

**INOVASI *MULTIPLEX* PCR UNTUK SISTEM
DETEKSI ALERGEN KEDELAI YANG
MENDUKUNG KEAMANAN PANGAN**



**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2025**

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi **Inovasi Multiplex Pcr Untuk Sistem Deteksi Alergen Kedelai Yang Mendukung Keamanan Pangan** yang saya susun sebagai syarat memperoleh gelar sarjana Teknologi Pertanian merupakan hasil karya tulis saya sendiri, kecuali kutipan dan rujukan dan masing-masing telah dijelaskan sumbernya dengan norma, kaidah, dan etika penulisan ilmiah.

Saya bersedia menerima sanksi pencabutan gelar akademik yang saya peroleh dan sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan yang berlaku apabila dikemudian hari ditemukan adanya plagiat di skripsi ini.

Padang, Oktober 2025

Silvana Musti Dwisia
2111123024



INOVASI *MULTIPLEX* PCR UNTUK SISTEM DETEKSI ALERGEN KEDELAI YANG MENDUKUNG KEAMANAN PANGAN

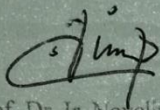


**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2025**

Judul Skripsi : Inovasi *Multiplex* Per Untuk Sistem Deteksi
Alergen Kedelai Yang Mendukung
Keamanan Pangan
Nama : Silvana Musti Dwisia
Bp : 2111123024

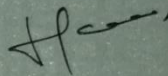
Menyetujui

Pembimbing I



Prof. Dr. Ir. Novelina, MS
NIP 195611071986032001

Pembimbing II



Bastian Nova, S.Si., M.Si
NIP 198906242022031003

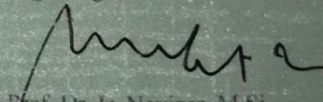
Mengetahui

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Andalas



Dr. Ir. Atik Zuhri, M.Si
NIP 196804251994031003

Ketua Program Studi
Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian

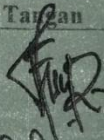
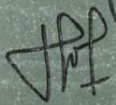
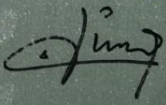
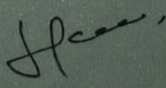


Prof. Dr. Ir. Novizar, M.Si
NIP 196411251989111001

Tanggal Ujian : 27 Oktober 2025
Tanggal Lulus : 27 Oktober 2025



Skripsi yang berjudul **Inovasi Multiplex Pcr Untuk Sistem Deteksi Alergen Kedelai Yang Mendukung Keamanan Pangan** oleh Silvana Musti Dwisia (2111123024) ini telah diuji dan dipertahankan di depan Sidang Panitia Ujian Sarjana Fakultas Teknologi Pertanian pada Program Studi Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Universitas Andalas Padang pada tanggal 27 Oktober 2025.

No	Nama	Tanda Tangan	Jabatan
1	Felga Zulfia Rasdiana, S.T. P, M.Si		Ketua
2	Linda Wati, S.Si, M.Si		Sekretaris
3	Prof. Dr. Ir. Rina Yenrina, MS		Anggota
4	Prof. Dr. Ir. Novelina, MS		Anggota
5	Bastian Nova, S.Si., M.Si		Anggota

HALAMAN PENGHARGAAN

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah yang dengan rahmat dan karunia-Nya saya bisa sampai pada titik ini. Sholawat beserta salam, semoga tersampaikan kepada kekasihNya, Nabi Muhammad SAW. Sosok tauladan sejati yang membawa umat manusia dari kegelapan menuju cahaya ilmu dan kebenaran. Penulis persembahkan dengan penuh rasa syukur dan cinta, skripsi ini kepada ayah dan ibu, dua sosok luar biasa yang menjadi alasan terbesar di setiap langkah perjuangan ini. Terima kasih atas cinta yang tak pernah habis, atas doa yang senantiasa mengiringi tanpa jeda, dan atas pengorbanan yang tak terhitung. Semua keberhasilan ini adalah hasil dari setiap tetes keringat, air mata, dan semua doa yang mereka panjatkan demi pendidikan anaknya. Semoga pencapaian kecil ini mampu menjadi penghapus lelah dan pembawa senyum di wajah ayah dan ibu. Terima kasih abangku tersayang, Abang Isan yang telah memberikan support selama masa studi ini, yang selalu menjadi pendengar di saat penulis mengalami kesusahan dan mengajarkan untuk berani melewati masalah yang ada. Terima kasih saya sampaikan kepada Dewi dan Wioni telah membantu dan melewati masa-masa studi dalam senang maupun susah. Terimakasih Kak Suci, teman kecilku dan fara teman kkn-ku yang selalu mendengarkan keluh kesah dan selalu memberikan dukungan yang tulus kepada penulis dan kepada teman seperjuangan dalam grup OTW STP, Elysium'21, dan kontrakan DWS atas kebersamaan, dukungan, tawa, dan semangat yang senantiasa mengiringi setiap langkah.

Ucapan terima kasih yang tulus saya sampaikan kepada Ibu Prof. Dr. Ir. Novelina, MS dan Bapak Bastian Nova, S.Si., M.Si, selaku dosen pembimbing yang telah memberi bimbingan, kesabaran, dan ketulusan Ibu dan bapak dalam membagikan ilmu serta nilai-nilai kehidupan yang berharga dalam perjalanan akademik ini. Dari setiap arahan dan nasihat, penulis percaya bahwa "sesuatu yang tidak dipertaruhkan, tidak akan dimenangkan".

BIODATA

Silvana Musti Dwisia, lahir di Bukittinggi, 29 Desember 2002 sebagai anak kedua dari dua bersaudara, dari Bapak Musni dan Ibu Yulianti. Pendidikan pada Sekolah Dasar (SD) di SDN 03 Lurah Barangin dan tamat pada tahun 2015, lalu menempuh Sekolah Lanjut Tengah Pertama (SLTP) di SMPN 01 Bonjol dan tamat pada tahun 2018. Kemudian menempuh Sekolah Lanjut Tinglat Atas (SLTA) di SMAN 01 Bonjol dan tamat pada tahun 2021. Di tahun 2021, penulis melanjutkan pendidikan Strata 1 di Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Andalas, Padang. Selama masa studi, penulis aktif dalam kepanitiaan tingkat Universitas yaitu Bakti UNAND sebagai kepala bidang snack pada tahun 2023 dan juga aktif dalam beberapa kepanitiaan. Penulis juga telah menyelesaikan PKL (Praktik Kerja Lapangan) di CV. KATUJU pada tahun 2024 di Padang, serta melakukan pengabdian pada Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Nagari Alam Pauh Duo, Kecamatan Pauh Duo, Kabupaten Solok Selatan pada tahun 2024.

Padang, Oktober 2025



S.M.D

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanahu Wata'ala, karena berkat rahmat dan karunia-Nyalah penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Inovasi Multiplex Pcr Untuk Sistem Deteksi Alergen Kedelai Yang Mendukung Keamanan Pangan”**. Salawat beserta salam penulis ucapkan untuk pimpinan umat Islam sedunia yaitu Nabi Muhammad Sallallahu Alaihi Wasallam dan kita sebagai umatnya yang mudah-mudahan mendapatkan syafa'at hingga akhirat kelak.

Disamping itu, izinkan penulis untuk menyampaikan ucapan terima kasih penulis kepada:

1. Terkhusus untuk orang tua penulis, Bapak Musni dan Ibu Yulianti, yang telah berjuang dalam mendukung penulis selama dimasa perkuliahan ini.
2. Ibu Prof. Dr. Ir. Novelina, M.S. selaku pembimbing I yang telah bersedia membimbing penulis untuk menyelesaikan skripsi penelitian ini.
3. Bapak Bastian Nova, S.Si., M.Si. selaku pembimbing II yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk membimbing penulis untuk menyelesaikan skripsi penelitian ini.
4. Rekan-rekan seperjuangan dalam proses penelitian yang selalu memberikan dukungan kepada penulis.

Penulis menyadari dengan amat sangat bahwasanya masih terdapat kekurangan dalam penulisan skripsi ini, penulis mengharapkan adanya saran dan masukan yang membangun dan peluang dalam penelitian lanjutan. Penulis juga berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk seluruh pihak yang membaca.

Padang, Oktober 2025

S.M.D

DAFTAR ISI

Halaman

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI.....	ii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
ABSTRAK	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)	5
2.1.1 Sejarah Penemuan Teknik PCR.....	6
2.1.2 Prinsip Dasar PCR	7
2.2 Primer	9
2.3 Senyawa alergen pada kedelai.....	11
2.3.1 <i>Gly m Bd</i> 30K (Glycinin).....	13
2.3.2 <i>Gly m Bd</i> 28K (Glycinin).....	14
2.4 Elektroforesis.....	14
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	17
3.1 Lokasi dan Waktu penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan	17
3.2.1 Alat	17
3.2.2 Bahan	17
3.3 Rancangan Penelitian	17
3.3.1 Preparasi Sampel	17

3.3.2 Rancangan Primer	18
3.3.3 Isolasi DNA	21
3.3.4 Uji Spesifisitas	22
3.3.5 Uji Sensitivitas Multiplex PCR	25
3.3.6 Elektroforesis	27
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Isolasi DNA	28
4.2 Spesifisitas Primer	29
4.3 <i>Multiplex</i> PCR	54
4.4 Produk Olahan Pangan	58
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	63
5.1 Kesimpulan	63
5.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	72



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 1. Konsentrasi Gel Agarosa	15
Tabel 2. Genbank Primer <i>Gly m Bd</i> 28k dan <i>Gly m Bd</i> 30k	20
Tabel 3. Komponen singleplex PCR.....	23
Tabel 4. Komponen Multiplex PCR.....	24
Tabel 5. Settingan Mesin Thermal Cyler.....	25
Tabel 6. Pembuatan DNA Working Solution.....	26
Tabel 7. Komponen Sensitivitas Multiplex PCR.....	27
Tabel 8. Konsentrasi Absorbansi Sampel	28
Tabel 9. Hasil Isolasi DNA Produk Olahan Pangan	58



DAFTAR GAMBAR

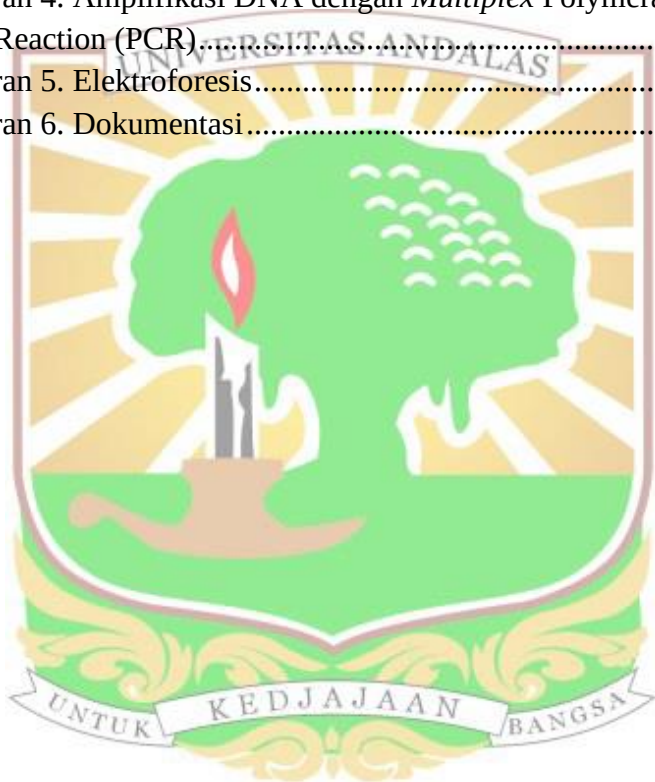
Gambar	Halaman
Gambar 1. Proses dan Komponen PCR (B. Mahajan, 2019).....	9
Gambar 2. Situs NCBI	18
Gambar 3. WEBDSV Gly 28K	19
Gambar 4. WEBDSV Gly 30K	19
Gambar 5. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Forward</i> G-Max-28K-12F	30
Gambar 6. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Reverse</i> G-Max-28K-577R	30
Gambar 7. Hasil Elektroforesis Primer 28K12F/28K577R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah) ...	33
Gambar 8. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Forward</i> G-Max-28K-949F	34
Gambar 9. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Reverse</i> G-Max-28K-1258R	35
Gambar 10. Hasil Elektroforesis Primer 28K949F/28K1258R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)	36
Gambar 11. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Forward</i> G-Max-28K-1995F	38
Gambar 12. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Reverse</i> G-Max-28K-2080R	38
Gambar 13. Hasil Elektroforesis Primer 28K1995F/28K2080R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)	40
Gambar 14. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Forward</i> G-Max-30K-1072F	42
Gambar 15. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Reverse</i> G-Max-30K-1506R	43

