

Application and Evaluation of The Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method to Detect Wild Boar in Meatball

Linda Wati^{1*} & Sony Suhandono²

¹Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Andalas, Kota Padang, Indonesia;

²Program Studi Bioteknologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Kota Bandung, Indonesia;

Article History

Received : December 05th, 2025

Revised : December 20th, 2025

Accepted : December 30th, 2025

*Corresponding Author: **Linda Wati**, Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Universitas Andalas, Kota Padang, Indonesia;
Email: lindawati@ae.unand.ac.id

Abstract: The content of meat used in processed meat products such as meatballs must be verified to ensure that the food is halal. Generally, meatballs are made from beef, chicken, and fish. However, some fraudulent practices often occur in the field, which is mixing meatballs with other meats such as wild boar. DNA-based methods can be used because they can sensitively identify the type of meat in meatballs, such as the Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method. The LAMP primers designed in this study was tested on DNA isolated from samples of meatballs containing wild boar, chicken, beef, lamb, and rat meat. Positive results were visualized using SYBR green dye, with positive results showing a color change from orange to green. The objective of this study was to design primers capable of detecting wild boar meat DNA in meatballs using simple equipment. The specific wild boar primers successfully detected wild boar meat DNA from meatballs, but the results often showed false positives. Thus, the primers designed in this study are not yet stable and applicable for use in wild boar DNA testing. The combination of the LAMP method with other methods is expected to reduce false positives from the LAMP method.

Keywords: Halal, LAMP, meatball, wild boar, *Sus scrofa*, *Sus barbatus*.

Pendahuluan

Industri pangan halal semakin meningkat seiring dengan kenaikan permintaan untuk produk halal. Indonesia menjadi salah satu negara dengan jumlah penduduk Muslim terbesar dan membutuhkan kepastian bahwa produk yang beredar dan dikonsumsi halal. Deklarasi halal diperlukan sebagai proses verifikasi untuk menentukan bahwa produk tertentu memenuhi persyaratan halal. Makanan halal harus bebas dari komponen apapun yang berasal dari manusia, hewan non halal, atau hewan yang disembelih tidak sesuai dengan cara Islam (Rohman & Fadzillah, 2018). Banyak produk olahan daging yang telah dikembangkan dan adanya tren peningkatan permintaan (Tao *et al.*, 2022). Penambahan spesies yang tidak terdaftar dalam makanan

berbasis daging merupakan praktik ilegal yang dapat menimbulkan konsekuensi komersial, etis, dan kesehatan konsumen (Cravero *et al.*, 2019).

Produk olahan daging yang populer di Indonesia diantaranya adalah bakso (Hersanty *et al.*, 2023). Bakso merupakan salah satu makanan yang terbuat dari daging yang telah dihaluskan kemudian dicampurkan dengan berbagai bumbu seperti bawang putih, tepung, lada, dan garam (Laksanawati *et al.*, 2024). Ketika daging dihaluskan, dicampurkan, kemudian dimasak, maka penampakan bentuk atau morfologi dari jenis daging yang digunakan sangat sulit untuk diidentifikasi secara langsung (Mualim *et al.*, 2024). Hal ini sering menjadi peluang dengan mencampurkan bahan atau daging jenis lain dengan pertimbangan harga yang lebih murah

dibandingkan dengan daging sapi ataupun daging ayam. Pencampuran atau penambahan jenis daging lain yang non halal, seperti daging celeng merupakan praktik curang yang dapat membahayakan dan merusak kepercayaan masyarakat. Jika dibandingkan dengan daging sapi, harga daging celeng jauh lebih murah dan mudah untuk didapatkan (Arini, 2018). Selain itu, tekstur dari daging celeng yang juga mirip dengan daging sapi menjadikan celeng lebih sering dicampurkan ke dalam makanan olahan daging.

Berbagai metode telah dikembangkan untuk mendeteksi jenis daging dalam makanan olahan daging seperti bakso. Salah satu metode yang banyak digunakan adalah berbasis molekuler dengan mendeteksi keberadaan DNA yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR adalah reaksi biokimia yang menggunakan pengaturan suhu panas dan dingin serta enzim DNA polimerase untuk memperbanyak untai DNA yang dijadikan sebagai untai cetakan menggunakan mesin *Thermal cycler* (Carter *et al.*, 2022). Metode PCR sudah banyak digunakan dalam mengidentifikasi jenis spesies dalam bahan pangan, seperti deteksi jenis udang (Kim & Kang, 2024), identifikasi spesies hiu dalam produk komersial (Hellberg *et al.*, 2019), substitusi spesies seafood (Hellberg, 2021), enam jenis daging merah yaitu sapi, kerbau, kambing, domba, unta, dan keledai (Galal-Khallaq *et al.*, 2021). Kelebihan dari metode PCR yakni cepat, sensitif, dan spesifik dalam memperbanyak sekuens asam nukleat secara *in vitro* (Coleman & Tsongalis, 2017). Meskipun demikian, salah satu keterbatasan dari metode PCR adalah membutuhkan alat *Thermal cycler* yang memiliki harga cukup mahal.

