

Sensitivitas *Multiplex-Polymerase Chain Reaction* Gen 12S rRNA dalam Mendeteksi Pemalsuan Daging Sapi dengan Daging Babi, Anjing dan Tikus

(SENSITIVITY OF MULTIPLEX- POLYMERASE CHAIN REACTION TARGETING 12S
rRNA GENE IN DETECTING BEEF ADULTERATION WITH PORK, DOG AND RAT)

Irma Khikmawati¹, Slamet Diah Volkandari²,
Zakaria Husein Abdurrahman³, Ahmad Pramono¹,
Muhammad Cahyadi^{1,4*}

¹Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret,
Jl. Ir Sutami 36A Ketingan, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia 57126

²Pusat Riset Bioteknologi, Organisasi Riset Ilmu Pengetahuan Hayati,
Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)

Jl. Raya Bogor KM 46, Cibinong, Bogor, Jawa Barat Indonesia 16911,

³Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Boyolali,

Jl. Pandanaran No.405, Dusun 1, Winong, Boyolali, Jawa Tengah, Indonesia 57315,

⁴Halal Research Center and Services, Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat,
Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir Sutami 36A Ketingan,
Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia 57126,

*Email: mcahyadi@staff.uns.ac.id

ABSTRACT

Beef and its processed products are subject to be adulterated. Changes in halal meat status can be caused by mixing with other species. Besides, these conditions can be a serious cause of health risks, such as food poisoning, sources of disease, or allergies. Effective control is needed to ensure the authenticity and safety of meat. Molecular detection using multiplex-PCR is commonly used because of its efficiency and sensitivity. The aim of this study was to evaluate multiplex-PCR sensitivity targeting mt-DNA 12S rRNA gene in detecting cattle, dog, porcine, and rat. Each DNA template was made for six concentrations, namely 25; 10; 1; 0.1; 0.01; 0.001 ng/μL for simplex- and multiplex-PCR. The result of sensitivity for simplex-PCR showed that the pair of primer 12S rRNA gene could amplify target species of cattle, dog, porcine, and rat accurately to a concentration of 0.001 ng/μL. The multiplex-PCR sensitivity test for the 12S rRNA gene could amplify the target species of cattle, dog, porcine up to 0.001 ng/μL and in rat up to 1 ng/μL. Thus, this methods can be used as an alternative solution for halal studies and food label verification.

Keywords: 12S rRNA gene; halal meat; multiplex-PCR; detection sensitivity

ABSTRAK

Daging sapi dan olahannya merupakan sasaran pemalsuan. Pelaku pemalsuan daging sapi mencampur daging sapi dengan daging spesies hewan lain, sehingga berakibat pada berubahnya status kehalalan daging. Selain itu, kondisi tersebut dapat menjadi penyebab serius pada risiko kesehatan, seperti potensi keracunan, sumber penyakit maupun alergi. Pengawasan yang efektif diperlukan guna menjamin keaslian dan keamanan daging. Metode deteksi secara molekuler yang umum digunakan adalah *multiplex*-PCR karena efisien dan sensitif. Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi sensitivitas *multiplex*-PCR primer gen 12S rRNA yang spesifik untuk spesies sapi, anjing, babi, dan tikus. *Template* DNA dibuat masing-masing enam konsentrasi, yaitu 25; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 ng/μL untuk proses *simplex* dan *multiplex*-PCR. Hasil uji sensitivitas menggunakan metode *simplex*-PCR menunjukkan bahwa primer gen 12S rRNA dapat mengamplifikasi spesies sapi, anjing, babi, dan tikus dengan akurat hingga konsentrasi 0,001 ng/μL. Pengujian sensitivitas *multiplex*-PCR gen 12S rRNA dapat mengamplifikasi spesies sapi, anjing, babi hingga konsentrasi 0,001 ng/μL dan pada spesies tikus hingga konsentrasi 1 ng/μL. Metode PCR ini dapat digunakan sebagai solusi alternatif dalam studi halal dan verifikasi label pangan.