Gambar 16. Hasil Elektroforesis Primer 30K1072F/30K1506R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)	45
Gambar 17. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Forward</i> G-Max-30K-1830F	47
Gambar 18. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Reverse</i> G-Max-30K-2228R.....	47
Gambar 19. Hasil Elektroforesis Primer 30K1830F/30K2228R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)	49
Gambar 20. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Forward</i> G-Max-30K-106F	51
Gambar 21. Hasil Analisis BLAST Primer <i>Reverse</i> G-Max-30K-234R.....	51
Gambar 22. Hasil Elektroforesis Primer 30K106F/30K234R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)	53
Gambar 23. Hasil Elektroforesis Spesifisitas <i>Multiplex</i> Primer 28K dan 30K.....	55
Gambar 24. Hasil Elektroforesis Sensitivitas Primer <i>Multiplex</i> 28K dan 30K (Ket. M: Marker, Lajur 1-4 Konsentrasi)	57
Gambar 25. Hasil Elektroforesis Produk Olahan Pangan (Ket. M: Marker, Lajur 1 Kentang)	60



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Desain Primer	73
Lampiran 2. Preparasi Sampel	74
Lampiran 3. Isolasi DNA menggunakan Plant Genomic DNA (Tiangen) Kit.....	75
Lampiran 4. Amplifikasi DNA dengan <i>Multiplex</i> Polymerase Chain Reaction (PCR).....	76
Lampiran 5. Elektroforesis.....	77
Lampiran 6. Dokumentasi.....	78



INOVASI *MULTIPLEX* PCR UNTUK SISTEM DETEKSI ALERGEN KEDELAI YANG MENDUKUNG KEAMANAN PANGAN

Silvana Musti Dwisia¹, Novelina², Bastian nova³

ABSTRAK

Kontaminasi silang alergen dalam produk pangan dapat menimbulkan risiko serius bagi individu yang sensitif terhadap bahan tertentu, seperti kedelai. Oleh karena itu, deteksi akurat alergen menjadi penting dalam menjamin keamanan pangan. Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan menguji primer spesifik *Gly m Bd 28K* dan *Gly m Bd 30K* dalam sistem *Multiplex* Polymerase Chain Reaction (PCR) guna mendeteksi alergen kedelai dalam produk pangan. Desain primer dilakukan secara *in silico* menggunakan Primer-BLAST dan divalidasi secara *in vitro* melalui PCR *singleplex* dan *multiplex*. Hasil uji spesifisitas menunjukkan bahwa primer hanya mengamplifikasi DNA dari kedelai (*Glycine max*) tanpa reaktivitas silang terhadap jagung, gandum, dan kacang tanah. Uji sensitivitas menunjukkan batas deteksi mencapai 0,1 ng/μL DNA, menandakan sensitivitas yang tinggi. Pengujian terhadap produk olahan pangan kentang menunjukkan tidak adanya pita amplifikasi, mengindikasikan produk bebas alergen kedelai atau berada di bawah batas deteksi. Keseluruhan hasil menunjukkan bahwa metode *Multiplex* PCR dengan primer yang dirancang memiliki spesifisitas dan sensitivitas tinggi, serta dapat diandalkan untuk deteksi jejak alergen kedelai dalam produk olahan pangan sebagai upaya peningkatan pengawasan dan pelabelan keamanan pangan.

Kata kunci: Alergen kedelai, *Gly m Bd 28K*, *Gly m Bd 30K*, keamanan pangan, *Multiplex* PCR

MULTIPLEX PCR INNOVATION FOR SOYBEAN ALERGEN DETECTION SYSTEM THAT SUPPORTS FOOD SAFETY

Silvana Musti Dwisia¹, Novelina², Bastian nova³

ABSTRACT

Cross-contamination of allergens in food products can pose a serious risk to individuals who are sensitive to certain ingredients, such as soybeans. Therefore, accurate detection of allergens is important in ensuring food safety. This study aims to design and test specific primers of *Gly m Bd* 28K and *Gly m Bd* 30K in the *Multiplex* Polymerase Chain Reaction (PCR) system to detect soy allergens in food products. The primary design was carried out *in silico* using Primer-BLAST and validated *in vitro* through *singleplex* and *multiplex* PCR. The results of the specificity test showed that the primer only amplified the DNA from soybeans (*Glycine max*) without cross-reactivity to corn, wheat, and peanuts. The sensitivity test showed a detection limit of up to 0.1 ng/μL of DNA, indicating high sensitivity. Testing of processed potato food products showed the absence of an amplification band, indicating the product was free of soy allergens or was below the detection limit. The overall results show that the *Multiplex* PCR method with a primary is designed to have high specificity and sensitivity, and is reliable for the detection of traces of soy allergens in processed food products as an effort to improve food safety supervision and labeling.

Kata kunci: PCR *multiplex*, soy allergen, *Gly m Bd* 28K, *Gly m Bd* 30K, food safety

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keamanan pangan merupakan kondisi dan upaya yang dilakukan untuk memastikan pangan bebas dari bahaya biologis, kimia, maupun fisik yang dapat mengganggu, merugikan, atau membahayakan kesehatan manusia (Peraturan Pemerintah, 2019). Menurut *World Health Organization* (WHO), keamanan pangan menjamin bahwa makanan tidak menimbulkan bahaya bagi konsumen ketika disiapkan atau dikonsumsi sesuai petunjuk. Salah satu tantangan dalam penerapan keamanan pangan adalah kontaminasi silang, yaitu peristiwa ketika residu dari bahan pangan yang mengandung alergen terbawa secara tidak sengaja ke dalam bahan pangan non alergen selama proses produksi (Bedford et al., 2020). Kontaminasi ini sering terjadi akibat penggunaan bersama peralatan produksi atau proses sanitasi yang kurang efektif, sehingga dapat menimbulkan resiko kesehatan serius bagi konsumen yang alergi. Oleh karena itu, pencegahan kontaminasi silang merupakan aspek penting dalam sistem manajemen keamanan pangan untuk menjamin mutu dan keamanan produk pangan yang beredar di masyarakat.

Produk pangan yang beredar di Indonesia beberapa mengandung bahan alergen yang dapat memicu reaksi pada orang-orang tertentu. Saat ini, label alergen pada produk makanan masih disesuaikan dengan kebutuhan konsumen yang akan membeli produk tersebut. Misalnya, di Indonesia produk yang mengandung kacang kedelai tidak selalu mencantumkan label alergen, karena tingkat sensitivitasnya masyarakat terhadap bahan tersebut tergolong rendah. Namun, sebagai langkah pencegahan produsen sebaiknya tetap mencantumkan informasi mengenai alergen pada kemasan produk mereka untuk melindungi konsumen (Muhammad et al., 2023).

Beberapa jenis makanan yang sering menyebabkan alergi

yaitu kacang, krustasea, ikan, telur, susu, kedelai, gandum dan wijen. Namun, prevalensi alergi ini dapat bervariasi di setiap negara karena perbedaan pola makan (Luo et al., 2022). Di Amerika Serikat, sekitar 19% orang dewasa melaporkan memiliki alergi makanan pada tahun 2018 (Warren et al., 2020). Di Eropa, prevalensi alergi makanan berkisar antara 1,7% hingga 36,3% dalam rentang waktu 2000 hingga 2021 (Spolidoro et al., 2024). Di Indonesia, penelitian menunjukkan bahwa 49% responden memiliki alergi makanan dengan 7,4% anak-anak sensitif terhadap alergen kacang kedelai (Candra & dkk, 2011).

Pemerintah perlu mengembangkan regulasi mengenai alergen untuk melindungi konsumen dari risiko kesehatan. Sebagai ilustrasi, peraturan BPOM No. 1 Tahun 2023, mengharuskan pangan segar yang mengandung alergen untuk mencantumkan keterangan pada labelnya (BPOM RI, 2023). Meskipun regulasi telah ada, masih banyak pelaku usaha yang belum mematuhi peraturan tersebut, terutama dalam hal pencantuman informasi mengenai komposisi bahan (Riantika Pratiwi, 2019).

Deteksi alergen dalam makanan dapat dilakukan menggunakan dua metode, yaitu berbasis protein (protein based) dan berbasis DNA (DNA based). Metode berbasis protein seperti *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *lateral flow devices* (LFD). Berbagai teknik berbasis protein, seperti ELISA sandwich untuk pengembangan dan validasi sandwich ELISA untuk penentuan alergen kedelai dan penerapannya dalam makanan olahan (Zhu et al., 2022), ELISA untuk mendeteksi protein kedelai dalam produk daging (Renčová & Tremlová, 2009).

Metode DNA based memiliki keunggulan dalam mendeteksi alergi pada makanan, karena senyawa DNA terbukti cukup stabil terhadap perlakuan suhu tinggi. Berbagai teknik berbasis DNA, seperti PCR yang telah berhasil diterapkan pada identifikasi spesies kacang-kacangan (Weder, 2002), penelitian (Soares et al., 2010) telah dilakukan untuk menunjukkan penggunaan metode reaksi

PCR dalam mendeteksi DNA kedelai dan menunjukkan konsentrasi yang rendah dalam mendeteksi kedelai dalam makanan olahan dan tidak olahan, mendeteksi urutan pengkodean alergen hazelnut dalam makanan olahan (Iniesto et al., 2013) *Multiplex* PCR untuk deteksi kacang tanah dan hazelnut secara bersamaan dalam matriks makanan menggunakan metode *Multiplex* PCR (Renčová et al., 2014). Survey produk makanan komersial untuk deteksi walnut (Madrid et al., 2021) dan *real-time* PCR untuk mendeteksi jejak kacang tanah dalam makanan (Tramuta et al., 2022).

Multiplex PCR dapat secara bersamaan memperkuat dua target atau lebih dalam reaksi yang sama. *Multiplex* PCR telah berhasil diterapkan untuk identifikasi spesies dalam makanan dari berbagai asal, seperti campuran daging sapi dengan babi (López-Andreo et al., 2006), ikan (Trotta et al., 2005), dan produk makanan laut seperti kerang (Santacarla et al., 2006), ikan kerapu (Trotta et al., 2005). Selain itu, banyak penelitian telah melaporkan penggunaan *Multiplex* PCR sebagai uji skrining yang efektif dan efisien, seperti kedelai (Di Pinto et al., 2005).

Penelitian deteksi alergen kedelai menggunakan primer yang dirancang sendiri, primer merupakan potongan pendek DNA untai tunggal yang komplemen dengan urutan gen target, dan harus didesain spesifik untuk menjamin keberhasilan amplifikasi DNA (Eling KS et al., 2014). berbagai pasangan primer telah digunakan untuk mengidentifikasi alergen yang terdapat dalam kedelai dan produk olahannya. Salah satu primer yang sering digunakan adalah *Gly m Bd* 30K yang dikembangkan oleh (Torp et al., 2006) dan digunakan kembali oleh (Shin et al., 2021). Penelitian (Akai et al., 2007) menggunakan primer *Gym* 81 dan *Gym* 82 untuk mengidentifikasi kedelai dalam produk makanan olahan. Namun, primer ini memiliki keterbatasan, terutama pada makanan yang diproses secara tinggi. Penelitian (Pedersen et al., 2008) menggunakan gen lectin untuk menunjukkan adanya kedelai dalam sampel makanan, tetapi tidak dapat memberikan bukti yang cukup

kuat mengenai keberadaan alergen kedelai itu sendiri.