Selain metode molekuler, identifikasi jenis daging dalam makanan olahan juga bisa dilakukan dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yang dapat mendeteksi dan mengukur antibodi, antigen, peptida, protein, glikoprotein, dan hormon dalam sampel (Aydin *et al.*, 2025). ELISA sangat sensitif dan spesifik dalam membentuk reaksi imunologis dan sudah banyak digunakan secara luas dalam analisis makanan (Sengupta *et al.*, 2021). Metode ELISA telah diaplikasikan untuk mendeteksi daging curang dan produk olahan daging dan berhasil mendeteksi daging

babi dalam pangan (Meilinia *et al.*, 2021). Dalam penelitian (Cahyaningsari *et al.*, 2019) juga menggunakan metode ELISA untuk mendeteksi daging babi dan celeng dalam bakso, namun hingga batas konsentrasi 0,25% daging babi dan celeng. Salah satu kelemahan dari metode ELISA adalah cukup sulit mendeteksi sampel dalam jumlah kecil. Pada produk makanan olahan seperti bakso, protein sering mengalami denaturasi karena efek pemanasan sehingga menurunkan sensitivitas ELISA.

Perkembangan teknologi analisis mutakhir juga menghadirkan *Next Generation Sequencing* (NGS) sebagai metode identifikasi spesies dalam pangan dengan tingkat resolusi tinggi. NGS telah menjadi metode yang bernilai dalam identifikasi spesies dalam pangan. Meskipun demikian, masih terdapat tantangan pada metode ini yakni biaya sekuensing yang tinggi, kompleksitas interpretasi data, dan kebutuhan akan alur kerja yang terstandar (Tigrero-Vaca *et al.*, 2025). Berlandaskan pada kelebihan dan kekurangan dari metode-metode yang telah digunakan dalam identifikasi daging dalam makanan olahan daging, metode *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) menjadi alternatif yang cukup menjanjikan.

LAMP merupakan metode amplifikasi gen secara tunggal yang dapat dilakukan pada satu suhu yang konstan, sehingga dapat menggunakan peralatan sederhana seperti *waterbath*. Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Notomi pada tahun 2000 dan dapat mengamplifikasi gen kurang dari satu jam serta tidak membutuhkan instrumen yang mahal/rumit. Bila dibandingkan dengan metode PCR, metode LAMP membutuhkan enzim *BSt polymerase*, buffer, dan primer. Hanya saja, jika pada PCR biasa menggunakan 1 pasang primer, pada metode LAMP terdapat 2 hingga 3 pasang primer dalam satu kali reaksi (Shanker ., 2020). Metode LAMP telah banyak digunakan untuk mendeteksi keberadaan bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella*, *listeria monocytogenes*, dan *Clostridium perfringens* pada bahan pangan.

LAMP memiliki spesifisitas yang tinggi karena menggunakan 4 primer yang berbeda untuk mengidentifikasi enam daerah yang berbeda pada gen target (Wei *et al.*, 2019).

Dengan demikian, penelitian ini berfokus pada desain primer-primer spesifik yang dapat mendeteksi daging celang dalam makanan olahan seperti bakso menggunakan metode LAMP. Primer-primer yang didesain dengan menggunakan metode LAMP diharapkan dapat secara spesifik digunakan untuk mendeteksi cemaran daging celang dalam makanan olahan seperti bakso.

Bahan dan Metode

Langkah awal dari penelitian ini adalah pembuatan bakso 100% celeng sebagai kontrol positif, bakso daging ayam, daging sapi, domba, dan tikus. Pertama, masing-masing daging ditimbang sesuai dengan jumlah yang telah ditentukan, dihancurkan dengan menggunakan blender dan ditambahkan bumbu-bumbu seperti bawang merah, bawang putih, garam, tepung tapioka, tepung terigu, dan air. Adonan kemudian diaduk, dibentuk bulat-bulat dengan berat yang sesuai, dan dimasukkan ke dalam air mendidih hingga bakso terapung ke atas permukaan air.

Preparasi untuk semua jenis bakso dilakukan dengan jumlah bahan yang sama dan mempertahankan kondisi nyata sesuai praktik umum pembuatan bakso. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah keberadaan daging celeng dalam sampel bakso, sedangkan variabel terikat yaitu keberhasilan amplifikasi DNA target yang ditunjukkan melalui hasil positif reaksi LAMP. Jumlah bahan yang digunakan dalam pembuatan bakso, cara pembuatan, waktu dan suhu inkubasi reaksi LAMP, komposisi dan jumlah reagen, jumlah DNA cetakan, dan jenis primer serta gen target (COI) dibuat sama untuk setiap sampel.

Isolasi DNA

DNA bakso diisolasi dengan menggunakan kit isolasi DNA Quick Extraction Kit untuk makanan guna memastikan efisiensi ekstraksi DNA dari matriks pangan. Dengan demikian, isolasi DNA bakso mengikuti protokol yang ada pada manual reagen. Adapun langkah-langkah dalam isolasi DNA adalah sebagai berikut: Sebanyak 500 µl buffer GMO1 dan 20 µl proteinase K ditambahkan ke dalam 100 mg daging yang telah digerus kemudian di homogenkan menggunakan vortek selama satu menit. Selanjutnya campuran diinkubasi selama satu jam pada suhu 56°C. Campuran kemudian

ditambahkan 200 µl buffer GMO2 dan divortex selama satu menit sambil diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama lima menit. Supernatan ditransfer ke dalam tube baru dan ditambahkan 0,7 volume isopropanol.