Kata-kata kunci: gen 12S rRNA; daging halal; *multiplex*-PCR; sensitivitas deteksi

PENDAHULUAN

Daging sapi dan olahannya merupakan salah satu sasaran pemalsuan oleh oknum produsen. Kasus pemalsuan daging umumnya dilatarbelakangi oleh faktor ekonomi (Nida *et al.*, 2020) dan oleh kontaminasi secara tidak sengaja saat proses pengolahan meskipun dalam jumlah sedikit (Naaum *et al.*, 2018). Status halal pada daging sapi dapat berubah apabila tercampur dengan spesies daging yang terlarang dalam Islam (haram) berupa daging anjing, daging tikus maupun daging babi. Harga daging sapi lebih mahal apabila dibandingkan dengan harga daging lain. Menurut Kumparan Bisnis (2018) bahwa harga daging anjing di pasaran mencapai Rp 20.000/kg serta dilaporkan oleh Tribun Manado (2020) harga daging babi paling tinggi adalah Rp 50.000/kg. Harga tersebut lebih rendah daripada daging sapi yaitu Rp 115.200/kg (PIHPS Nasional, 2021).

Pemalsuan pangan telah menjadi permasalahan pada skala global sehingga konsumen perlu lebih waspada. Pengaruh pada pemalsuan daging tidak hanya pada risiko kesehatan, seperti potensi keracunan, sumber penyakit maupun alergi (Spink dan Moyer, 2011), namun lebih lanjut dapat berimbas pada hak konsumen dari sisi ekonomi, kepercayaan, hingga agama. Meningkatnya permintaan dalam standarisasi kualitas pangan serta kepedulian pada konsumen maka dilakukan deteksi untuk komposisi bahan pangan (El Sheikha, 2017). Metode deteksi yang spesifik dan sensitif diperlukan guna mengetahui komposisi spesies daging pada produk pangan.

Deteksi pemalsuan daging dapat dilakukan melalui teknik molekuler berbasis DNA, salah satunya dengan *multiplex-PCR* (*multiplex polymerase chain reaction*) yang umum digunakan, karena alasan hemat waktu, sensitif, dan mampu melakukan reaksi untuk beberapa sampel spesies dalam satu tabung. Senyawa DNA terbukti cukup stabil terhadap perlakuan suhu tinggi, tekanan serta perlakuan kimia. Aplikasi *multiplex-PCR* seringkali menargetkan DNA mitokondria karena tingginya hasil salinan DNA per sel serta stabil (Kumar *et al.*, 2015). Sekuen DNA mitokondria, seperti fragmen gen 12S rRNA telah digunakan untuk deteksi spesies pada daging oleh Cahyadi *et al.* (2018), Cahyadi *et al.* (2019) dan Cahyadi *et al.* (2020). Fragmen gen mitokondria 12S rRNA diketahui mampu mendeteksi hingga konsentrasi 0,0125 ng (Dalmasso *et al.*, 2004).

Primer dari gen 12S rRNA memiliki variasi rendah dalam satu spesies dan memiliki variasi besar antar spesies. Meskipun metode *multiplex-PCR* gen 12S rRNA telah banyak digunakan untuk deteksi berbagai spesies (Li *et al.*, 2019), namun belum ditemukan pengujian sensitivitas pada spesies sapi, anjing, babi dan tikus dalam satu kali reaksi. Tujuan penelitian ini adalah mencoba menerapkan *multiplex-PCR* primer gen 12S rRNA sebagai gen penanda dalam uji sensitivitas terhadap berbagai konsentrasi DNA spesies sapi, anjing, babi dan tikus got, sehingga ditemukan konsentrasi minimum yang terdeteksi.