Penelitian (Platteau et al., 2011) menggunakan primer *Gly m Bd 28* dan *Gly Bd 30*, serta penelitian (Wang et al., 2012) *Gly m Bd 28K*, penelitian (Mandaci et al., 2015) menggunakan primer lectin, tetapi hanya berhasil mengidentifikasi tepung kedelai, krim kedelai, dan susu kedelai. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun primer lectin dapat membantu dalam identifikasi, mereka mungkin tidak seefektif primer yang lebih spesifik untuk protein alergen. Penelitian (Sovová et al., 2020) menggunakan primer lectin 118 untuk mendeteksi kedelai dalam susu sapi dan kedelai. Hasilnya menunjukkan bahwa kedelai terdeteksi dalam semua sampel yang diuji kecuali pada sampel susu sapi, meskipun ada batasan pada jenis sampel tertentu.

Oleh sebab itu, Penelitian ini bertujuan merancang primer untuk mendeteksi alergen kacang kedelai pada makanan dengan metode *Multiplex PCR*. Dalam penelitian ini, primer yang akan digunakan dalam mendeteksi kedelai mencakup *Gly m Bd 30K*, *Gly m Bd 28K*. Dengan menggunakan metode *Multiplex PCR*, hasil penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi pada pengawasan regulasi keamanan pangan serta membantu dalam pemantauan bahan alergen yang mungkin tidak dicantumkan pada label produk. Hal ini tidak hanya melindungi kesehatan konsumen, tetapi juga meningkatkan kepercayaan publik terhadap industri makanan.

1.2 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, maka tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Merancang primer yang spesifik untuk deteksi alergen kedelai
2. Menguji spesifisitas primer-primer yang telah di desain dalam mendeteksi alergen kedelai menggunakan metode *Multiplex PCR*.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan kontribusi pada pengembangan metode deteksi alergen yang lebih akurat dan efisien
2. Meningkatkan keamanan pangan produk makanan yang mengandung kedelai
3. Memberikan informasi yang berguna bagi industri pangan, regulator, dan konsumen tentang keamanan produk makanan.



BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah teknik penting dalam biologi molekuler yang digunakan untuk memperbanyak secara eksponensial urutan nukleotida tertentu melalui proses *in vitro*. Teknik ini sangat sensitif sehingga memungkinkan penggandaan bahkan dari satu molekul DNA (Fidel, 2011).

Teknologi PCR memerlukan informasi awal tentang urutan DNA tertentu yang akan diperbanyak. Informasi ini penting untuk merancang primer, yaitu oligonukleotida pendek yang memulai sintesis DNA dalam reaksi PCR. Dalam perkembangannya, metode PCR dapat digunakan untuk memperbanyak fragmen DNA dengan urutan yang belum diketahui, seperti pada metode Alu-PCR. Metode ini memanfaatkan sekuens Alu, yaitu urutan DNA berulang sepanjang genom manusia (sekitar 300 bp), sebagai dasar untuk merancang primer (Rosenthal, 1992).

Proses PCR dimulai dengan mengekstraksi DNA untai ganda dari sel, lalu mendenaturasinya menjadi untai tunggal. Komponen utama reaksi PCR meliputi (1) Primer Oligonukleotida spesifik untuk gen target, (2) Enzim Taq polymerase, yang bersifat tahan panas dan diisolasi dari *Thermus aquaticus*, (3) dNTP bahan dasar untuk sintesis DNA.

Reaksi dilakukan dalam perangkat yang disebut *thermocycler*, yang secara otomatis mengatur suhu yang diperlukan untuk proses amplifikasi. Tahapan utama dalam PCR meliputi, denaturasi (pemisahan untai ganda DNA), annealing (penempelan primer) dan ekstensi (pemanjangan primer). Ketiga tahap ini membentuk satu siklus, dan proses ini diulang berkali-kali untuk menghasilkan amplifikasi DNA secara eksponensial. Produk PCR dapat dianalisis lebih lanjut setelah dipisahkan melalui elektroforesis gel, yang kemudian divisualisasikan menggunakan pewarna seperti bromide dan sinar ultraviolet (Fidel, 2011).

2.1.1 Sejarah Penemuan Teknik PCR

Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) mengalami perkembangan pesat setelah ditemukan enzim DNA polymerase yang mampu mereplikasi DNA. Pada awalnya, teknik ini dikembangkan menggunakan fragmen Klenow DNA polymerase I dari *Escherichia coli*. Fragmen Klenow merupakan bentuk DNA polymerase yang telah kehilangan aktivitas eksonuklease. Namun, enzim ini memiliki beberapa kekurangan seperti ketidakmampuannya bertahan pada suhu tinggi, kecepatan polimerisasi yang sedang, dan tingkat prosesivitas yang rendah. Prosesivitas rendah berarti kemampuan enzim untuk secara konsisten menambahkan nukleotida ke primer tanpa terlepas dari kompleks primer-DNA template juga terbatas.

Metode PCR pertama kali diperkenalkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis, seorang peneliti di CETUS Corporation. Pada awalnya, metode ini hanya digunakan untuk memperbanyak molekul DNA. Namun, seiring waktu teknik ini dikembangkan sehingga mampu memperbanyak dan mengukur molekul mRNA. Saat ini, PCR telah menjadi alat yang sangat penting dalam manipulasi dan analisis genetik.

Salah satu keunggulan utama PCR adalah sensitivitasnya yang tinggi, memungkinkan teknik ini untuk memperbanyak bahkan hanya satu molekul DNA. Metode ini sering digunakan untuk mengisolasi gen-gen unik dari kumpulan sekuens genom. PCR dapat melipat gandakan fragmen DNA (110 bp, 5×10^9 mol) hingga 200.000 kali hanya dalam 20 siklus selama 220 menit, menunjukkan efisiensi luar biasa dalam memperbanyak DNA. Keunggulan lain dari PCR adalah kebutuhan komponen yang minimal. Sebagai contoh, DNA cetakan (template) hanya memerlukan sekitar 5 μ g, oligonukleotida hanya sekitar 1 mM, dan reaksi dapat dilakukan dalam volume kecil sekitar 50-100 μ L (Mullis & Faloona, 1987).

2.1.2 Prinsip Dasar PCR

Proses PCR melibatkan 4 komponen utama, yaitu (1) DNA template, fragmen DNA yang akan digandakan, (2) primer, segmen pendek DNA sintetis yang spesifik terhadap daerah target DNA yang terdiri dari primer *forward* dan *reverse*, (3) dNTPs, meliputi dATP (*deoxyadenosine triphosphate*), dTTP (*deoxythymidine triphosphate*), dCTP (*deoxycytidine triphosphate*), dan dGTP (*deoxyguanosine triphosphate*) yang menjadi bahan baku sintesis rantai DNA baru, (4) DNA polymerase, enzim tahan panas yang memperpanjang rantai DNA dengan menambahkan nukleotida pada ujung 3' primer, (5) Buffer, untuk menjaga kondisi pH, ion, magnesium untuk aktivitas DNA polymerase, (6) Tabung PCR (Handoyo & Rudiretna, 2001).

Proses PCR terdiri dari tiga tahap, yaitu denaturasi, annealing, dan amplifikasi. Pada tahap denaturasi, suatu fragmen DNA (*double strand*) dipanaskan pada suhu 95 °C selama 1-2 menit sehingga akan terpisah menjadi rantai tunggal (*singlestrand*). Kemudian dilakukan annealing pada suhu 55°C selama 1-2 menit, yakni oligonukleotida primer menempel pada DNA cetakan yang komplementer dengan sekuen primer. Setelah dilakukan penempelan, suhu dinaikkan menjadi 72°C selama 1,5 menit. Pada suhu ini, enzim DNA polymerase akan melakukan proses polimerasi, yaitu rantai DNA yang baru akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan. Proses ini disebut amplifikasi (Yuwono, 2006).

1. Denaturasi DNA template

Pada tahap ini, DNA yang berbentuk untai ganda akan terbuka menjadi dua untai tunggal. Proses ini terjadi akibat suhu denaturasi yang tinggi, yang menyebabkan putusnya ikatan hidrogen antara basa-basa komplemen. Denaturasi biasanya dilakukan pada suhu sekitar 95 °C selama 3 menit untuk memastikan seluruh molekul DNA target terurai menjadi untai tunggal. Pada denaturasi berikutnya, waktu yang diperlukan lebih

singkat, yaitu 30 detik pada suhu 95 °C atau 15 detik pada suhu 97°C (Harisah, 2017).

Suhu denaturasi dipengaruhi oleh susunan basa DNA target. Jika DNA target memiliki kandungan basa G-C yang tinggi, diperlukan suhu yang lebih tinggi karena pasangan G-C memiliki ikatan hidrogen yang lebih kuat dibandingkan pasangan A-T. Namun, suhu denaturasi yang terlalu tinggi atau waktu yang terlalu lama dapat mengurangi atau bahkan merusak aktivitas enzim *Taq* polymerase (Harisah, 2017).

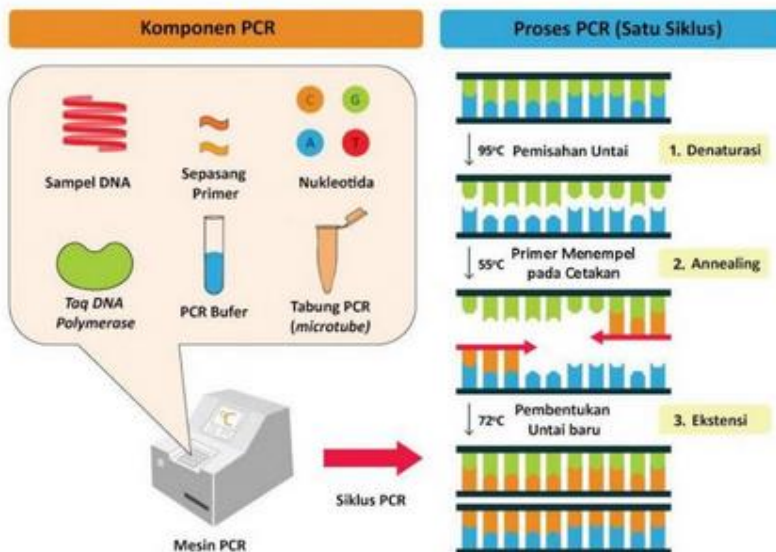
2. Penempelan (*annealing*)

Primer akan menempel pada bagian spesifik dari DNA yang memiliki urutan komplemen dengan primer tersebut. Pada tahap annealing ini, ikatan hidrogen terbentuk antara primer dan template DNA. Setelah itu, enzim *taq* DNA polymerase akan berikatan dengan kompleks tersebut, sehingga ikatan hidrogen menjadi sangat kuat dan stabil. Tahap ini biasanya berlangsung pada suhu 50-60 °C. Spesifisitas PCR sangat bergantung pada suhu melting (T_m) primer, yaitu suhu di mana separuh dari primer berhasil menempel pada template DNA. Temperatur annealing yang digunakan biasanya 5°C lebih rendah dari T_m . Rumus untuk menghitung T_m adalah : $T_m = 4^{\circ}\text{C} \times (G + C) + 2^{\circ}\text{C} \times (A + T)$. Semakin panjang urutan primer, semakin tinggi suhu melting-nya.

3. Pemanjangan (*extension*)

Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'-nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan template oleh DNA polymerase. Umumnya reaksi polymerase (*ekstension*) atau perpanjangan rantai, terjadi pada suhu 72°C karena merupakan suhu optimum *Taq* polymerase. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut 72 °C diperkirakan antara 35 sampai 100 nukleotida per detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian, untuk produk PCR sepanjang 2000 pasang basa,

waktu 1 menit sudah lebih cukup untuk tahap pemanjangan primer ini.