Campuran divortex dan disentrifugasi 12.000 rpm selama tiga menit, kemudian supernatan dibuang dan pelet disimpan. Tahap selanjutnya adalah sebanyak 700 µl alkohol 70% ditambahkan ke dalam pelet dan divortex selama lima detik. Campuran disentrifugasi 12.000 rpm selama satu menit. Langkah ini diulangi sebanyak dua kali, kemudian supernatan dibuang. Tutup microtube dibuka dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5-10 menit untuk menghilangkan sisa alkohol. Tahap terakhir, buffer TE sebanyak 20-50 µl ditambahkan ke dalam DNA dan divortex selama satu menit. DNA hasil isolasi dikonfirmasi dengan elektroforesis pada gel agarose 0,8 persen, voltase 100 V selama 25 menit. Untuk uji kuantitatif, konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan nanodrop pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (Setiaputri *et al.*, 2020). Parameter pada isolasi DNA adalah konsentrasi dari hasil isolasi DNA.

Desain Primer LAMP

Desain primer LAMP dilakukan dengan menggunakan program *Primerexplorer*. Gen target yang digunakan adalah gen *Chytochrome C Oxidase Subunit I* (COI) karena merupakan salah satu gen mitokondria yang menjadi marker spesifik untuk identifikasi spesies (Elyasigorji dkk., 2023). Primer LAMP terdiri atas 4 set primer reguler yang terdiri atas F3, B3, FIP (gabungan dari F1C dan F2, dihubungkan oleh linker TTTT) dan BIP (gabungan dari B1C dan B2, penghubung TTTT). Kemudian untuk membuat primer lebih spesifik terhadap DNA target, maka primer loop (LB dan LF) juga didesain dalam penelitian ini. Software primerexplorer memberikan banyak alternatif primer. Adapun primer yang dipilih adalah seperti yang tercantum dalam Tabel 1.

Masing-masing primer dianalisis dengan menggunakan aligoanalyzer IDT, NCBI, Snapgene dan Primer3 Plus. Untuk memastikan primer hanya menempel pada DNA celeng, masing-masing primer disejajarkan dengan semua sekuens DNA sampel dengan

menggunakan software bioedit dan clustal W. Untuk penjelasan selanjutnya akan dijelaskan pada hasil dan pembahasan. Setelah didapatkan primer yang dianggap baik dan spesifik sesuai dengan parameter yang telah ditentukan (nilai T_m , GC, dan spesifitas), maka dilakukan amplifikasi gen dengan menggunakan metode LAMP. Dalam penelitian ini, ada dua jenis primer LAMP yang didesain. Kedua primer sama-sama dari gen COI celeng dan dipilih berdasarkan beberapa pertimbangan secara *in silico*.

Reaksi LAMP

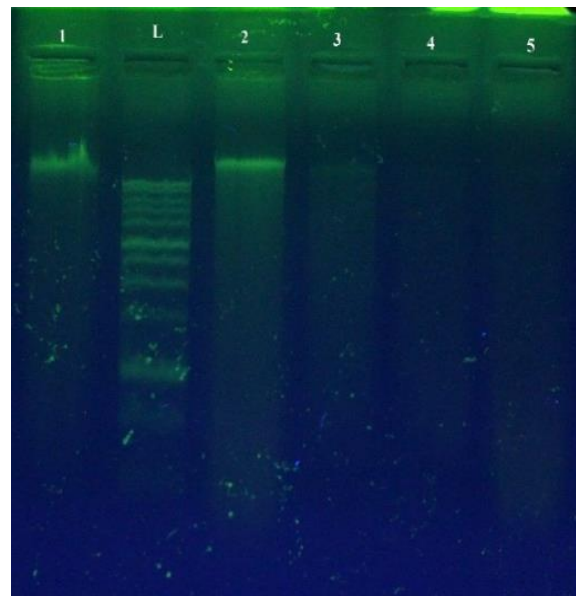
Reaksi LAMP berbeda dengan metode PCR karena hanya menggunakan satu suhu dan dapat diinkubasi dengan menggunakan *waterbath*. Reagen dan jumlah reagen yang digunakan merujuk pada website NEB yang menjelaskan mengenai LAMP dengan beberapa modifikasi dan optimasi untuk mendapatkan kondisi optimum. Reaksi diinkubasi pada suhu 65⁰ C selama 50 menit. Visualisasi hasil LAMP dengan menggunakan SYBR green (Garg dkk., 2022). SYBR green yang awalnya berwarna jingga akan berubah menjadi warna hijau terang jika terjadinya amplifikasi, sedangkan jika tidak terjadi amplifikasi maka campuran reaksi akan tetap berwarna jingga. Visualisasi juga dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarose 1 persen selama 30 menit dengan voltase 100 V. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pita-pita DNA bertingkat yang terbentuk dari hasil reaksi (Ghosh *et al.*, 2015).

Hasil dan Pembahasan

Hasil Isolasi DNA

Salah satu faktor keberhasilan dalam analisis berbasis DNA adalah hasil dari isolasi DNA. Pada Gambar 1 menunjukkan hasil elektroforesis dari isolasi DNA sampel yang digunakan. Hasil menunjukkan bahwa DNA berhasil diisolasi meskipun pita yang dihasilkan tidak terlalu tebal. Hal ini membuktikan bahwasanya pemanasan pada sampel dapat memberikan pengaruh yang berarti pada asam nukleat sampel. Pemanasan tinggi menjadi salah satu faktor yang dapat mempercepat kerusakan oksidatif DNA, sehingga mempengaruhi hasil dari DNA. Kerusakan ini juga menjadi penyebab perubahan struktur dan bias pada hasil

elektroforesis (Yamaguchi dkk., 2022). Semakin tinggi suhu pemanasan, semakin besar tingkat kerusakan yang dihasilkan pada asam nukleat (Habibi dkk., 2022). Pengecekan hasil isolasi DNA dilakukan untuk memastikan bahwasanya DNA dari daging celeng dan daging lainnya pada sampel bakso berhasil diisolasi, sehingga peluang keberhasilan pada proses selanjutnya dapat dimaksimalkan. Selain itu, keberadaan inhibitor dalam produk makanan olahan juga menjadi masalah, karena inhibitor dapat menghalangi proses memperoleh DNA berkualitas tinggi dan dalam jumlah yang cukup (Sajali *et al.*, 2018).