METODE PENELITIAN

Koleksi dan Preparasi Sampel Daging

Daging sapi (*Bos taurus*), daging babi (*Sus scrofa*) dan daging anjing (*Canis lupus familiaris*) dikoleksi dari pasar tradisional di Kota Surakarta. Daging tikus got (*Rattus norvegicus*) didapatkan dengan mencari tikus got di Kota Surakarta. Tikus got kemudian dikorbankan nyawanya/dimatikan dengan cara meletakkan tikus-tikus tersebut di dalam wadah tertutup dan diberi *chloroform*. Pembedahan dilakukan setelah tikus benar-benar mati. Sampel diletakkan pada plastik *ziplock* dalam kondisi *double* dan disimpan pada *freezer* dengan suhu -20°C.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode *Salt* oleh Cawthorn *et al.* (2011). Sampel daging (50 mg) dilarutkan pada 400 µL lisis buffer terdiri atas 0,4 M NaCl, 2 M ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) dengan pH 8,0; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 20% sodium dodesil sulfat (SDS) sebanyak 40 µL dan proteinase-K 20 mg/ mL sebanyak 20 µL lalu *divortex*. Sampel diinkubasi (65°C, 1 jam) kemudian ditambahkan NaCl 6 M sebanyak 300 µL dan *divortex* selama 30 detik. Sampel disentrifugasi (10.000 rpm, 30 menit). Cairan bening diambil, kemudian dipindah pada *tube* baru. Isopropanol ditambahkan 1:1 dan *divortex*. Sampel diinkubasi (-20°C, 1 jam), kemudian disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 20 menit. Cairan supernatan dibuang dan ditambahkan 1 mL etanol 70%. Sampel disentrifugasi (10.000 rpm, 5 menit) lalu cairan supernatan dibuang. Sampel dikering-kan, kemudian ditambahkan Tris-EDTA (TE) buffer 100 µL menggunakan *tube* baru.

Kuantifikasi dan Pengenceran DNA

Kuantifikasi DNA dilakukan menurut panduan NanoPhotometer (P-Class®, Implen, Munchen, Jerman) . Pengecekan menggunakan sampel sebanyak 3 µL, kemudian pada perangkat lunak/software dimasukkan nilai panjang gelombang A260/A280. Hasil ekstraksi DNA masing-masing spesies diencerkan dengan aquabidest (ddH₂O) hingga diperoleh konsentrasi 25 ng/µL. Sampel diencerkan kembali hingga diperoleh konsentrasi 10; 1; 0,1; 0,01; dan 0,001 ng/µL untuk masing-masing spesies. Pengenceran sampel dilakukan berdasarkan Demeo (1996) yaitu konsentrasi awal dikalikan dengan volume awal akan memiliki hasil yang sama dengan konsentrasi akhir dikalikan dengan volume akhir atau $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$

Simplex- dan Multiplex-PCR

Proses *simplex*-PCR dan *multiplex*-PCR dilakukan pada mesin PCR (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Singapura). Reaksi menggunakan primer gen 12S rRNA (Cahyadi *et al.*, 2018; Cahyadi *et al.*, 2019) disajikan pada Tabel 1 dengan total volume reaksi 25 µL, terdiri atas Master Mix 12,5 µL bioline (MyTaq™ HS Red Mix, London, Inggris), 10 µM primer untuk masing-masing spesies, 25; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 ng/µL *template* DNA, serta penambahan *aquabidest* menyesuaikan hingga volume total menjadi 25 µL. Reaksi diawali tahap inisiasi denaturasi pada 95°C selama 3 menit, dilanjutkan 35 siklus denaturasi (95°C, 15 detik), kemudian proses *annealing* (58°C, 30 detik), *extention* (72°C, 30 detik), serta *final extention* (72°C, 10 menit). Produk PCR dielektroforesis menggunakan agarose gel 2% dan divisualisasi dengan *gel document* (Glite UV

Gel Doc System®, Pacific Image Electronic Co., Ltd., New Taipei City, Taiwan).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Simplex-PCR

