> <p><b>Probe =</b> 5' FAM-CCGCGTCCTCATGG-BHQ1</p>	0.027 ng	(Chang <i>et al.</i> , 2025)
2	<i>MICAL I</i>	<p><b>Primer forward =</b> 5'- CCCCCAAATCCCTCAACCA-3';</p> <p><b>primer reverse =</b> 5'- TTCCAATTCCCATCACAAAACCTACC - 3';</p> <p><b>Probe =</b> 5' HEX-CTGACTTGCCACCGCTCACAGCCGAG-BHQ1</p>	0.01 ng	(Nesvadbova <i>et al.</i> , 2022)

Berbeda dengan mtDNA, DNA nukleus (nDNA) dapat ditemukan di dalam inti sel (nukleus) yang terdiri atas dua rantai polinukleotida (Alberts *et al.*, 2020). DNA nukleus diketahui mengkode lebih dari 1200 gen (Smeitink *et al.*, 2001). Menilik dari pola pewarisan, nDNA diturunkan oleh kedua orang tua (*biparental inheritate*) (Figura *et al.*, 2024). Kondisi tersebut menjadikan penggunaan nDNA sering digunakan dalam identifikasi individu.

Berdasarkan 2 artikel yang melakukan analisis dengan nDNA, dilakukan analisis pada target gen *PNRP* dan *MICAL I*. Analisis yang dilakukan pada kedua gen tersebut tidak menunjukkan adanya reaktivitas silang antar individu dengan gen yang lain. Selain itu, pada gen *PNRP* mampu mendeteksi DNA babi pada kadar 0.027 ng. Disisi lain, gen *MICAL I* mampu mendeteksi DNA babi hingga kadar 0.01 ng. Sementara itu, pada parameter spesifisitas, diketahui seluruh pengujian spesifik pada DNA target.

Keberhasilan metode dalam mengidentifikasi target tidak hanya ditentukan oleh metode yang digunakan namun, oleh beberapa faktor lain, salah satunya jenis target yang dianalisis. Pada identifikasi berbasis molekuler, seringkali digunakan DNA mitokondria yang bersifat stabil ataupun DNA nukleus yang diturunkan secara patrilinear (Basu *et al.*, 2020; Figura *et al.*, 2024; Filonzi *et al.*, 2023). Selain itu, salah satu pertimbangan dalam memilih

target dalam analisis molekular adalah variasi antar spesiesnya. Sebagai contoh, gen *12S rRNA* dan *16S rRNA* dikenal memiliki variasi antar spesies yang rendah dibandingkan dengan gen *Cytochrome b* dan gen *D-Loop* yang memiliki variasi antar spesies yang tinggi (Figura *et al.*, 2024; Iqbal *et al.*, 2020; Lalitha & Chandavar, 2018).

Kemampuan identifikasi pada target dapat dilihat melalui primer yang digunakan. Hal ini dikarenakan, pemilihan primer pada target gen yang diidentifikasi dapat berpengaruh pada proses analisis. Setiap jenis hewan tentunya memiliki sekuen DNA yang berbeda secara spesifik. Kondisi tersebut menjadikan pentingnya desain primer yang tepat dan spesifik pada jenis hewan yang dibutuhkan dalam analisis. Pada proses perancangannya, primer diawali dengan proses perancangan secara *in silico* yang kemudian diujikan langsung pada DNA hewan yang ingin diidentifikasi.

Setiap metode analisis perlu melalui proses validasi guna memastikan hasil yang diperoleh memiliki kualitas dan akurasi yang tinggi. Pada uji identifikasi berupa uji kualitatif, parameter yang harus dipenuhi meliputi spesifisitas dan sensitivitas sebagai parameter lainnya. Kemampuan metode dalam mendeteksi analit pada konsentrasi terendah secara spesifik terhadap target yang diinginkan menjadi indikator penting keberhasilan suatu metode. Validasi parameter ini memastikan bahwa metode tersebut dapat diterapkan secara baik oleh masyarakat dan mampu memberikan hasil yang berkualitas serta tervalidasi.

## KESIMPULAN

Metode *multiplex Real Time PCR* memungkinkan untuk dilakukannya analisis identifikasi berbagai spesies dalam satu reaksi. Analisis dengan instrumen *Real Time PCR* terbagi menjadi 2 klasifikasi yaitu analisis berbasis *dye* dan berbasis *probe* yang dapat digunakan sesuai dengan tujuan analisis. Efisiensi analisis dengan metode perbanyakan DNA dipengaruhi dengan suhu *annealing* (penempelan primer) dan jumlah siklus. Selain itu, target DNA yang digunakan juga dipilih sesuai dengan tujuan uji yang dilakukan. Oleh karena itu, perlu adanya validasi metode untuk mendapatkan metode *multiplex Real Time PCR* yang handal, efisien, dan tervalidasi. Dengan demikian, kajian ini diharapkan dapat memberikan masukan kepada pelaku usaha dalam memberikan jaminan halal menggunakan metode *multiplex Real Time PCR*. Namun demikian, berkaitan dengan validitas metode, perlu dilakukan penelitian dan validasi lebih lanjut terhadap metode tersebut, utamanya pada produk-produk turunan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terlaksananya penelitian ini dengan baik berkat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, peneliti mengucapkan terimakasih banyak kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah memberikan dukungan melalui pendanaan hibah penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alary, R., Serin, A., Maury, D., Jouira, H. Ben, Sirven, J.-P., Soise Gautier, M.-F. & Joudrier, P. (2002). Comparison of simplex and duplex real-time PCR for the quantification of GMO in maize and soybean. *Food Contro*, 13, 235–244. [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)
- Alberts, B., Heald, R., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2020). *Molecular Biology of The Cell* (7 th). W.W. Norton & Co.

- Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E. & Antonjaya, U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, *13*, 1–21. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4002347>
- Azam, M. S. E. & Abdullah, M. A. (2021). Halal Standards Globally: A Comparative Study of Unities and Diversities Among the Most Popular Halal Standards Globally. *Halalpsphere*, *1*(1), 11–31. <https://doi.org/10.31436/hs.v1i1.20>
- Badan Standardisasi Nasional. (2024). RSNI3 : Metode deteksi DNA spesifik babi pada produk pangan mengandung gelatin-Metode kualitatif real-time PCR menggunakan hydrolysis probe. *Badan Standardisasi Nasional*.
- Basu, U., Bostwick, A. M., Das, K., Dittenhafer-Reed, K. E. & Patel, S. S. (2020). Structure, Mechanism, and Regulation of Mitochondrial DNA Transcription Initiation. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(52), 18406–18425. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011202>
- Bustin, S. A. & Nolan, T. (2004). *Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*.
- Chang, L., Fu, C., Huang, P., Li, Y., Liu, Y. & Lu, F. (2025). Reliable multiplex real-time PCR method for detecting adulteration in processed beef products. *Journal of Food Composition and Analysis*, *143*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.107595>
- Denyinghot, 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>
- Dunbar, S. & Das, S. (2019). Amplification chemistries in clinical virology. In *Journal of Clinical Virology* (Vol. 115, pp. 18–31). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.03.015>
- FDA. (2023). *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis of Food, Feed, Cosmetics and Veterinary Products* (Version 1.2). Food and Drug Administration. [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
- Ferreira, T. & Rodriguez, S. (2024). Mitochondrial DNA: Inherent Complexities Relevant to Genetic Analyses. *Genes*, *15*(5). <https://doi.org/10.3390/genes15050617>
- Figura, A., Gryzinska, M. & Jakubczak, A. (2024). Comparison of Universal mtDNA Primers in Species Identification of Animals in a Sample with Severely Degraded DNA. *Animals*, *14*(22). <https://doi.org/10.3390/ani14223256>
- Filonzi, L., Ardenghi, A., Rontani, P. M., Voccia, A., Ferrari, C., Papa, R., Bellin, N. & Nonnis Marzano, F. (2023). Molecular Barcoding: A Tool to Guarantee Correct Seafood Labelling and Quality and Preserve the Conservation of Endangered Species. In *Foods* (Vol. 12, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods12122420>
- Grohmann, Lutz., Barbante, Alessandra., Eriksson, Ronnie., Gatto, Francesco., Georgieva, Tzveta., Huber, Ingrid., Hulin, Julie., Köppel, Rene., Marchesi, Ugo., Marmin, Lucas., Mazzara, Marco., Narendja, Frank., Owen, Heather., Perri, Elena., Scholtens, Ingrid., Sovová, Tereza., Sowa, Sławomir., Weidner, Christopher. & Zdeňková, Kamila. (2021).