Gambar 1. Hasil elektroforesis isolasi DNA bakso (1=bakso daging sapi, 2= bakso celeng Sus scrofa, 3= bakso Sus barbatus, 4=bakso ayam, 5=bakso domba, L=ladder)

Isolasi DNA pada makanan olahan memiliki tantangan tersendiri. Berbagai penelitian telah banyak menggali untuk menemukan cara-cara efektif untuk memaksimalkan isolasi DNA pada makanan olahan. Protokol berbasis penggaraman dan reagen *Cetyl-Trimethylammonium Bromide* (CTAB) merupakan salah satu metode terbaik dalam isolasi DNA makanan, selain menggunakan reagen khusus untuk isolasi DNA makanan (Cravero *et al.*, 2019). Isolasi DNA dari bakso yang digunakan sebagai kontrol berhasil dilakukan sehingga dapat digunakan sebagai cetakan reaksi LAMP.

Reaksi LAMP

Jumlah komponen reagen yang digunakan dalam reaksi LAMP seperti yang tampak pada Tabel 1. Setiap perlakuan pengujian menggunakan jumlah reagen yang sama. Primer yang digunakan dalam reaksi LAMP ini didesain dengan menggunakan program *primerexplorer* (Tabel 2). Guna memastikan setiap primer dapat menempel pada DNA target dan tidak menempel pada DNA spesies lainnya adalah dengan cara melakukan penjajaran dengan sekuens DNA target. Penjajaran dilakukan menggunakan program Clustal W dan Bioedit. Terdapat beberapa pertimbangan dalam pemilihan primer LAMP, diantaranya adalah *Melting temperature* (Tm), jarak antar primer, stabilitas pada ujung primer, dan struktur sekunder.

Tabel 1. Jumlah reagen LAMP

Komponen	Volume (25 µl reaksi)
10 X isothermal amplification buffer	2,5 µl
10 mM dNTPs	3,5 µl
100 mM MgSO ₄	1,5 µl
10 x primer	2,5 µl (1,6 µM FIP/BIP, 0,2 µM F3/B3 dan 0,4 µM loop F/B)
Bst 2.0 (8000 U/mL)	1 µl
Sampel	1 µl
H ₂ O	13 µl

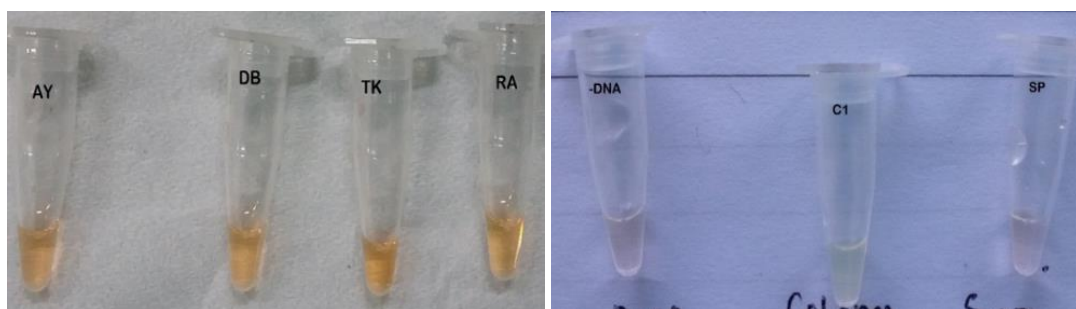
Tm yang disarankan untuk primer yang memiliki sekuens target dengan karakteristik kaya akan AT, maka nilai Tm sebaiknya adalah besar dari 55 dengan panjang primer 18-25 pasang basa (pb). Seluruh primer yang dipilih memiliki nilai Tm lebih dari 55, panjang minimalnya adalah 19 pb pada primer F3 dan maksimal 25 pb pada

primer D2 dan B2. Jarak dari ujung 5' F2 ke ujung 5'B2 pada primer LAMP yang telah didesain adalah 123 p, jarak ujung 5' F2 ke 5'F1c adalah 48 dan jarak dari ujung 3'F3 ke 5'F2 adalah 1 pb. Untuk mencegah primer membentuk struktur sekunder, maka masing-masing primer dianalisis dengan menggunakan program Olygoanalyzer IDT.