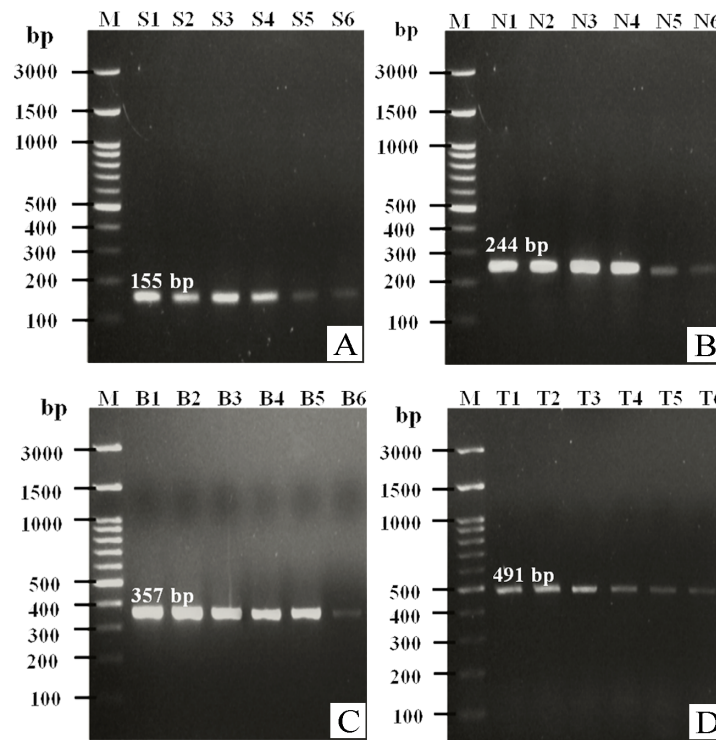
Gen 12S rRNA berhasil mengamplifikasi target spesies pada masing-masing spesies sapi 155 bp, spesies anjing 244 bp, spesies babi 357 bp dan spesies tikus 491 bp menggunakan *simplex*-PCR. Sensitivitas yang mampu terdeteksi hingga konsentrasi 0,001 ng/µL (Gambar 1). Hasil visualisasi *simplex*-PCR pada *template* DNA spesies sapi (Gambar 1 (A), kolom S1-S6), spesies anjing (Gambar 1 (B), kolom N1-N6), spesies babi (Gambar 1 (C), kolom B1-B6) dan spesies tikus (Gambar 1 (D), kolom T1-T6) dengan berbagai konsentrasi menunjukkan adanya variasi berupa terang ke redup. Visualisasi DNA pada spesies sapi dan anjing dengan konsentrasi 25; 10; 1; dan 0,1 ng/µL menghasilkan pita yang jelas serta terang dan pada konsentrasi 0,01 dan 0,001 ng/µL tampak redup. Visualisasi *template* DNA spesies babi pada konsentrasi 25; 10; 1; 0,1; dan 0,01 menghasilkan pita DNA yang terang serta jelas dan pada konsentrasi 0,001 ng/µL tampak redup. Konsentrasi *template* DNA spesies tikus pada 25; 10; 1,0 ng/µL menghasilkan pita yang terang, pada konsentrasi 0,1 ng/µL menghasilkan pita yang agak redup, serta pada 0,01 dan 0,001 ng/µL pita DNA tampak redup. Uji sensitivitas *simplex*-PCR primer gen 12S rRNA pada spesies sapi, anjing, babi, dan tikus dapat mengamplifikasi dan sensitif hingga konsentrasi 0,001 ng/µL.