Gambar 1. Proses dan Komponen PCR (B. Mahajan, 2019)

2.2 Primer

Primer PCR adalah sekuens pendek DNA beruntai tunggal yang berfungsi sebagai titik awal bagi DNA polimerase untuk memulai sintesis DNA. Primer biasanya terdiri dari sekita 20-30 nukleotida dan dirancang untuk menempel secara spesifik pada urutan target DNA yang akan diamplifikasi. Dalam reaksi PCR, sepasang primer digunakan satu primer menempel pada untai sense dan primer lainnya pada untai antisense dari DNA target. Setelah primer menempel, DNA polimerase memperpanjang primer tersebut dengan menambahkan nukleotida yang komplementer dengan template DNA, sehingga menghasilkan salinan dari segmen DNA target (Marmioli & Maestri, 2007).

Pasangan primer terdiri dari Hasil analisis BLAST *primer forward* dan *reverse primer*. Perancangan pasangan primer dapat

dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah ditentukan. Hal – hal yang harus diperhatikan dalam penentuan kriteria perancangan pasangan primer sebagai primer adalah sebagai berikut (Pradnyaniti et al., 2013).

1. Panjang Primer

Umumnya panjang primer berkisar 18 – 30 basa. Primer dengan panjang yang kurang dari 18 basa akan menyebabkan spesifisitas primer menjadi rendah dan dapat memungkinkan terjadinya *mispriming* (penempelan primer di tempat yang tidak diinginkan), sedangkan panjang primer yang lebih dari 30 basa akan meningkatkan spesifisitas primer secara efektif.

2. Melting Temperature (T_m)

Melting temperature (T_m) merupakan suhu dimana separuh untaian ganda DNA terpisah. Umumnya T_m yang digunakan berkisar 50 – 65 °C.

3. Komposisi G + C

Komposisi G + C merupakan banyaknya guanin dan sitosin dalam suatu primer, sebaliknya komposisi G + C berada pada rentang 40 – 60%. Primer dengan komposisi G + C yang rendah dapat menurunkan efisiensi proses PCR sehingga primer tidak mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada DNA *template GC clamp*.

GC clamp merupakan jumlah basa G dan C yang terdapat pada 5 basa terakhir. Komposisi *GC clamp* ada ujung 3' sebaliknya tidak lebih dari 3 basa G atau C karena dapat menurunkan spesifisitas primer dan sangat membantu terjadinya stabilitas ikatan antara primer dengan DNA *template* yang diperlukan untuk inisiasi *polymerase* DNA pada proses PCR.

3. Primer Secondary Structures

(a) *Hairpins*, interaksi intramolekuler dalam primer. *Hairpins* dalam primer dapat mengganggu proses penempelan primer pada DNA *template* dalam proses PCR, (b) *Self dimer*, ikatan yang terbentuk antar primer sejenis baik antar *forward – forward*

maupun *reverse – reverse*, (c) *Cross dimer*, ikatan yang terbentuk antar pasangan primer yaitu ikatan antar *forward* dan *reverse*.

4. *Repeats*

Primer sebaiknya tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa dan maksimum pengulangan 2 basa sebanyak 4 kali masih dapat ditoleransi. Contoh : GCGCGCGC.

5. *Run*

Penentuan *run* dilakukan dengan menghitung jumlah pengulangan basa sejenis dalam primer dengan ketentuan pengulangan tidak boleh lebih dari 5 basa. Contoh : CCCCCC. Untuk mendapatkan skrining sekuen yang potensial dan homolog, rancangan primer ditetapkan dengan menggunakan perangkat lunak seperti Oligo (National Biosciences, Plymouth, NC) atau situs pencarian online seperti BLAST (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Namun, primer PCR juga dapat homopolimer misalnya oligo (dT) yang sering digunakan untuk mengawali proses PCR RNA (Yusuf, 2010). Spesifisitas PCR sangat tergantung pada suhu melting (T_m) primer, yaitu suhu dimana suhu dimana separuh jumlah primer annealing pada Template. T_m kedua primer serupa dalam (2-4°C) dan diatas 60°C. Konsentrasi primer biasanya optimal pada 0,1-0,5 μM . Konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan menyebabkan mispriming (penempelan pada tempat yang tidak spesifik) dan akumulasi produk non spesifik serta meningkatkan kemungkinan terbentuknya primer-primer. Sebaliknya, bila konsentrasi primer terlalu sedikit maka PCR menjadi tidak efisien sehingga hasilnya rendah.

2.3 Senyawa alergen pada kedelai

Senyawa alergen pada tanaman merupakan komponen bioaktif yang dapat memicu respons imun tubuh pada individu yang sensitif. Senyawa yang sering bersifat alergen adalah glikoprotein yang larut dalam air dengan berat molekul antara 10-70 KDa. Alergi

dapat memicu gejala ringan seperti gatal-gatal, hidung, dan mata berair, dan pembengkakan. Alergi dapat juga menimbulkan reaksi yang cukup berat seperti anafilaksis yang bisa menyebabkan kematian. Senyawa alergen ini banyak ditemukan dalam berbagai bagian tanaman, seperti serbuk sari, buah, biji, dan lateks. Identifikasi, pengolahan, dan pelabelan bahan pangan yang mengandung alergen merupakan aspek penting dalam memastikan keamanan pangan, khususnya bagi kelompok populasi yang rentan (Suseno et al., 2017).

Kedelai mengandung beberapa senyawa protein yang dikenal dapat memicu reaksi alergi pada individu yang sensitif. Studi immunoglobulin spesifik alergen IgE mengungkapkan 15 protein alergenik kedelai. Empat diantaranya diidentifikasi sebagai alergen utama, seperti Gly m 5 (beta-conglycinin), Gly m 6 (glycinin) *Gly m Bd* 28K (26kDa glikoprotein) dan *Gly m Bd* 30K (peptidase C1). Selain itu, terdapat protein pertahanan seperti profilin yang menyebabkan reaksi silang dengan alergen dari serbuk sari atau legum lainnya, dan lipid transfer protein (LTP) yang bisa tahan terhadap panas, enzim, dan pH ekstrem, sehingga berpotensi memicu alergi. Stabilitas protein alergenik ini terhadap proses pengolahan pangan menjadikan mereka tantangan dalam industri makanan, terutama dalam pengembangan produk berbasis kedelai yang aman bagi konsumen dengan alergi (Holzhauser et al., 2009).

Menurut beberapa penelitian (Candрева et al., 2015; Murakami et al., 2018; Tsai et al., 2017) *Gly m Bd* 30K, *Gly m Bd* 28K, dan Gly m 5 tergolong alergen utama kedelai. Sebaliknya (Holzhauser et al., 2009; Lu et al., 2018) hanya mengenali Gly m 5 dan Gly m 6 sebagai alergen kedelai yang relevan secara klinis dan mengklarifikasikan *Gly m Bd* 39K, *Gly m Bd* 28K, lectin dan lipoksigenase sebagai alergen dugaan saja. Penelitian (Kern et al., 2019) menggambarkan semua alergen imunodominan yang berpotensi termasuk Gly m 5, Gly m 6, *Gly m Bd* 30K, *Gly m Bd* 28K, dan Gly m 4 sebagai alergen utama dari kedelai. Perbedaan

jumlah protein kedelai dengan sifat alergenik dapat dikaitkan dengan berbagai faktor. Beberapa penelitian hanya menghitung protein yang dirakit sebagai alergen, khususnya dalam kasus Gly m 5 dan Gly m 6. Studi telah mengklasifikasi alergen sebagai utama atau minor dapat bervariasi tergantung pada populasi yang diteliti dan metode yang digunakan untuk identifikasi.

Senyawa-senyawa seperti *Gly m Bd 30K* dan *Gly m Bd 28K* termasuk dalam kategori alergen utama karena stabilitasnya, kemampuan untuk berikatan dengan antibody IgE, serta prevalensinya dalam produk kedelai. Sementara itu, lectin dan EPSPS juga dapat berkontribusi terhadap reaksi alergi, meskipun mekanisme dan prevalensinya berbeda dari dua protein utama. Mekanisme dari lectin yaitu dapat berikatan dengan karbohidrat dan juga ditemukan dalam kedelai. Meskipun tidak sekuat *Gly m Bd 30K* dan *Gly m Bd 28K* dalam hal reaktivitas IgE, lectin dapat mempengaruhi sistem imun dan berkontribusi terhadap reaksi alergi pada beberapa individu. EPSPS adalah enzim yang terlibat dalam jalur biosintesis asam amino aromatik. Meskipun perannya sebagai alergen kurang dipahami dibandingkan dengan protein utama lainnya, penelitian menunjukkan bahwa EPSPS juga dapat memicu respons imun pada individu tertentu.

2.3.1 *Gly m Bd 30K* (Glycinin)

Gen target primer seperti *Gly m Bd 28K*, *Gly m Bd 30K*, Lectin, dan *epsps* (Kutateladze et al., 2021) menunjukkan bahwa penerapan metode tersebut dapat digunakan untuk pengujian alergen dalam produk makanan. Primer *Gly m Bd 30K* untuk metode PCR pertama kali digunakan dalam penelitian yang melibatkan cloning dan ekspresi genetik dari protein tersebut pada tahun 1990-an. Penelitian (Ogawa et al., 1993) menggunakan teknik *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) untuk mengklon genom lengkap alergen *Gly m Bd 30K* dari kedelai dan mendesain spesifik primer untuk analisis urutan

nukleotida. Pasangan primer 30K129f, 30K122f dan 30K118f menargetkan gen *Gly m Bd* 30K fragmen 129bp, 118bp, 122bp.

2.3.2 *Gly m Bd* 28K (Glycinin)

Gly m Bd 28K salah satu alergen utama yang ditemukan dalam kedelai dan berperan signifikan dalam reaksi alergi pada individu sensitif. Untuk mendeteksi gen *Gly m Bd* 28K, primer spesifik dirancang berdasarkan urutan gen tersebut. Penelitian yang dipublikasikan dalam *Advanced Materials Research* mengembangkan primer spesifik berdasarkan gen *Gly m Bd* 28K untuk mendeteksi jejak alergen kedelai dalam berbagai makanan. Metode ini berhasil diterapkan pada berbagai produk makanan, menunjukkann keandalannya dalam mendeteksi alergen kedelai (Wang et al., 2012).

2.4 Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu cara untuk memisahkan fraksi suatu campuran berdasarkan pergerakan partikel koloid yang bermuatan dibawah pengaruh medan listrik. Cara elektroforesis telah digunakan untuk analisa virus, asam nukleat, enzim, protein, sera molekul-molekul organik dengan berat molekul rendah seperti asam amino.

Elektroforesis gel didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyanggah matriks stabil dibawah pengaruh medan listrik. Ada dua jenis gel yang sering digunakan untuk proses elektroforesis yaitu gel agarose dan gel poliakrilamid. Kedua gel ini digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen-fragmen DNA (Muladno, 2010) . Molekul DNA termasuk senyawa yang bermuatan negatif. Sifat ini menjadikan molekul DNA yang ditempatkan pada medan listrik akan bermigrasi menuju kutub positif. Mobilitas fragmen DNA pada gel elektroforesis sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor (Sambrook, J. and Russell, 2001).

1. Ukuran molekul DNA

Migrasi DNA terutama ditentukan oleh ukuran panjang DNA. Fragmen DNA yang berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan fragmen DNA yang berukuran lebih besar. Sehingga elektroforesis mampu memisahkan fragmen berdasarkan ukuran panjangnya.

2. Konsentrasi Agarosa

Gel dengan konsentrasi rendah memiliki pori-pori besar, cocok untuk molekul besar. Sedangkan gel dengan konsentrasi tinggi memiliki pori-pori kecil, cocok untuk molekul kecil.

Tabel 1. Konsentrasi Gel Agarosa

Konsentrasi Agarosa (%)	Efisiensi Pemisahan DNA (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Sumber : (Muladno, 2010)

3. Konfirmasi DNA

Konfirmasi atau bentuk rangkaian model DNA berukuran sama akan bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda. DNA dalam bentuk sirkular akan lebih cepat bermigrasi dibandingkan dengan DNA bentuk linier.

4. Voltase yang Digunakan

Tegangan tinggi mempercepat pergerakan molekul, jika terlalu tinggi gel bisa panas dan rusak. Tegangan rendah akan

memperlambat pergerakan tetapi memberikan hasil pemisahan lebih rapi.