Tabel 2. Primer spesifik celeng untuk metode LAMP

F3	CCGTAGGAATAGACGTAGAT
B3	CTAGGGAGGAATTAGCTAGT
FIP	GTGCAGGGTAGCTAATCAACTAAAT -TTTT-CCGAGCATACTTTACATCT
BI	GCGGCAATATTAAATGATCACCC-
P	TTTT-AATGCCCGTTAGACCT
LF	ACTCCAGTGGGAATAGCAATGA
LB	GGGCTTCATCTTCCTATTCACCG

Analisis yang dilakukan pada primer terdiri dari *hairpin*, *self-dimer*, *hetero-dimer*, dan BLAST primer dengan menggunakan situs NCBI. Dari hasil *in silico*, masing-masing primer memberikan hasil yang baik karena tidak ada primer yang membentuk *hairpin*, *self-dimer* ataupun *hetero-dimer*. Ketika primer dianalisis dengan BLAST primer NCBI, masing-masing primer spesifik hanya menempel pada *Sus scrofa*, *Sus verrucoccus*, dan *Sus barbatus*. Reaksi LAMP yang digunakan dalam metode penelitian ini memiliki beberapa keuntungan, yaitu sederhana, mudah, murah dan menghasilkan jumlah ampikon yang lebih banyak jika dibandingkan dengan metode PCR. Jika pada metode PCR menggunakan mesin *Thermal cycler*, LAMP hanya menggunakan *waterbath* untuk memperbanyak gen target.



Gambar 2. Visualisasi hasil reaksi LAMP pada bakso daging ayam (ay), domba (db), tikus got (tk), tikus sawah (Ra), kontrol negatif (-DNA), celeng (C1) dan sapi (Sp)

Gambar 2 merupakan hasil percobaan LAMP primer pada Tabel 2 dengan menggunakan gen COI *Sus scrofa* untuk mendeteksi daging celeng pada suhu inkubasi 65°C selama 45 menit. Pada gambar terlihat pada sampel C1 (celeng) menunjukkan warna yang sedikit kehijauan dibandingkan dengan sampel lain yang berwarna jingga/ungu muda. Sehingga dapat dikatakan bahwa metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi daging celeng dalam bakso. Meskipun demikian, terdapat kelemahan pada metode ini yakni dalam beberapa kali pengulangan, terkadang hasil yang didapatkan terjadinya positif palsu. Reaksi tidak hanya berubah menjadi warna hijau ketika ditambahkan *SYBR green* pada bakso celeng namun juga mengindikasikan hasil positif pada bakso dengan kandungan DNA lainnya selain celeng. Adapun kemungkinan terbesar yang menyebabkan hal ini terjadi adalah suhu yang tidak dapat dipastikan stabil selama inkubasi reaksi LAMP. Faktor lainnya adalah LAMP mengalami ikatan non spesifik antar primernya, bukan dengan DNA cetakan target (Rolando *et al.*, 2020).

Dalam hal ini cukup sulit untuk menghindari terjadinya primer dimer dan amplifikasi yang tidak spesifik ketika beberapa pasang primer digunakan dalam LAMP.

Ditambah lagi dengan beberapa komponen dalam reaksi LAMP seperti Mg²⁺, dNTPs, dan DNA polymerase yang memiliki pengaruh besar dalam reaksi LAMP. Komponen-komponen ini harus dikontrol agar dapat menghindari terjadinya reaksi yang tidak spesifik (Wang dkk., 2015). Kemungkinan terakhir dari hasil yang tidak konsisten dari LAMP adalah terjadinya kontaminasi silang. Alasan terjadinya kontaminasi ini ketika tutup tabung reaksi dibuka pada akhir reaksi untuk menambahkan pewarna ketika visualisasi hasil reaksi (Moehling *et al.*, 2021).

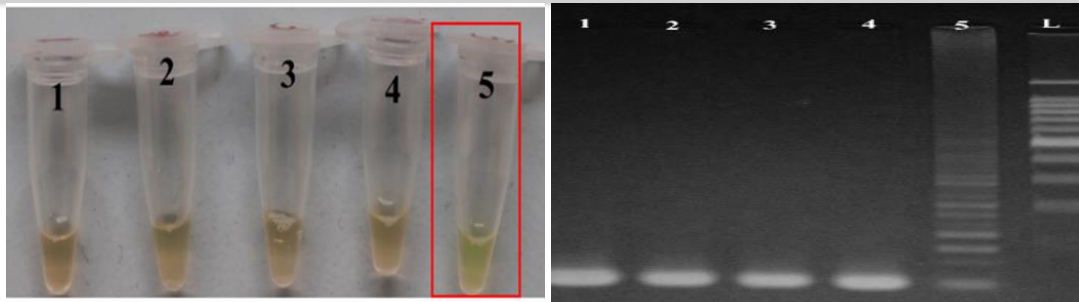
Hasil reaksi LAMP menghasilkan amplikon dalam jumlah yang sangat besar, dengan demikian risiko kontaminasi silang menjadi lebih tinggi dibandingkan dengan PCR konvensional. Hal ini membuat interpretasi hasil LAMP harus dilakukan dengan hati-hati (Foo dkk., 2020). Hasil serupa juga didapatkan oleh (Suleman dkk., 2016) untuk mendeteksi *T. gondii* menggunakan LAMP yang memberikan hasil positif dan negatif palsu. Sebagai salah satu upaya dalam memperkecil kemungkinan hasil positif palsu pada LAMP, (Alhamid dkk., 2023) mengurangi jumlah primer dari enam menjadi lima primer, menggunakan metode *colorimetric* dan *fluorometric* RT-LAMP dalam mendeteksi Covid-19