Penggunaan berbagai primer dalam uji

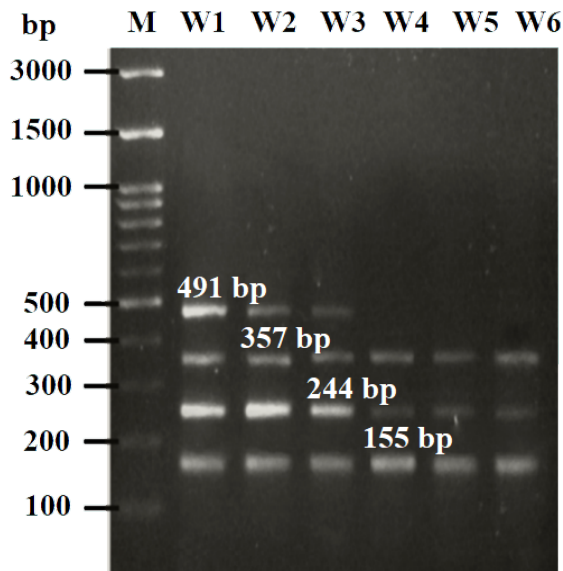
Tabel 1. Pasangan primer fragmen DNA mitokondria gen 12S rRNA

Spesies		Primer (5' – 3')	Panjang (bp)
Sapi	UF	ACCGCGGTCATACGATTAAC	155
	R	AGTGCCTCGGCTATTGTAGG	
Anjing	UF	ACCGCGGTCATACGATTAAC	244
	R	TCCTCTGGCGAATTATTTTGTG	
Babi	UF	ACCGCGGTCATACGATTAAC	357
	R	CGGTATGTACGTGCCTCAGA	
Tikus	UF	ACCGCGGTCATACGATTAAC	491
	R	TCTGGGAAAAGAAAATGTAGCC	

Keterangan: UF = Primer *universal forward*; R = Primer *reverse*



Gambar 1. Visualisasi pengujian sensitivitas *simplex*-PCR. Marker (M), kolom S1-S6: DNA spesies sapi 25; 10; 1; 0,1; 0,01; dan 0,001 ng/μL (A), kolom N1-N6: DNA spesies anjing 25; 10; 1; 0,1; 0,01; dan 0,001 ng/μL (B), kolom B1-B6: DNA spesies babi 25; 10; 1; 0,1; 0,01; dan 0,001 ng/μL (C), kolom T1-T6: DNA spesies tikus 25; 10; 1; 0,1; 0,01; dan 0,001 ng/μL (D).



Gambar 2. Visualisasi pengujian sensitivitas *multiplex*-PCR empat spesies hewan. Marker (M), kolom W1-W6: *template* DNA dengan konsentrasi 25; 10; 1; 0,1; 0,01; dan 0,001 ng/μL.

sensitivitas terhadap *template* DNA spesies sapi, anjing, babi, dan tikus telah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Sensitivitas primer gen 12S rRNA pada spesies sapi memiliki limit deteksi 0,5 ng (Yin *et al.*, 2009). Pengujian sensitivitas pada spesies babi menggunakan primer gen *Cytochrome Oxidase Subunit 1* (COI) mampu mendeteksi hingga 0,001 ng (Wang *et al.*, 2019) dan primer gen *cyt b* dengan metode Eva Green real-time PCR hingga 0,00001 ng/μL (Lubis *et al.*, 2018). Pengujian sensitivitas oleh Matsunaga *et al.* (1999) menggunakan primer gen *cyt b* pada spesies sapi dan babi dinyatakan sensitif hingga konsentrasi 0,25 ng. Uji lain pada spesies sapi dan babi menggunakan primer gen 12S-, 16S- rRNA, dan tRNA-Val memiliki batas deteksi antara 0,0025-0,025 ng (Dalmasso *et al.*, 2004), primer gen ND5 spesies sapi dan *cyt b* spesies babi (Hossain *et al.*, 2017) serta primer gen cyclic-GMP-phosphodiesterase pada spesies sapi dan beta-actin pada spesies babi dengan limit deteksi 0,003 ng (Iwobi *et al.*, 2017). Pengujian sensitivitas untuk spesies anjing dan babi telah dilakukan oleh Liu *et al.* (2019) menggunakan primer gen ATPase 6 untuk

Tabel 2. Sensitivitas *simplex* dan *multiplex*-PCR dengan variasi konsentrasi DNA