5. Etidium Bromida

Keberadaan etidium bromide didalam gel dapat mengakibatkan pengurangan tingkat kecepatan migrasi molekul linier sebesar 15 %.

6. Komposisi Larutan Buffer

Proses migrasi DNA pada saat elektroforesis tidak lepas dari adanya kekuatan ion. Apabila tidak ada kekuatan ion di dalam larutan, maka aliran listrik akan sangat minimal dan migrasi DNA sangat lambat. Apabila larutan buffer berkekuatan ion tinggi dapat meningkatkan panas sehingga aliran listrik menjadi sangat maksimal dan memungkinkan gel akan meleleh dan DNA dapat mengalami denaturasi. Konsentrasi larutan buffer yang dapat dibuat yaitu TAE 1x atau TBE 0,5x.

Sebelum proses elektroforesis, dilakukan pencampuran antara DNA dengan *loading dye*. *Loading dye* terdiri dari glyserol, bromphenol blue, dan xylene cyanol FF. Pewarna yang sering digunakan adalah etidium bromide. Etidium bromida akan menginterkalasi pada ikatan hidrogen DNA sehingga pita DNA akan terlihat dibawah sinar ultraviolet (Yuwono, 2006). Pita DNA yang berpendar pada gel agarose menunjukkan hasil positif bahwa terdapat DNA pada setiap lajur. Larutan etidium bromide sangat berbahaya dan bersifat karsinogen. Oleh karena itu, semua larutan yang mengandung etidium bromide harus didekontaminasi sebelum dibuang.

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Universitas Andalas. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni-Juli 2025.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, rak tube, thermal cycler (CLEAVER GTC96S), rak tabung, Nanophotometer (IMPLEN Nanophotometer®NP80), *hot plate magnetic stirrer (Daihan Labtech co.,LTD)*, Accuris MyGel Mini Electrophoresis, iBright CL1500 Imaging System, Dry block thermostat (Bio TDB-100), Microsentrifuge Refrigerator Tube 1,5 dan 2 ml(Hanil), Mini sentrifuge PCR/Spindown. Mikropipet 0.5-10µl (cleaver), Mikropipet 2-20µl (cleaver), Mikropipet 10-100 µl (cleaver), Mikropipet 20-200 µl (cleaver), Mikropipet 100-1000 µl (cleaver), Mikrotip 10 µl, 20 µl (cleaver), vortex (biosan).

3.2.2 Bahan

Tiagen kit, primer, tiagen *Multiplex PCR Master Mix* (providing a final concentration of 3 mM $MgCl_2$, 3 x 0.85 ml), 5x Q-Solution (1 x 2.0 ml), RNase-Free Water (2 x 1.7 ml). Kontrol positif bahan yang digunakan adalah kedelai, kontrol negatif bahan yang digunakan Jagung, Gandum, dan Kacang Tanah.

3.3 Rancangan Penelitian

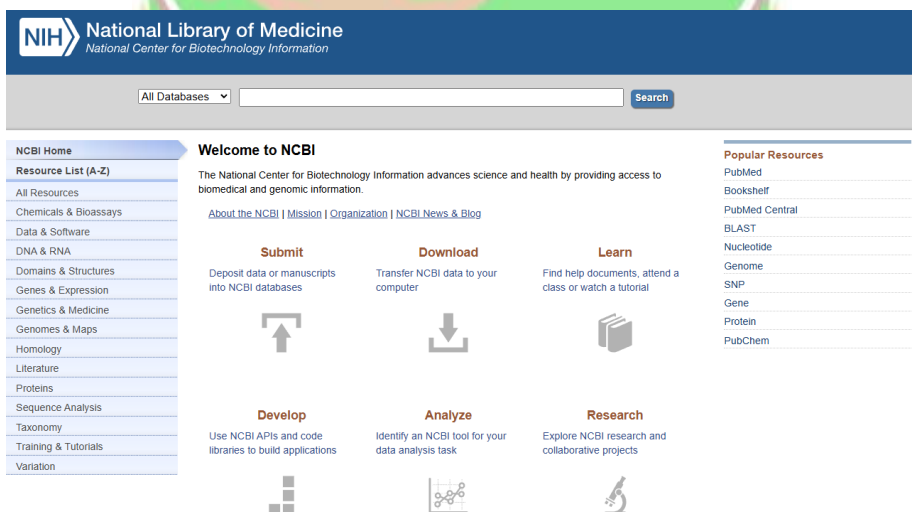
3.3.1 Preparasi Sampel

Siapkan sampel sebanyak 0,5 gram. Masukkan sampel ke dalam mortar, lalu tuangkan nitrogen cair secara perlahan ke dalam mortar, biarkan sampel terendam sepenuhnya hingga membeku dan menjadi rapuh. Giling produk dengan cepat hingga mencapai

tekstur yang diinginkan. Setelah proses homogenisasi selesai, segera gunakan sampel sesuai kebutuhan. Jika perlu disimpan, tempatkan dalam wadah yang kedap udara dan kedap air dan simpan pada suhu -20°C untuk mempertahankan kualitas.

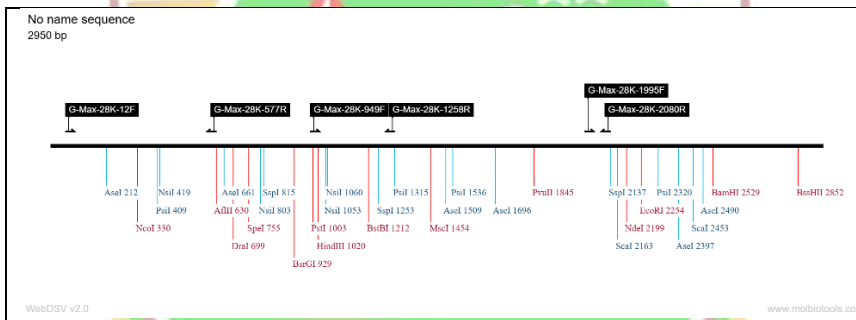
3.3.2 Rancangan Primer

Buka situs <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, lalu unduh urutan DNA dari kedelai yaitu *Gly m Bd 30 K* dan *Gly m Bd 28 K*, masukkan urutan DNA ke <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, klik Get Primers, buka NCBI BLAST https://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi?PROGRAM=BLASTn&BLAST_SPEC=GeoBLAST&PAGE_TYPE=BLASTSearch, masukkan primer ke kolom akses, klik BLAST, tinjau kecocokan dari primer dengan target DNA yang digunakan. Dalam hasil primer perlu diperhatikan Primer ideal memiliki panjang 18–25 basa, kandungan GC 40–60%, dan GC clamp di ujung 3' (C/G pada dua basa terakhir) untuk stabilitas amplifikasi. Suhu leleh (T_m) optimal adalah $55\text{--}65^{\circ}\text{C}$, dengan perbedaan T_m antara primer *forward* dan *reverse* maksimal 5°C . Gambar situs NCBI dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 2.

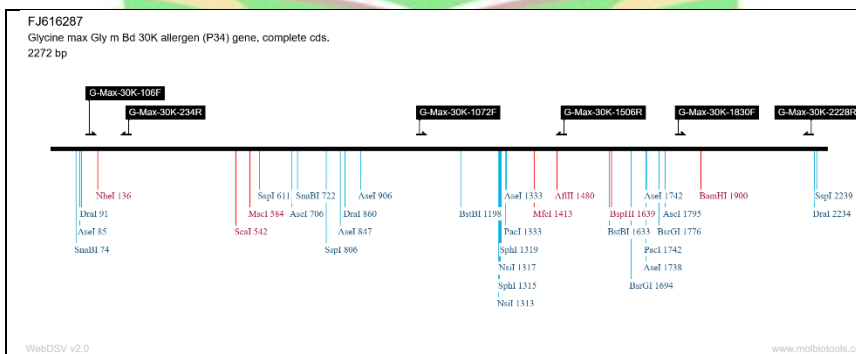


Gambar 2. Situs NCBI

Desain primer dilakukan secara *in silico* menggunakan sekuens gen *Gly m Bd* 28K dan 30K dengan masing-masing panjang 2950bp dan 2272bp yang diperoleh dari basis data NCBI. WebDSV. Untuk memverifikasi posisi dan arah pasangan primer pada sekuens DNA target, digunakan WebDSV melalui visualisasi ini, primer *forward* dan *reverse* dapat dipetakan pada sekuens mitokondria spesies target untuk memastikan bahwa keduanya berada dalam arah yang berlawanan dan membentuk produk amplifikasi dengan ukuran yang sesuai. WebDSV juga membantu memastikan bahwa primer tidak saling tumpang tindih atau berada di luar wilayah gen target. Adapun Gambar visualisasi posisi primer dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. WEBDSV Gly 28K



Gambar 4. WEBDSV Gly 30K

Hasil analisis pada Gambar 3 dan 4 menunjukkan bahwa setiap primer menempel pada lokasi yang berbeda dan saling berpasangan dengan arah yang sesuai untuk mengamplifikasi gen target. Tidak adanya penempelan primer di luar sekuens target pada peta gen tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa primer akan menempel secara tepat sesuai rancangan.

Penempatan primer yang spesifik pada gen target kedelai penting untuk menjamin keberhasilan amplifikasi gen *Gly m Bd* 28K dan 30K. Dengan posisi primer yang tidak tumpang tindih maupun menempel diluar target, risiko amplifikasi non-spesifik dapat diminimalkan. Gambar ini juga memperkuat bahwa rancangan primer diarahkan secara selektif hanya pada gen target, sehingga konsisten dengan tujuan deteksi spesifik pada kedelai. Genbank Primer *Gly m Bd* 28k dan *Gly m Bd* 30k dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rancangan Primer *Gly m Bd* 28k dan *Gly m Bd* 30k

nama primer	sequence	gene target	amplicon size	No. Akses
18s-3193-f	tga tta aca ggg aca gtc gg			
18s-3193-r	acg gta tct gat cgt ctt cg			
g-max-28k-12f	tct cat cat att cat ccg tag agg t	<i>Gly m</i> <i>Bd</i> 28k	565bp	EU4934 57.1
g-max-28k-577r	ggg gct gtc tct tgg tgt tt	<i>Gly m</i> <i>Bd</i> 28k		
g-max-28k-949f	tgc agc att gac ccc tct ac	<i>Gly m</i> <i>Bd</i> 28k	309 bp	
g-max-28k-1258r	atg att tct gat tgg acc aga gag t	<i>Gly m</i> <i>Bd</i> 28k		

g-max-28k-1995f	act gca tgg agg cga gta tc	Gly m Bd 28k	85bp	
g-max-28k-2080r	gga cat gtt tgc ata ccg ct	Gly m Bd 28k		
g-max-30k-1072f	cca cgg gag cca tag aag c	Gly m Bd 30k	434bp	FJ6162 87.1
g-max-30k-1506r	att ggt tgc tca agg atg gc	Gly m Bd 30k		
g-max-30k-1830f	gcg gat ggt gta gat tac tg	Gly m Bd 30k	398bp	
g-max-30k-2228r	cat gca aga gag gag gca tgg	Gly m Bd 30k		
g-max-30k-106f	gct acg agg gaa ctt ctt cag t	Gly m Bd 30k	128bp	
g-max-30k-234r	agg aaa ccc ata act tgg tgg a	Gly m Bd 30k		

3.3.3 Isolasi DNA

Proses isolasi DNA menggunakan Plant Genomic DNA kit (Tiangen) dimulai dengan memasukkan 100 g berat basah sampel tanaman kemudian dihaluskan menggunakan mortar dan pestle dengan ditambahkan 700 μ L larutan GP1. Setelah halus, sampel dimasukkan ke dalam microtube steril dan diinkubasi pada suhu 65 C selama 20 menit. Selama inkubasi aduk rata sampel dengan

membalik tabung selama beberapa kali. Setelah inkubasi selesai, ditambahkan 700 μL kloroform, lalu homogenkan dengan membalik tabung beberapa kali, kemudian sentrifus selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm. selanjutnya pipet supernatan ke dalam microtube steril baru, tambahkan 700 μL larutan GP2, homogenkan dengan membalik tabung beberapa kali. Dipipet campuran supernatan dan GP2 ke dalam spin column dan sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 12.000 rpm, buang cairan yang ada pada collection tube dan tempatkan kembali spin column pada collection tube, lakukan sampai campuran tersebut habis. Setelah itu ditambahkan 500 μL GD buffer ke dalam spin column dan sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 12.000 rpm, buang cairan yang ada pada collection tube dan tempatkan kembali spin column pada collection tube. Setelah itu ditambahkan 600 μL PW buffer ke dalam spin column dan sentrifus selama 30 detik pada kecepatan 12.000 rpm, buang cairan yang ada pada collection tube dan tempatkan kembali spin column pada collection tube (proses ini dilakukan dua kali). Kemudian sentrifus kering selama 2 menit pada kecepatan 12.000 rpm, setelah selesai buka tutup spin column dan biarkan pada suhu ruang untuk beberapa saat untuk mengeringkan membran dengan sempurna. Selanjutnya spin column ditempatkan pada microtube steril baru dan ditambahkan 50 μL Buffer TE dan di inkubasi selama 2-5 menit pada suhu ruang dan sentrifus selama 2 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Akhirnya, konsentrasi DNA yang dihasilkan diukur menggunakan alat Nanofotometer untuk memastikan keberhasilan proses isolasi dengan melihat hasil absorbansi, konsentrasi dan validasi dengan metode lain.