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrat	Sequence
F3	199	217	19	55.54	-4.60	-5.53	0.47	ACACATATCTGTGCGAGACG
B3	366	384	19	55.21	-5.70	-4.06	0.47	GAAGGCTGTTGCTATAACG
FIP		48						GGCAGATGAAGAATATGGATGCT-TAAATTACGGATGACTTATTCGCTA
BIP		45						CCGGGGCCTATATTACGGAT-GTAAATAGTAGGATTACTCCAATGT
F2	218	242	25	57.91	-2.40	-5.51	0.32	TAAATTACGGATGACTTATTCGCTA
F1c	258	280	23	60.44	-6.10	-5.14	0.43	GGCAGATGAAGAATATGGATGCT
B2	341	365	25	55.88	-2.89	-4.21	0.32	GTAAATAGTAGGATTACTCCAATGT
B1c	297	316	20	60.36	-7.57	-5.57	0.55	CCGGGGCCTATATTACGGAT

Gambar 3. Hasil desain primer LAMP kedua

Meskipun metode LAMP dilaporkan sering terjadinya hasil positif palsu, metode ini tetap layak untuk dikembangkan karena sensitif, lebih sederhana, cepat, dan tidak membutuhkan peralatan yang kompleks. Berbagai metode tambahan telah diuji coba untuk meningkatkan efektivitas metode LAMP dalam mendeteksi DNA target. Penambahan fluoresen interkalasi pada primer-primer LAMP bisa digunakan untuk menguantifikasi dan mendeteksi molekul DNA target. Selain itu, penambahan tersebut dapat mengurangi insiden hasil positif palsu (Hardinge

& Murray, 2019). *SYBR green* dirancang untuk deteksi visual produk LAMP melalui pengamatan langsung dari perubahan warna produk akhir. Warna dari *SYBR green* adalah jingga dan memiliki afinitas tinggi terhadap DNA beruntai ganda maupun RNA. Selama proses amplifikasi, pewarna *SYBR green* akan berikatan dengan molekul DNA untai ganda. Semakin banyak molekul DNA untai ganda yang terbentuk, semakin meningkat fluoresensi warna hijau yang dihasilkan (Lai *et al.*, 2021).



Gambar 4. Hasil visualisasi reaksi LAMP untuk primer kedua.

Keterangan: 1: kontrol negatif (tanpa DNA), 2: DNA ayam, 3: DNA sapi (*Bos indicus*), 4: DNA celeng (*Sus scrofa*), 5: DNA celeng (*Sus barbatus*)

Sensitivitas dari metode LAMP cukup terbukti karena mampu mengamplifikasi DNA target secara spesifik dengan menggunakan primer kedua pada Gambar 3. Pada percobaan dengan desain primer spesifik, reaksi hanya positif pada DNA target *Sus barbatus*. Namun sayangnya, reaksi negatif pada DNA *Sus scrofa*, sehingga kurang aplikatif jika digunakan dalam mendeteksi kandungan DNA daging celeng pada makanan. Baik *Sus scrofa*, *Sus scrofa domesticus*, *Sus verucoccus*, maupun *Sus barbatus*, meskipun berbeda jenis namun masih sama-sama memiliki status tidak halal. Adapun primer yang spesifik terhadap *Sus barbatus* dengan menggunakan gen *Cytochrome Oxidase Subunit I* (COI) tampak pada Gambar 3. Primer tersebut dipilih dengan mempertimbangkan *melting temperature* (Tm), jarak antar primer, stabilitas pada ujung primer, dan struktur sekunder. Untuk mencegah primer membentuk struktur sekunder, maka masing-masing primer dianalisis dengan menggunakan program olynalyzer IDT.

Analisis yang dilakukan terdiri dari *hairpin*, *self-dimer*, *hetero-dimer* dan BLAST primer dengan menggunakan situs NCBI. Masing-masing primer memberikan hasil yang baik karena tidak ada primer yang membentuk struktur-struktur tersebut. Ketika primer dianalisis dengan BLAST primer NCBI, masing-masing primer spesifik hanya dapat menempel pada *Sus scrofa*, *Sus scrofa domesticus*, *Sus verucoccus* dan *Sus barbatus*. Namun ketika dilakukan pengujian pada reaksi LAMP, primer menempel secara spesifik pada *Sus barbatus*. Reaksi diinkubasi dengan menggunakan waterbath pada suhu 65⁰ celcius selama 50 menit. Visualisasi hasil reaksi diamati dengan menambahkan *SYBR green*. Jika reaksi positif,

reaksi akan berubah menjadi warna kehijauan, sedangkan jika reaksi negatif tetap berwarna jingga seperti tampak pada Gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan bahwa reaksi positif pada bakso dengan kandungan *Sus barbatus* yang ditandai dengan warna kehijauan pada tabung nomor 5 sampel *Sus barbatus*, sedangkan reaksi lainnya negatif yang dicirikan dengan tidak ada perubahan warna ketika ditambahkan *SYBR green*. Hasil visualisasi diperkuat dengan elektroforegram menggunakan elektroforesis dan menampilkan beberapa potong pita-pita hasil amplifikasi. Disisi lain, untuk hasil yang negatif, tidak tampak adanya potongan pita-pita hasil amplifikasi. Meskipun dalam penelitian ini belum secara spesifik dapat mendeteksi semua jenis daging celeng, namun metode LAMP memiliki spesifisitas yang cukup tinggi dan mampu mendeteksi hingga tingkat spesies yang berbeda. Hasil ini masih sama dengan hasil yang sebelumnya dengan menggunakan primer pertama, dimana hasil dari setiap pengulangan sering menghasilkan hasil yang positif palsu. Dengan demikian, masih perlu dilakukan penambahan metode/cara lain agar hasilnya stabil setiap dilakukan pengulangan.