Spesies	<i>Simplex</i> -PCR		<i>Multiplex</i> -PCR	
	Sensitivitas (ng/ μ L)	Kode sampel	Sensitivitas (ng/ μ L)	Kode sampel
Sapi	0,001	S6	0,001	W6
Anjing	0,001	N6	0,001	W6
Babi	0,001	B6	0,001	W6
Tikus	0,001	T6	1	W6

spesies anjing dan *cyt b* untuk spesies babi memiliki limit deteksi 0.05 ng/ μ L. Penggunaan primer lain dalam pengujian sensitivitas pada gen 16S rRNA untuk spesies anjing dan COI untuk spesies babi memiliki sensitivitas hingga 0.002 ng (Li *et al.*, 2019), primer gen mitochondrial ATPase subunit 8 untuk spesies anjing dan babi dengan limit deteksi 0.03 ng (Prusakova *et al.*, 2018). Penelitian terhadap sensitivitas spesies anjing dan tikus menggunakan primer gen ATPase 6 serta ND5 untuk spesies babi memiliki sensitivitas 0.01 hingga 0.02 ng (Ali *et al.*, 2015). Sensitivitas pada spesies tikus diuji menggunakan metode *sandwich* ELISA imunogen dan antibodi dengan limit deteksi 0,01 μ g/L (Chen *et al.*, 2020).

Penggunaan primer gen 12S rRNA sebagai deteksi sensitivitas telah dilakukan pada spesies sapi dan babi, namun belum ditemukan deteksi sensitivitas untuk spesies anjing dan tikus. Penelitian ini apabila dibandingkan dengan penelitian terdahulu, primer gen 12S rRNA lebih sensitif (Matsunaga *et al.*, 1999; Dalmasso *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2015; Hossain *et al.*, 2017; Iwobi *et al.*, 2017; Prusakova *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019). Primer gen 12S rRNA untuk spesies babi sama sensitif dengan primer gen COI yaitu 0,001 ng (Wang *et al.*, 2019), kurang sensitif untuk spesies babi apabila dibandingkan dengan primer *cyt b* oleh Lubis *et al.* (2018), dan kurang sensitif untuk spesies tikus oleh Chen *et al.* (2020).

Amplifikasi *Multiplex*-PCR

Hasil visualisasi sensitivitas *multiplex*-PCR primer gen 12S rRNA tampak variasi tingkat terang (Gambar 2, kolom W1-W6). Visualisasi *template* DNA pada spesies sapi, anjing, babi dengan konsentrasi 25; 10; dan 1 ng/ μ L menghasilkan pita yang terang, serta pada konsentrasi 0,1; 0,01 hingga 0,001 ng/ μ L tampak redup namun dapat terdeteksi. Visualisasi pita DNA spesies tikus dengan konsentrasi 25; 10; dan

1 ng/ μ L tampak terang hingga redup serta pada 0,1 ng/ μ L sudah tidak tampak pita DNA. Uji sensitivitas *multiplex*-PCR primer gen 12S rRNA pada spesies sapi, anjing dan babi dinyatakan sensitif hingga konsentrasi 0,001 ng/ μ L sedangkan pada spesies tikus sensitif hingga konsentrasi 1 ng/ μ L.

Studi mengenai *multiplex*-PCR telah dikembangkan dan dibandingkan dengan penelitian terdahulu, metode *multiplex*-PCR primer gen 12S rRNA untuk spesies sapi, anjing dan babi pada 0,001 ng/ μ L dinyatakan lebih sensitif. Penggunaan *multiplex end-point* PCR primer gen *cyt b* sebagai deteksi sensitivitas yang diamplifikasi pada enam spesies hewan menggunakan *template* DNA ditemukan limit deteksi sebesar 0,25 ng (Matsunaga *et al.*, 1999), studi lain dilakukan oleh Dalmasso *et al.* (2004) dengan rancangan primer spesifik gen 12S- dan 16S rRNA serta tRNA-Val adalah 0,0125 ng. Studi lain dilakukan oleh Li *et al.* (2019) yang berhasil mengembangkan dua *tube multiplex*-PCR menggunakan primer gen 12S rRNA, 16S rRNA, ND2 dan COI pada 14 spesies hewan dengan limit deteksi 0,02 ng.