3.3.4 Uji Spesifisitas

Uji spesifisitas dilakukan untuk memastikan bahwa primer yang telah dirancang benar-benar dapat menempel secara spesifik pada DNA target dari kedelai, gandum, kacang tanah dan jagung.

Pengujian ini dilakukan dengan dua tahapan, yaitu Singleplex PCR dan Multiplex PCR. Pada tahap Singleplex PCR, setiap primer diuji secara terpisah terhadap DNA dari masing-masing spesies untuk melihat apakah primer hanya menghasilkan pita DNA pada spesies targetnya dan sesuai dengan target ukuran amplicon target desain. Primer yang menunjukkan hasil paling spesifik dan tidak menimbulkan amplifikasi silang (non-target amplification) kemudian digunakan pada tahap Multiplex PCR, yaitu pengujian yang melibatkan beberapa pasangan primer dengan hasil isolasi DNA secara bersamaan dalam satu reaksi PCR.

1. Pengujian Singleplex PCR

Pada pengujian ini amplifikasi dilakukan dengan 1 pasang primer terhadap 1 hasil isolasi DNA dalam 1 tube

Komponen yang digunakan sebelum dilakukan PCR:

Tabel 3. Komponen singleplex PCR

Komponen	Volume (μL)	Keterangan
DreamTaq	2X	Sesuai protokol: 1x
Master Mix	25	reaksi
Forward primer (10 μM)	5	Konsentrasi akhir: 1.0 μM
Reverse primer (10 μM)	5	Konsentrasi akhir: 1.0 μM
Template DNA (1 ng/ μL)	1	Konsentrasi akhir: 1.0 ng
Nuclease-free water	14	Untuk mencapai total 50 μL
	50	Total volume

2. Pengujian Multiplex PCR

Primer yang menunjukkan spesifisitas tinggi pada uji Singleplex PCR kemudian digunakan kembali pada pengujian Multiplex PCR. Kriteria primer dengan spesifisitas tinggi adalah primer yang mampu mengamplifikasi gen target dengan ukuran fragmen yang sesuai dengan hasil yang diharapkan, sebagaimana terlihat pada pita hasil elektroforesis. Pada tahap uji spesifisitas ini, semua primer yang memenuhi kriteria tersebut kemudian dicampurkan bersama dengan DNA hasil isolasi dari kedelai, gandum, jagung, dan kacang tanah. Dalam reaksi Multiplex PCR, primer spesifik tersebut dimasukkan ke dalam satu tabung reaksi (tube) yang sama, bersama dengan campuran DNA dari ketiga spesies ikan, untuk menguji kemampuan primer dalam mendeteksi masing-masing spesies secara simultan.

Tabel 4. Komponen Multiplex PCR

Komponen	Volume (μL)	Keterangan
DreamTaq 2X Master Mix	25	Sesuai protokol: 1x reaksi
Forward primer	15	Gabungan dari semua primer forward (<i>Gly m bd</i> 28k dan 30k).
Reverse primer	15	Gabungan dari semua primer reverse (<i>Gly m bd</i> 28k dan 30k).
Template DNA (1 ng/μL)	3	Masing-masing 1 μL dari tiga spesies, konsentrasi 1 ng/μL
Nuclease-free water	2	Untuk mencapai total 60 μL
	60	Total volume

Settingan siklus termal pada mesin thermal cycler :

Tabel 5. Settingan Mesin Thermal Cycler

Langkah	Temperature (°C)	Waktu (s)	Jumlah Siklus
1.Initial denaturation	95	60	1
2. Denaturation	95	30	30
3. Anneling	60	30	30
4. Extension	72	60	30
5.FinalExtension	72	300	1

Apabila hasil uji spesifisitas tidak menunjukkan amplifikasi yang sesuai dengan ukuran target, maka dapat dilakukan proses optimasi dengan cara menurunkan konsentrasi primer. Pada reaksi Multiplex PCR, penggunaan beberapa pasang primer secara bersamaan dapat menyebabkan terjadinya kompetisi antar primer dalam berikatan dengan cetakan DNA (template) maupun dalam memanfaatkan enzim DNA polimerase. Oleh karena itu, penyesuaian konsentrasi primer diperlukan untuk memperoleh amplifikasi yang seimbang dan hasil yang spesifik sesuai dengan target gen yang diinginkan.

3.3.5 Uji Sensitivitas Multiplex PCR

Uji Sensitivitas dilakukan untuk menentukan konsentrasi DNA terendah yang masih dapat dideteksi oleh primer spesifik. Tahapan ini bertujuan untuk mengetahui batas deteksi (*limit of detection*) dari sistem PCR yang digunakan. Penurunan konsentrasi DNA dilakukan melalui proses pengenceran bertingkat (*serial dilution*) dengan terlebih dahulu menyiapkan DNA working solution agar memudahkan proses pemipetan dan menjaga konsistensi hasil. Pengenceran dilakukan menggunakan rumus:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Rumus tersebut digunakan untuk menghitung volume larutan stok (V_1) yang dibutuhkan agar diperoleh larutan baru dengan konsentrasi (C_2) dan volume akhir (V_2) tertentu.

- C_1 = konsentrasi awal (larutan stok DNA)
- V_1 = volume larutan stok yang diambil
- C_2 = konsentrasi yang diinginkan (hasil pengenceran)
- V_2 = volume total larutan setelah diencerkan

Tabel 6. Pembuatan DNA Working Solution

Konsentrasi akhir (ng/ μ L)	Sumber DNA	Volume DNA (μ L)	Volume nuclease-free water (μ L)	Total volume (μ L)	Keterangan
0,1	DNA 1 ng/ μ L	-	-	-	Sudah tersedia dari pengenceran sebelumnya
0,01	DNA 1 ng/ μ L	0,5	49,5	50	Pengenceran besar dari DNA induk
0,001	DNA 1 ng/ μ L	0,5	499,5	500	Pengenceran besar dari DNA induk

Lalu pada Komposisi reaksi PCR pada uji sensitivitas sebagai berikut :

Tabel 7. Komponen Sensitivitas Multiplex PCR

Komponen	Volume (μL)	Keterangan
DreamTaq 2X Master Mix	25	Sesuai protokol: 1x reaksi
Multiplex primer K- Pel ($10 \mu\text{M}$)	5	Campuran primer forward dan reverse spesifik K. pelamis
DNA working solution ($1 \text{ ng}/\mu\text{L}$)	3	Masing-masing $1 \mu\text{L}$ dari konsentrasi 0.1 , 0.01 , dan $0.001 \text{ ng}/\mu\text{L}$
Nuclease-free water	17	Untuk mencapai total $50 \mu\text{L}$
	50	Total volume

3.3.6 Elektroforesis

Gel agarose ditimbang sebanyak $0,8292 \text{ gram}$ (Biorad) dalam 40 ml Tris Borate EDTA (TBE). Selanjutnya ditambahkan $4 \mu\text{l}$ SYBR safe dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir. Setelah memadat (30 menit), gel kemudian dimasukkan ke dalam mesin elektroforesis yang berisi larutan TBE $0,5x$. Selanjutnya $2 \mu\text{l}$ DNA sampel hasil PCR yang telah dicampur dengan cairan “loading dye (4 gram sukrosa ditambahkan 25 mg bromphenol blue dalam 10 mm air)”. Elektroforesis dijalankan pada 500 mA , 100 volt , selama 60 menit kemudian diamati.

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan analisis deteksi alergen kacang kedelai pada produk olahan makanan dengan menggunakan *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (MPCR). Hasil analisis didapat melalui beberapa tahap diantaranya isolasi DNA, sensitifitas *Multiplex* PCR dan spesifisitas *Multiplex* PCR, amplifikasi DNA, dan elektroforesis.

4.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan tahapan awal yang penting dalam analisis molekuler untuk memperoleh DNA genom berkualitas dari jaringan tumbuhan. Pada penelitian ini, isolasi DNA dilakukan menggunakan tiangen kit, yang dirancang untuk mengekstraksi DNA dari jaringan tumbuhan secara cepat dan efisien. Prosedur dilakukan sesuai protokol standar dari kit, yang meliputi tahapan pelisisan sel, pengikatan DNA ke membran kolom, pencucian dan elusi DNA murni. Konsentrasi Absorbansi Sampel DNA dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 8. Konsentrasi Absorbansi Sampel

Sampel	Rasio absorbansi A260/A280	Rasio Absorbansi A260/A230	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)
Kedelai	1,936	3,030	45.600
Jagung	1,812	4,117	21.200
Gandum	1,843	2,698	76.500
Peanut	1,839	3,555	42.300

Berdasarkan hasil pada Tabel 3, sampel kedelai, jagung, gandum dan kacang tanah menunjukkan rasio A260/A280 yang berada dalam kisaran ideal, yakni antara 1,821 hingga 1,936. Hal ini menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi dari seluruh sampel

memiliki kemurnian yang baik, bebas dari kontaminasi protein yang signifikan.

Kualitas hasil DNA dievaluasi menggunakan NanoPhotometer dengan mengukur nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Panjang gelombang 260 nm merupakan titik maksimum penyerapan cahaya oleh asam nukleat (DNA/RNA), sedangkan 280 nm menunjukkan absorbansi protein. Oleh karena itu, rasio A260/A280 digunakan sebagai indikator kemurnian DNA. Menurut standar literatur (Sambrook, J. and Russell, 2001), nilai rasio A260/A280 yang ideal berada dikisaran 1,8-2,0 yang menandakan DNA murni dan sedikit mengandung protein.

Isolat DNA dari semua sampel dinyatakan layak digunakan pada tahap selanjutnya yaitu amplifikasi menggunakan PCR karena telah memenuhi standar kemurnian dan konsentrasi yang sesuai. Keberhasilan tahap ini menjadi faktor penentu utama dalam menjamin keakuratan dan sensitivitas reaksi PCR, karena kontaminan seperti protein atau fenol dapat menghambat kerja enzim taq polimerase yang berfungsi untuk memperbanyak untai DNA selama proses amplifikasi.