Metode LAMP sangat spesifik dalam mendeteksi jenis spesies daging yang digunakan dalam makanan karena menggunakan banyak jenis primer dalam satu reaksi. Namun, penggunaan primer yang banyak ini juga berakibat primer dapat saling menempel satu sama lain jika suhu yang digunakan selama reaksi tidak stabil. Selain itu, karena metode ini sangat sensitif, kontaminasi DNA selama pengerjaan harus juga diperhatikan karena dapat menghasilkan hasil positif palsu (Wong dkk., 2018). Kedua primer yang didesain untuk dapat mendeteksi DNA celeng di dalam bakso masih

belum berhasil untuk diaplikasikan. dengan demikian, diperlukan optimasi lanjutan dari konsentrasi primer, suhu yang digunakan, menurunkan tingkat peluang kontaminan, dan kombinasi dengan metode lain dalam visualisasi hasil akhir.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa primer-primer yang didesain dengan menggunakan metode *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) dapat digunakan dalam mendeteksi keberadaan daging celeng dalam bakso. Namun primer ini masih belum stabil dan aplikatif untuk digunakan dalam mendeteksi celeng, sehingga masih diperlukan penambahan metode lain guna menstabilkan primer dan visualisasi hasil akhir. Meskipun demikian, metode LAMP cukup menjanjikan untuk dikembangkan sebagai metode deteksi berbasis DNA pada makanan olahan secara cepat, sederhana, dan sensitif.

Referensi

- Alhamid, G., Tombuloglu, H., & Al-Suhaimi, E. (2023). Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays using five primers reduces the false-positive rate in COVID-19 diagnosis. *Scientific Reports*, 13(1), 5066. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31760-z>
- Arini, R. L. (2018). *Analisis Daging Celeng (Sus scrofa) dalam Bakso dengan Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) untuk Autentikasi Halal* [Skripsi]. Universitas Gadjah Mada.
- Aydin, S., Emre, E., Ugur, K., Aydin, M. A., Sahin, I., Cinar, V., & Akbulut, T. (2025). An overview of ELISA: A review and update on best laboratory practices for quantifying peptides and proteins in biological fluids. *Journal of International Medical Research*, 53(2), 03000605251315913. <https://doi.org/10.1177/03000605251315913>
- Cahyaningsari, D., Latif, H., & Sudarnika, E. (2019). Identifikasi penambahan daging babi pada pangan berbahan dasar daging sapi menggunakan ELISA dan qPCR. *Acta Veterinaria Indonesiana*, 7(2), 17–25. <https://doi.org/10.29244/avi.7.2.17-25>
- Carter, M., Essner, R., Goldstein, N., & Iyer, M. (2022). Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. Dalam *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (hlm. 227–243). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818646-6.00014-2>
- Coleman, W. B., & Tsongalis, G. J. (2017). Laboratory Approaches in Molecular Pathology—The Polymerase Chain Reaction. Dalam *Diagnostic Molecular Pathology* (hlm. 15–23). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800886-7.00002-9>
- Cravero, D., Cerutti, F., Maniaci, M. G., Barzanti, P., Scaramagli, S., Riina, M. V., Ingravalle, F., Acutis, P. L., & Peletto, S. (2019). Evaluation of DNA isolation procedures from meat-based foods and development of a DNA quality score. *LWT*, 106, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.028>
- Elyasigorji, Z., Izadpanah, M., Hadi, F., & Zare, M. (2023). Mitochondrial genes as strong molecular markers for species identification. *The Nucleus*, 66(1), 81–93. <https://doi.org/10.1007/s13237-022-00393-4>
- Foo, P. C., Nurul Najian, A. B., Muhamad, N. A., Ahamad, M., Mohamed, M., Yean Yean, C., & Lim, B. H. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications: A comparative analysis study of LAMP, conventional PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) based on *Entamoeba histolytica* DNA derived from faecal sample. *BMC Biotechnology*, 20(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00629-8>
- Galal-Khallaf, A., Hussein, D., & El-Sayed Hassab El-Nabi, S. (2021). Single nucleotide polymorphism-based methodology for authentication of bovine, caprine, ovine, camel, and donkey meat cuts. *Journal of Food Science*, 86(10), 4444–4456. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15885>