Perbedaan hasil amplifikasi pada uji sensitivitas *simplex*-PCR dan *multiplex*-PCR terdapat pada spesies tikus (Tabel 2). Keberhasilan *multiplex*-PCR dalam pengujian sensitivitas dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya adalah jumlah penggunaan primer, kompetisi antar primer, jumlah *template* DNA, jumlah nukleotida dan bahan lain sehingga reaksi pada *multiplex*-PCR semakin kompleks. Hambatan utama pada aplikasi dan standarisasi *multiplex*-PCR adalah sensitivitas yang relatif rendah serta efisiensi dan keseimbangan amplifikasi dari primer saat reaksi berlangsung (Ballin *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2003). Analisis oleh Walker *et al.* (2003) bahwa proses *multiplex*-PCR dan elektroforesis dapat mengakibatkan DNA terdegradasi sehingga efisiensi amplifikasi pada target spesies lebih rendah.

SIMPULAN

Deteksi pemalsuan daging dengan metode *simplex*-PCR menggunakan primer gen 12S rRNA dapat dilakukan dengan limit deteksi 0,001 ng/ μ L pada spesies sapi, anjing, dan babi. Metode *multiplex*-PCR menggunakan primer yang sama dapat mengamplifikasi daerah target pada spesies sapi, anjing, dan babi dengan limit deteksi 0,001 ng/ μ L, sedangkan limit deteksi untuk spesies tikus hanya 1 ng/ μ L. Adopsi metode sensitivitas *simplex*- dan *multiplex*-PCR dapat digunakan sebagai solusi alternatif untuk studi halal dalam skala laboratorium.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian serupa untuk spesies sapi, anjing, babi dan tikus menggunakan *simplex*-PCR maupun *multiplex*-PCR primer gen 12S rRNA dengan konsentrasi di bawah 0,001 ng/ μ L.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian didanai oleh Kementerian Ristek/BRIN dengan skim hibah Penelitian Dasar Kompetitif Nasional (PDKN) dengan nomor surat keputusan (SK): 208/SP2H/AMD/LT/DRPM/2020 dan nomor kontrak: 112/UN27.21/HK/2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali ME, Razzak MA, Hamid SB. 2015. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chem* 177: 214–224.
- Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. 2009. Species determination - can we detect and quantify meat adulteration. *Meat Sci* 83: 165-174.
- Cahyadi M, Taufik IM, Pramono A, Abdurrahman ZH. 2019. Development of mitochondrial 12S rRNA gene for identification of dog and rat in beef using *multiplex*-PCR. *J Indones Trop Anim Agric* 44(1): 10-18.
- Cahyadi M, Puruhita, Barido FH, Hertanto BS. 2018. Specific primer design of mitochondrial 12S rRNA for species identification in raw meats. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 102(1): 12-38.
- Cahyadi M, Wibowo T, Pramono A, Abdurrahman ZH. 2020. A novel multiplex-PCR assay to detect three non-halal meats contained in meatball using mitochondrial 12S rRNA gene. *Food Sci Anim Resour* 40(4): 628–635.
- Cawthorn DM, Steinman HA, Witthuhn RC. 2011. Comparative study of different methods for the extraction of DNA from fish species commercially available in South Africa. *Food Control* 22(2): 231–244.
- Chen X, Ran D, Zeng L, Xin M. 2020. Immunoassay of cooked wild rat meat by ELISA with a highly specific antibody targeting rat heat resistant proteins. *Food Agric Immunol* 31: 533–544.
- Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P, Civera T, Rosati S, Bottero MT. 2004. A *multiplex*-PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol Cell Probes* 18(2): 81–87.
- Demeo S. 1996. Mathematically modeling dilution. *Chem Educator* 1(1): 1–5.
- El Sheikha AF, Mokhtar NF, Amie C, Lamasudin DU, Isa NM, Mustafa S. 2017. Authentication technologies using DNA-based approaches for meats and halal meats determination. *Food Biotechnol* 31(4): 281-315.
- Hossain MAM, Ali ME, Sultana S, Asing, Bonny SQ, Kader MA, Rahman MA. 2017. Quantitative tetraplex real-time polymerase chain reaction assay with taqman probes discriminates cattle, buffalo, and porcine materials in food chain. *J Agric Food Chem* 65: 3975–3985.
- Iwobi A, Sebah D, Spielmann G, Maggipinto M, Schrempp M, Kraemer I, Gerdes L, Busch U, Huber I. 2017. A multiplex real-time PCR method for the quantitative determination of equine (horse) fractions in meat products. *Food Control* 74: 89–97.
- Kumar A, Kumar RR, Sharma BD, Gokulakrishnan P, Mendiratta SK, Sharma D. 2015. Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55(10): 1340–1351.