4.2 Spesifisitas Primer

Uji spesifisitas dilakukan untuk memastikan bahwa primer *Gly m Bd* 28K dan *Gly m Bd* 30K dalam sistem *Multiplex* PCR hanya mengamplifikasi DNA kedelai (*Glycine max*), sehingga tidak menunjukkan amplifikasi terhadap DNA dari spesies lain. BLAST digunakan sebagai metode pencarian kesamaan sekuens pada basis data GenBank untuk mengevaluasi tingkat kesesuaian primer dengan sekuens target. Adapun Gambar *forward* dan *reverse* primer G-Max-28K-12F/G-Max-28K-577R secara *in silico* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 5 dan 6.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Glycine max cultivar FH8 Gly m Bd 28K allergen pseudogene, partial sequence	Glycine max	50.1	50.1	100%	100%	100%	2801	EU493465
Glycine max cultivar W1 Gly m Bd 28K allergen gene, partial cds	Glycine max	50.1	50.1	100%	100%	100%	2896	EU493461
Glycine max cultivar KF74 Gly m Bd 28K allergen gene, partial cds	Glycine max	50.1	50.1	100%	100%	100%	2885	EU493463
Glycine max cultivar LY75 Gly m Bd 28K allergen gene, partial cds	Glycine max	50.1	50.1	100%	100%	100%	2886	EU493464
Glycine max cultivar GK Gly m Bd 28K allergen gene, partial cds	Glycine max	50.1	50.1	100%	100%	100%	2885	EU493457
Glycine max allergen Gly m Bd 28K (LOC5547924)	Glycine soja	50.1	50.1	100%	100%	100%	2899	EU493461
PREDICTED: Gly cine sojavi dehydratunni DNA repair pr1en x0XRCC1, mRNA	Parasatodera ta	48.1	48.1	96%	100%	100%	2895	BK017651
PREDICTED: Cajanus cajan vicillin iike seed storage protein A12g24890, mRNA	Cajanus cajan	48.1	48.1	96%	100%	100%	2895	BK017651
Gly_ cine max allergen Gly m B 28K (LOC5647624), mRNA	Glycine max	48.8	48.1	96%	100%	100%	2895	BK017651
MAG TPA, asm_Caudouricutes sp. isolate c1Tn14, partial genome	Mastomys nat...	48.2	48.2	76%	100%	100%	2895	BR017755
Mastomys natalensis cytomegalovirus 1, transg enicMit Bn14900, partial	Mastomys nat...	48.2	48.2	85%	100%	100%	2895	BK017651
Mastomys natalensis cytomegalovirus TPA, genome	Mastomys nat...	48.2	48.2	75%	100%	100%	2895	BK017651
Mastomys natalensis cytomegalovirus 1 isolate RM019, &s466.4n proteom	Mastomys nat...	48.2	48.2	85%	100%	100%	2895	BK017765
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kottbus strain_DSK01, genome	Salmonella en...	38.2	36.2	72%	100%	100%	2895	BK017865
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kottbus strain_DSK01, complete	Salmonella en...	36.2	36.2	46%	100%	100%	2895	CP017392
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kottbus strain_DSK01, chromosom	Salmonella en...	36.2	36.2	46%	96%	100%	2895	CP017392

Gambar 5. Hasil Analisis BLAST Primer *Forward* G-Max-28K-12F

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc Len	Accession
nax cultivar FH8 Gly m Bd 28K allergen pseudogene, partial sequence	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	1000%	2891	EU493455
nax cultivar W1 Gly m Bd 28K allergen gene, partial cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	1000%	2896	EU493481
nax cultivar KF74 Gly m Bd 28K allergen gene, partial cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	1000%	2895	EU493488
nax cultivar LY75 Gly m Bd 28K allergen gene, partial cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	1000%	2895	EU493487
nax cultivar GK Gly m Bd 28K allergen gene, partial cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	1000%	2895	EU493481
nax cultivar ZS18 Gly m Bd 28K allergen gene, partial cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	1000%	2895	EU493484
TED, Centrophistes siamm simum profocadherin 1 (LOC1116887), transcript variant X1, mR	Ceracotharium	33.2	95.2	95%	15	1000%	2309	RV032667
TED, Rhoolema esculentum palmilovi-transferase ZDHHC2 like (LOC153848315), mRNA	Rhoolema escul	38.2	95.2	95%	15	1000%	2399	RK3741861
TED, Genome assembly, chromosome 6	Turdus pilaris	38.2	95.2	95%	15	1000%	2309	NW_016057
TED, Genome assembly, chromosome 6	Turdus pilaris	36.2	95.2	95%	15	1000%	2309	NW_020886
TED, Onychnychus genome assembly, 1.19	Cinnello racitrus	38.2	95.2	90%	19	1000%	2444	XM_020223
TED, Cavia purcellus 605 ribosomal protei 7.7 IlmAIR like (LOC3632583723), mRNA	Onychorhiterius	38.2	95.2	94%	23	1000%	2796	XM_004815
TED, Onychorhiteius nerka uncharcterized (LOC11537852), transcript variant X2	Onychorhiterius	36.2	95.2	94%	23	1000%	2759	XM_004548
TED, Manis pentadactylia MAPK activated protein kinase 3 (MAPKAPK3), transcript va ixX	Manis pentadiac	36.2	95.2	94%	23	1000%	2387	XM_015063
TED, Onychnythnus ktsuich zinc finger protein 539 like (LOC10889102), transcript variant	Manis pentadiac	36.2	95.2	94%	23	1000%	2364	XM_004486
TED, Onychcivrhirus lsuellMAPK activated protein kinase 3 (MAPKAPK3), transcript variant	Manis pentadiac	36.2	95.2	94%	23	1000%	2387	XM_016896
TED, Equus przewalskii MAPK activated protein kinase 3 (MAPKAPK3), transcript variant X2	Equus przewalk	36.2	95.2	94%	23	1000%	2567	XM_004377

Gambar 6. Hasil Analisis BLAST Primer *Reverse* G-Max-28K-577R

Berdasarkan Gambar 5 dan 6, menunjukkan bahwa sebagian besar kecocokan tertinggi dengan nilai *Max Score* antara 40,1 hingga 50,1 *Query cover* 100% dan *percent identity* 100% berasal dari *Glycine max* (kedelai) yang merupakan target gen 28K. Nilai *E-value* yang rendah (0,003) sehingga menunjukkan tingkat kesesuaian yang signifikan, selain kecocokan dominan dengan *Glycine max* terdapat hasil yang menunjukkan kemiripan dengan spesies lain seperti *Cajanus cajan*, *Parastagonospora nodorum*, *Cucurbitaceae*, *Caudoviricetes*, *Mastomys natalensis*, dan *Salmonella enterica*. kecocokan ini memiliki *percent identity* lebih rendah (72–96%) dan *Query cover* yang juga tidak penuh (46–96%), sehingga besar kemungkinan kemiripan tersebut hanya bersifat parsial atau disebabkan oleh konservasi sekuens antar spesies. Pada hasil analisis dari data kedua, kecocokan dengan *Glycine max* tetap mendominasi pada urutan teratas, diikuti oleh spesies lain seperti *Turdus pilaris*, *Onchorynchus*, *Carassius*, dan *Equus przewalskii*. Identitas pada non-*Glycine max* berada di kisaran 80–100% dengan *Query cover* sebagian besar di bawah 100%, yang menunjukkan kemiripan hanya pada fragmen tertentu dari sekuens.

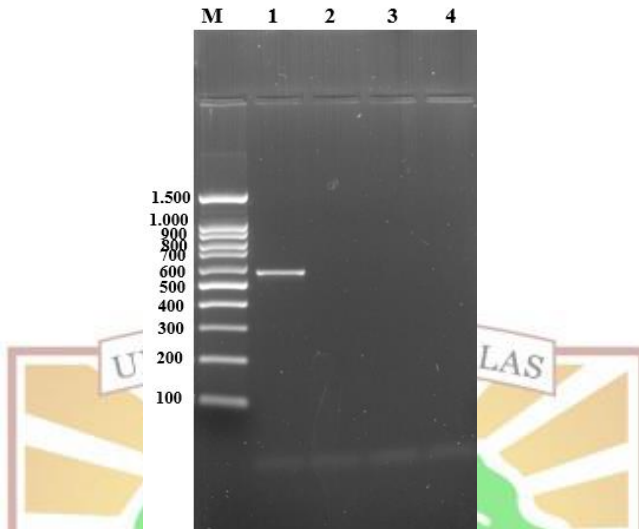
Analisis terhadap hasil tersebut memperlihatkan bahwa tingginya nilai *Max Score*, *percent identity* 100%, dan *Query cover* 100% pada urutan *Glycine max* menunjukkan keberhasilan primer dalam mendeteksi target gen 28 k alergen kedelai. Nilai *E-value* yang rendah menunjukkan bahwa hasil kecocokan ini signifikan. Adanya kecocokan dengan spesies selain *Glycine max* disebabkan oleh kesamaan sekuens pada daerah konservatif atau karena algoritma BLAST mendeteksi motif nukleotida serupa yang terdapat pada berbagai organisme. Identitas yang lebih rendah dan *Query cover* parsial pada kecocokan tersebut menunjukkan bahwa hasilnya bukan merupakan target utama, melainkan hasil *cross-match*. Meskipun demikian, dominasi hasil dari *Glycine max*

dengan identitas 100% menunjukkan bahwa primer memiliki spesifisitas terhadap target gen 28 k alergen kedelai.

Kesamaan yang muncul pada spesies non-target dapat diakibatkan oleh adanya pola genetik yang tersebar luas pada berbagai organisme, cakupan basis data BLAST yang sangat besar sehingga memungkinkan ditemukannya kesamaan pada fragmen pendek, maupun potensi *background noise* pada proses analisis bioinformatika. Temuan ini menguatkan bahwa sistem deteksi dengan primer yang digunakan dalam penelitian ini valid untuk identifikasi spesifik gen 28K alergen kedelai. Adanya kecocokan parsial dengan spesies lain menjadi pertimbangan tambahan dalam uji spesifisitas lanjutan di laboratorium untuk memastikan tidak terjadi reaksi silang pada sampel non-target

Hasil uji BLAST menunjukkan bahwa primer yang digunakan menunjukkan tingkat spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi dalam mendeteksi gen 28 k alergen kedelai (*Glycine max*) dengan identitas 100% dan *E-value* yang sangat signifikan. Walaupun ditemukan kecocokan parsial dengan beberapa spesies lain, hasil tersebut tidak mengubah kesimpulan bahwa primer ini layak digunakan dalam sistem deteksi berbasis *Multiplex* PCR untuk identifikasi kedelai pada sampel pangan. Uji lebih lanjut dengan berbagai jenis sampel pangan tetap diperlukan untuk memastikan tidak terjadi reaksi silang dalam aplikasi di laboratorium.

Uji *in vitro* dilakukan untuk memvalidasi spesifisitas primer yang telah dirancang secara *in silico* menggunakan BLAST. Metode yang digunakan adalah *singleplex* PCR, diikuti elektroforesis gel agarosa untuk memvisualisasikan hasil amplifikasi DNA target. Adapun visualisasi *forward* dan *reverse* primer G-Max-28K-12F/G-Max-28K-577R secara *in vitro* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil Elektroforesis Primer 28K12F/28K577R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)

Berdasarkan hasil elektroforesis PCR yang ditunjukkan pada Gambar 7, amplifikasi hanya terdeteksi pada DNA *Glycine max*, ditunjukkan oleh munculnya pita tunggal yang jelas pada sampel target, sesuai dengan ukuran bp yang diharapkan yaitu 565 bp. Tidak adanya pita pada posisi lain menunjukkan bahwa amplifikasi non-spesifik tidak terjadi dalam reaksi PCR inI yang memperkuat hasil uji *in silico* bahwa primer tidak mengalami *cross-reactivity* dengan DNA dari spesies lain. Dalam elektroforesis gel, keberhasilan amplifikasi PCR dinilai dari adanya pita tunggal pada ukuran yang sesuai dengan target, tidak adanya pita tambahan yang dapat menunjukkan amplifikasi non-spesifik, dan ketikadaan smear (pita kabur) yang menandakan degradasi DNA atau kondisi PCR yang tidak optimal. Pita yang terlihat pada lajur hasil PCR sesuai dengan kriteria di atas.