- Guidance document on multiplex real-time PCR methods*. Publications Office of the European Union.
- Guo, L., Hai, X., Liu, G. Q., Luo, J. X. & Guo, Y. S. (2022). Enhancing the Authentication Capability of Triplex Real-Time PCR by Increasing the Primer Specificity. *Food Analytical Methods*, 15(10), 2642–2651. <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02321-3>
- Hanifehpour, H., Ashrafi, F., Siasi, E. & Fallahi, S. (2024). Evaluation and comparison of one-step real-time PCR and one-step RT-LAMP methods for detection of SARS-CoV-2. *BMC Infectious Diseases*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09574-9>
- Hilscher, C., Vahrson, W. & Dittmer, D. P. (2005). Faster quantitative real-time PCR protocols may lose sensitivity and show increased variability. *Nucleic Acids Research*, 33(21). <https://doi.org/10.1093/nar/gni181>
- Hossain, M. A. M., Ali, M. E., Sultana, S., Asing, Bonny, S. Q., Kader, M. A. & Rahman, M. A. (2017). Quantitative Tetraplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay with TaqMan Probes Discriminates Cattle, Buffalo, and Porcine Materials in Food Chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(19), 3975–3985. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00730>
- ICH. (2022). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R2)*. International Council For harmonisation. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- Indriati, M., Yuniarsih, E., Raya, J., Km, L., Saketi, C. & Pandeglang Banten, K. (2019). Multiplex PCR Method of Detecting Pork to Guarantee Halal Status in Meat Processed Products. *Oktober*, 07(3), 96–101. <https://doi.org/10.29244/jipthp.7.2.96-101>
- Iqbal, M., Saleem, M. S., Imran, M., Khan, W. A., Ashraf, K., Yasir Zahoor, M., Rashid, I., Rehman, H. U., Nadeem, A., Ali, S., Naz, S. & Shehzad, W. (2020). Single tube multiplex PCR assay for the identification of banned meat species. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 284–291. <https://doi.org/10.1080/19393210.2020.1778098>
- Ishida, N., Sakurada, M., Kusunoki, H. & Ueno, Y. (2018). Development of a simultaneous identification method for 13 animal species using two multiplex real-time PCR assays and melting curve analysis. *Legal Medicine*, 30, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2017.11.007>
- Kim, M. J. & Kim, H. Y. (2019). A fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of pork, chicken, and beef in commercial processed meat products. *LWT*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108390>
- Lalitha, R. & Chandavar, V. R. (2018). Intraspecific variations in Cyt b and D-loop sequences of Testudine species, *Lissemys punctata* from south Karnataka. *Journal of Advanced Research*, 9, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.007>
- Li, J., Li, J., Liu, R., Wei, Y. & Wang, S. (2021). Identification of eleven meat species in foodstuff by a hexaplex real-time PCR with melting curve analysis. *Food Control*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107599>
- Lubis, H., Salihah, N. T., Norizan, N. A., Hossain, M. M. & Ahmed, M. U. (2018). Fast and sensitive real-time PCR-based detection of porcine DNA in food samples by using EvaGreen Dye. *Food Science and Technology Research*, 24(5), 803–810. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.803>

- Mas-Carrió, E., Schneider, J., Othenin-Girard, V., Pigeault, R., Taberlet, P., Christe, P., Glazot, O. & Fumagalli, L. (2025). Multiplex vs. singleplex assay for the simultaneous identification of the three components of avian malaria vector-borne disease by DNA metabarcoding. *PeerJ*, 13(3). <https://doi.org/10.7717/peerj.19107>
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J. & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 439, pp. 231–250). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- Nesvadbova, M., Kralik, P., Dziedzinska, R., Dufkova, M. & Borilova, G. (2022). An integrated system of four multiplex qPCR assays for the precise and sensitive identification of animal species in food and feed. *Food Control*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108781>
- Osadare, I. E., Abdilahi, A., Reinicke, M., Diezel, C., Collatz, M., Reissig, A., Monecke, S. & Ehricht, R. (2025). Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction and Recombinase Polymerase Amplification: Methods for Quick and Cost-Effective Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Antibiotics*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics14030295>
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 42 Tahun 2024 Tentang Penyelenggaraan Bidang Produk Halal, (2024).
- Siew, R. (2023). *Optical engineering perspective on normalizing Ct values across real-time PCR instruments and platforms: a response to 'Monkeypox: another test for PCR'*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12788.22402>
- Smeitink, J., Heuvel, L. Van Den & DiMauro, S. (2001). The Genetics Pathology Of Oxidative Phosphorylation. *Nature Reviews Genetics*, 2, 342–352. [www.nature.com/reviews/genetics](http://www.nature.com/reviews/genetics)
- Sultana, S., Hossain, M. A. M., Azlan, A., Johan, M. R., Chowdhury, Z. Z. & Ali, M. E. (2020). TaqMan probe based multiplex quantitative PCR assay for determination of bovine, porcine and fish DNA in gelatin admixture, food products and dietary supplements. *Food Chemistry*, 325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126756>
- Thanakiatkrai, P. & Kitpipit, T. (2017). Meat species identification by two direct-triplex real-time PCR assays using low resolution melting. *Food Chemistry*, 233, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.090>
- Tombuloglu, H., Sabit, H., Al-Khallaf, H., Kabanja, J. H., Alsaeed, M., Al-Saleh, N. & Al-Suhaimi, E. (2022). Multiplex real-time RT-PCR method for the diagnosis of SARS-CoV-2 by targeting viral N, RdRP and human RP genes. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06977-z>
- Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 33 Tahun 2014 Tentang Jaminan Produk Halal, (2014).
- Wolff, N., Geiss, A. F. & Barišić, I. (2020). Crosslinking of PCR primers reduces unspecific amplification products in multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 178. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106051>

- Wong, W., Farr, R., Joglekar, M., Januszewski, A. & Hardikar, A. (2015). Probe-based real-time PCR approaches for quantitative measurement of microRNAs. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(98). <https://doi.org/10.3791/52586>
- Xu, R., Wei, S., Zhou, G., Ren, J., Liu, Z., Tang, S., Cheung, P. C. K. & Wu, X. (2018). Multiplex TaqMan locked nucleic acid real-time PCR for the differential identification of various meat and meat products. *Meat Science*, 137, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.003>
- Yadav, S. S., Tariq, R., Padhy, P. K., Saxena, A., Rai, P., Srivastava, V., Kumar, N., Sharma, S. K. & Priya, S. (2024). A multiplex DNA probe-based method for simultaneous identification of adulteration in meat samples. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2024.100200>