- Garg, N., Ahmad, F. J., & Kar, S. (2022). Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100120. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100120>
- Ghosh, R., Nagavardhini, A., Sengupta, A., & Sharma, M. (2015). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Ciceris—Wilt pathogen of chickpea. *BMC Research Notes*, 8(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-0997-z>
- Habibi, P., Ostad, S. N., Heydari, A., Aliebrahimi, S., Montazeri, V., Foroushani, A. R., Monazzam, M. R., Ghazi-Khansari, M., & Golbabaei, F. (2022). Effect of heat stress on DNA damage: A systematic literature review. *International Journal of Biometeorology*, 66(11), 2147–2158. <https://doi.org/10.1007/s00484-022-02351-w>
- Hardinge, P., & Murray, J. A. H. (2019). Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers. *Scientific Reports*, 9(1), 7400. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43817-z>
- Hellberg, R. S. (2021). DNA-based techniques for seafood species authentication. Dalam *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 95, hlm. 207–255). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.09.001>
- Hellberg, R. S., Isaacs, R. B., & Hernandez, E. L. (2019). Identification of shark species in commercial products using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 210, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.10.010>
- Hersanty, N. A. D., Farmayanti, N., & Dewi, T. G. (2023). Kepuasan dan Loyalitas Konsumen Restoran Bakso Bakwan Malang. *Jurnal Agribisnis Indonesia* (*Journal of Indonesian Agribusiness*), 11(2), 326–340. <https://doi.org/10.29244/jai.2023.11.2.326-340>
- Kim, K. H., & Kang, T. S. (2024). Development of advanced PCR-based methods for accurate identification and authentication of commercial shrimp products. *Food Control*, 159, 110288. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110288>
- Lai, M. Y., Ooi, C. H., & Lau, Y. L. (2021). Validation of SYBR green I based closed-tube loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for diagnosis of knowlesi malaria. *Malaria Journal*, 20(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03707-0>
- Laksanawati, T. A., Khirzin, M. H., Meidayanti, K., Kusherawati, P. A., Kusuma, H. S., Darmokoesoemo, H., & Iqbal, M. (2024). Prediction of shelf life and sensory qualities of beef meatball with biodegradable taro starch-duck bone gelatin packaging at different storage temperatures. *Applied Food Research*, 4(1), 100402. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100402>
- Meilinia, S. M., Achmad, A. B., Diyantoro, D., & Chrismanto, D. (2021). Identifikasi Kandungan Komponen Babi pada Daging Curah dan Produk Olahan Daging Menggunakan Metode ELISA Sandwich di Balai Besar Veteriner Wates. *VITEK: Bidang Kedokteran Hewan*, 11(2). <https://doi.org/10.30742/jv.v11i2.78>
- Moehling, T. J., Choi, G., Dugan, L. C., Salit, M., & Meagher, R. J. (2021). LAMP Diagnostics at the Point-of-Care: Emerging Trends and Perspectives for the Developer Community. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21(1), 43–61. <https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1873769>
- Mualim, M., Latif, H., Pisestyani, H., & Rahayu, P. (2024). Analysis of species adulteration in beef sausage using real-time polymerase chain reaction in Makassar, Indonesia. *Veterinary World*, 2355–2364.

- <https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.2355-2364>
- Rohman, A., & Fadzillah, N. A. (2018). Lipid-based techniques used for halal and kosher food authentication. Dalam *Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods* (hlm. 393–407). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101892-7.00021-3>
- Rolando, J. C., Jue, E., Barlow, J. T., & Ismagilov, R. F. (2020). Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification. *Nucleic Acids Research*, 48(7), e42–e42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa099>
- Sajali, N., Wong, S. C., Hanapi, U. K., Abu Bakar @ Jamaluddin, S., Tasrip, N. A., & Mohd Desa, M. N. (2018). The Challenges of DNA Extraction in Different Assorted Food Matrices: A Review. *Journal of Food Science*, 83(10), 2409–2414. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14338>
- Sengupta, P., Wang, C. W., & Ma, Z. F. (2021). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Technique for Food Analysis. Dalam M. S. Khan & M. Shafiur Rahman (Ed.), *Techniques to Measure Food Safety and Quality* (hlm. 91–115). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68636-9_5
- Setiaputri, A. A., Barokah, G. R., Sahaba, M. A. B., Arbajayanti, R. D., Fabella, N., Pertiwi, R. M., Nurilmala, M., Nugraha, R., & Abdullah, A. (2020). Perbandingan metode isolasi DNA pada produk perikanan segar dan olahan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3), 447–458. <https://doi.org/10.34024/jppi.v23i3.1983>
- Shanker, R., Singh, G., Jyoti, A., Dwivedi, P. D., & Singh, S. P. (2020). Nanotechnology and detection of microbial pathogens. Dalam *Animal Biotechnology* (hlm. 593–611). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00026-4>
- Suleman, E., Mtshali, M. S., & Lane, E. (2016). Investigation of false positives associated with loop-mediated isothermal amplification assays for detection of *Toxoplasma gondii* in archived tissue samples of captive felids. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(5), 536–542. <https://doi.org/10.1177/1040638716659864>
- Tao, D., Xiao, X., Lan, X., Xu, B., Wang, Y., Khazalwa, E. M., Pan, W., Ruan, J., Jiang, Y., Liu, X., Li, C., Ye, R., Li, X., Xu, J., Zhao, S., & Xie, S. (2022). An Inexpensive CRISPR-Based Point-of-Care Test for the Identification of Meat Species and Meat Products. *Genes*, 13(5), 912. <https://doi.org/10.3390/genes13050912>
- Tigrero-Vaca, J., Díaz, B., Gu, G., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2025). Next-generation sequencing applications in food science: Fundamentals and recent advances. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13, 1638957. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1638957>
- Wang, D.-G., Brewster, J., Paul, M., & Tomasula, P. (2015). Two Methods for Increased Specificity and Sensitivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Molecules*, 20(4), 6048–6059. <https://doi.org/10.3390/molecules20046048>
- Wei, Q., Wang, X., Sun, D.-W., & Pu, H. (2019). Rapid detection and control of psychrotrophic microorganisms in cold storage foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 453–464. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.009>
- Wong, Y.-P., Othman, S., Lau, Y.-L., Radu, S., & Chee, H.-Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626–643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
- Yamaguchi, D., Yoshida, M., & Nakano, S. (2022). Evaluation of Thermal Stability of DNA Oligonucleotide Structures Embedded in Hydrogels. *DNA*, 2(4), 302–313. <https://doi.org/10.3390/dna2040021>