- Kumparan Bisnis. 2018. Bisnis daging anjing raup untung Rp 11,4 Miliar sebulan. <https://cutt.ly/6jDSoPS>. [Diakses 13 Januari 2021].
- Li J, Li J, Xu S, Xiong S, Yang J, Chen X, Wang S, Qiao X, Zhou T. 2019. A rapid and reliable multiplex PCR assay for simultaneous detection of fourteen animal species in two tubes. *Food Chem* 295: 395-402.
- Liu WW, Tao J, Xue M, Ji JG, Zhang YH, Zhang LJ, Sun WP. 2019. A multiplex PCR method mediated by universal primers for the identification of eight meat ingredients in food products. *Eur Food Res Technol* 245: 2385–2392.
- Lubis H, Salihah NT, Norizan NA, Hossain MM, Ahmed MU. 2018. Fast and sensitive real-time PCR-based detection of porcine DNA in food samples by using Evagreen dye. *Food Sci Technol Res* 24(5): 803-10.
- Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, Shinmura Y. 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci* 51: 143–148.
- Naaum AM, Shehata HR, Chen S, Li J, Tabujara N, Awmack D, Lutze-Wallace C, Hanner R. 2018. Complementary molecular methods detect undeclared species in sausage products at retail markets in Canada. *Food Control* 84: 339-344.
- Nida L, Pisestyani H, Basri C. 2002. Studi kasus: pemalsuan daging sapi dengan daging babi hutan di Kota Bogor. *J Kajian Veteriner* 8(2): 121-30.
- PIHPS Nasional. 2021. Laporan harian perkembangan harga pangan. <https://cutt.ly/GjDStba>. [Diakses 13 Januari 2021].
- Prusakova OV, Glukhova XA, Afanas'eva GV, Trizna YA, Nazarova L, Beletsky IP. 2018. A simple and sensitive two-tube multiplex PCR assay for simultaneous detection of ten meat species. *Meat Sci* 137: 34-40.
- Spink J, Moyer DC. 2011. Defining the public health threat of food fraud. *J Food Sci* 76: R157–R163.
- Tribun Manado. 2020. Harga daging babi tembus Rp 50 ribu per kg, 'kami sesuaikan dengan harga yang dijual peternak. <https://cutt.ly/NjDA3yC>. [13 Januari 2021].
- Walker JA, Hughes DA, Anders BA, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA. 2003. Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. *Anal Biochem* 316: 259-269.
- Wang LP, Hang XR, Geng RQ. 2019. Molecular detection of adulteration in commercial buffalo meat products by multiplex PCR assay. *Food Sci Technol* 39: 344–348.
- Yin RH, Bai WL, Wang JM, Wu CD, Dou QL, Yin RL, Luo GB. 2009. Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique. *Meat Sci* 83(1): 38–44.