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa metode yang digunakan dapat diandalkan untuk mendeteksi DNA target secara spesifik. Dalam konteks deteksi alergen dalam pangan, hasil ini menunjukkan bahwa deteksi terhadap keberadaan DNA kedelai

Pengujian spesifisitas primer secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan program NCBI BLAST untuk mengetahui sejauh mana primer yang dirancang hanya mengenali sekuens target gen *Gly m Bd* 28K pada kedelai (*Glycine max*). Analisis ini penting untuk memastikan bahwa primer tidak menempel pada gen lain yang berpotensi menghasilkan amplifikasi non-spesifik. Adapun Gambar *forward* dan *reverse* primer G-Max-28K-949F/ G-Max-28K-1258R secara *in silico* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 8 dan 9.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Overly Cover	E value	Per Ident	Acc. Len
34.10kDa maturing seed vacuolar thiol protease mRNA, complete cds	Glycine max	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	Jl688801
Vigna unguiculata P34 probable thiol protease-like (LOC114176228) , mRNA	Glycine max	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_02891
Vigna radiata P34 probable thiol protease-like (Gly m Bd 30k) mRNA, complete.cds	Glycine max	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_0056:
Vignavici 0.1at allergen, complete cds	Glycine max	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_0546:
Vigna radiata Va maturing P34), complete, partial.cd_s	Vigna radiata	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_0267:
Vigna radiata Vba P34 probable wigna radiata -like (LOC023482), mRNA	Vigna radiata	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_0287:
v_gv_a_34.10kd allergen, complete cds	Vigna auton	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_0286:
mayr.B4.39K bufB4or2s complete, _come/lca_cds	Pleium auton	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_0137:
Vigna br P34 pl, complete cds	Vigna radiata	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_0202:
Vigna radiata P34 probable tll protease-like (LOC:63973556%&063). mRNA	Vigna radiata	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_0216:
V_gv_v_34.10kd allergen, complete byfe, _complete clás	Pleium auton	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_0271:
Onychmichus_P34 prgne, complete cds (LOC671206073E), partial mds	Marisedosufun	38.2	34.2	100%	5.8	100.00%	XM_0271:
nomon gv dnyru enoifeta pornehidel protease-like (LOC271606737), mRNA	Maras semato	38.2	34.2	100%	5.8	100.00%	XM_0271:
nonas.pseudocalcalgenes.Xylella fastidiosa strain A chromosome-obberoDeta	Marisedosufvi	34.2	34.2	100%	5.8	100.00%	XM_0271:
nonas.psychrophila strain A chromosome_assembly_chromosome_I	Pseudomonas ..	34.2	34.2	100%	5.9	100.00%	XM_CFKI:
nonas.sp.BDCS sélcinq factor (RDCS_94019), partial mdsa	Plastomona ..	34.2	34.2	100%	6.0	100.00%	XM_0646:

Gambar 8. Hasil Analisis BLAST Primer *Forward* G-Max-28K-949F

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
1A maturing seed vacuolar thiol protease mRNA, complete cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	J166580.1
1A glob P34 probable thiol protease (LOC114420285) mRNA	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	XM_02859
1689573 P34.10kA maturing seed protein Gly m Bd 30k) mRNA, complete cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	F418858.1
1A glob P34.10kA maturing seed protein Gly m Bd 30k) gene, complete cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	E015875
1A glob P34.10kA maturing seed protein Gly m Bd 30k) pseudogene for Bd 30k	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	A8010383
1A glob P34.10kA maturing seed protein Gly m Bd 30k) mRNA	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	XM_03171
1A glob P34.10kA maturing seed protein Gly m Bd 30k) gene, complete cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	XM_02178
1A glob P34.10kA maturing seed protein Gly m Bd 30k) pseudogene for Bd 30k	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	XM_02713
1A genome assembly: G/vronsamer1	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	XM_02176
1A genome assembly, chromosome, 1	Viola sacculata	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	XM_02738
1A genome assembly, chromosome, 10	Viola sacculata	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	XM_02168
1A genome assembly, chromosome, 13	Viola sacculata	38.2	40.1	100%	1.5	100.00%	XM_02168
1A genome assembly, chromosome, 1	Viola saccicula	38.2	40.1	100%	1.5	100.00%	XM_02131
1A genome assembly, chromosome, 13	Viola sepicula	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	XM_02722
1A genome assembly, chromosome, 8	Viola sepioula	38.2	38.2	100%	5.8	100.00%	O722743

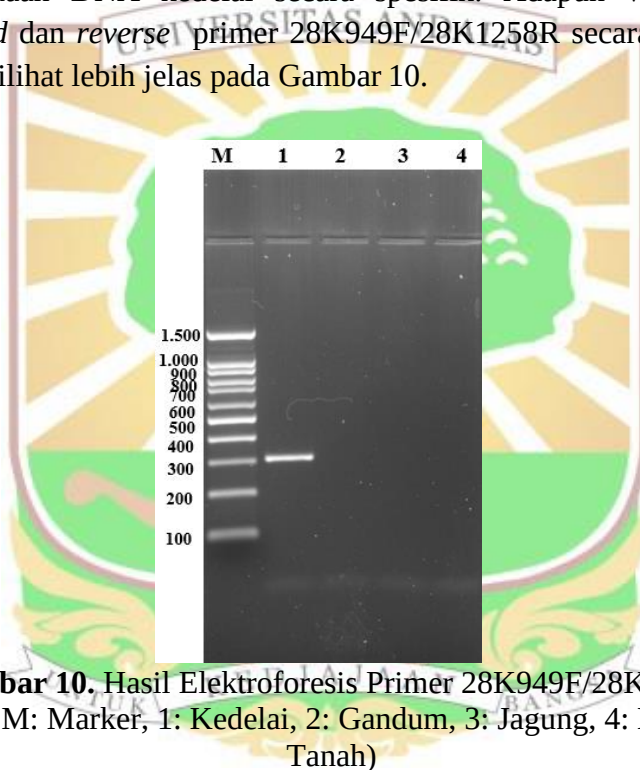
Gambar 9. Hasil Analisis BLAST Primer Reverse G-Max-28K-1258R

Berdasarkan Gambar 8 dan 9, primer menunjukkan kecocokan sempurna terhadap beberapa varietas kedelai (*Glycine max*) dan kedelai liar (*Glycine soja*) dengan nilai *percent identity* 100%, cakupan query 100%, dan nilai *E-value* yang sangat rendah (1,5), serta total skor tinggi (40,1). Hal ini menunjukkan bahwa primer bekerja secara spesifik terhadap gen alergen 30K pada kedelai. Primer juga menunjukkan kecocokan terhadap varian genetik seperti *mutant Gly m Bd 30K alergen* dan *pseudogene Bd 30K*, yang masih berasal dari spesies *Glycine*.

Sebaliknya, meskipun ditemukan kecocokan sekuens terhadap spesies non-target seperti *Vigna unguiculata*, *Vigna radiata*, dan *Pisum sativum*, identitas sekuens masih tinggi, namun nilai *E-value* lebih tinggi (hingga 5,8), dan total skor lebih rendah (sekitar 38,2–36,2). Selain itu, pada spesies tanaman lain seperti *Viola suecica* dan *Viola epipsila*, hanya sebagian sekuens yang cocok, dengan cakupan query menurun (70%–76%) meskipun identitasnya tetap 100%. Hasil ini menunjukkan adanya kesamaan

lokal sekuens, tetapi tidak cukup signifikan untuk menyebabkan amplifikasi pada kondisi PCR yang sesungguhnya.

Hasil uji spesifisitas secara *in silico* membuktikan bahwa primer yang dirancang untuk gen alergen *Gly m Bd* 30K memiliki spesifisitas yang tinggi terhadap DNA kedelai dan tidak menunjukkan reaktivitas silang yang signifikan terhadap spesies lain. Ini berarti bahwa primer dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan DNA kedelai secara spesifik. Adapun visualisasi *forward* dan *reverse* primer 28K949F/28K1258R secara *in vitro* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 10.



Gambar 10. Hasil Elektroforesis Primer 28K949F/28K1258R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)

Berdasarkan Gambar 10, amplifikasi hanya terdeteksi pada DNA *Glycine max*, ditunjukkan oleh munculnya pita tunggal yang jelas pada sampel target, sesuai dengan ukuran bp yang diharapkan yaitu 309 bp. Tidak adanya pita pada posisi lain menunjukkan bahwa amplifikasi non-spesifik tidak terjadi dalam reaksi PCR, hal

ini memperkuat hasil uji *in silico* bahwa primer tidak mengalami *cross-reactivity* dengan DNA dari spesies lain.

Keberadaan pita tunggal pada posisi yang sesuai dengan ukuran target menunjukkan bahwa reaksi PCR pada sampel tersebut berjalan dengan baik, tanpa adanya pita non-spesifik atau smear yang signifikan. Keberhasilan amplifikasi pada lajur 1 menunjukkan bahwa kualitas dan kuantitas DNA template yang digunakan cukup baik, dengan kemurnian yang memadai sehingga memungkinkan primer berikatan secara spesifik pada sekuens target. Tidak adanya pita non-spesifik juga menandakan bahwa kondisi PCR, seperti suhu *annealing* dan konsentrasi reagen, sesuai untuk menghasilkan amplifikasi yang selektif.

Hasil menunjukkan bahwa metode PCR yang digunakan berhasil mendeteksi DNA target secara spesifik pada jalur 1 (kedelai) dengan pita berukuran 309 bp, dan hasil negatif pada jalur 2, 3, dan 4 dengan sampel jagung, kacang tanah, dan gandum. Hal ini menunjukkan bahwa metode PCR spesifik sehingga berpotensi diaplikasikan sebagai bagian dari sistem deteksi alergen kedelai untuk mendukung keamanan pangan dan mencegah risiko paparan pada konsumen yang alergi terhadap kedelai.

Pengujian spesifisitas primer secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan program NCBI BLAST untuk mengetahui sejauh mana primer yang dirancang hanya mengenali sekuens target gen *Gly m Bd 28K* pada kedelai (*Glycine max*). Analisis ini penting untuk memastikan bahwa primer tidak menempel pada gen lain yang berpotensi menghasilkan amplifikasi non-spesifik. Adapun Gambar *forward* dan *reverse* primer G-Max-28K-1995F/G-Max-28K-2080R secara *in silico* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 11 dan 12.

Description	Scientific Name	GenBank				Graphics			Distance tree of results			M:
		Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len				Access	
curn.grazicat vicilin-like seed storage-protein A12g28481 (LOC:42831996). mRNA	Triticum-grajene	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	17514				XM_0456	
3ic.friazience FH8 Gly m Bg 28k allergen pseudogene	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	10689				EU492	
themax cultivar FH8 Gly m 82k allergen. partial cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	17514				EU493	
cine.max cultivar K4 LY75 allergen. gene. partial. cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	10661				EU485	
redicted: Phascoliva villooril like.szed storage protein(Ag28490.1 OC:3722777). mRNA. Cajanus cajan		40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	6643				XM_007	
DUCTED_Caligens soja vicilin-like seed storage protein A12g28490.1 mRNA	Glycine soja	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	1009				XM_62	
ycine max major aglergene Gly m Bd 25k / mRNA	Glycine soja	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	1041				XM_852	
ycine max gove for Bd a _complete cds _partial cds	Glycine soja	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	1088				EU68	
ycine max P34 probable thiol protease (P34). mRNA	Glycine max	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	1000				KM_8	
ycine max major aglergen Gly m Bd 28k / mRNA	Glycine soja	40.1	40.1	100%	1.5	100.00%	901				EU8	
irdus pilaris genome assembly. chromosome 9	Turdus oliv	38.2	35.2	99%	5.9	950251	13835				NW_03	
rdus sosq genomeassembly. chromosome 1	Viola sepecula	38.2	38.2	94%	5.9	363832	238				Q726	
a supposq genome assembly. chromosome 5	Viola sepeula	38.2	38.2	94%	5.8	137835	11884				NW_03	
3E-Ek3hbo genome asemblogenstns subunit.beta like 1(LOC:12419209).mRNA	Ohomontelinus	38.2	38.2	94%	5.8	188635	256				XP12	
ne sepeula genome assembly. chromosome 5	Stre estifassedus	38.2	38.2	93%	5.9	190876	1163				Q772	
la sepeula genome assembly. chromosome 11	Viola sepeula	38.2	36.2	90%	9.9	100249	1869				Q722	

Gambar 11. Hasil Analisis BLAST Primer *Forward* G-Max-28K-1995F

Description	Scientific Name	GenBank				Graphics			Distance tree of results			MSA View
		Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len				Accession	
x cultivar FHo Gly m Bg 28K allergen pseudogene. partial sequence	Glycine max	50.1	50.1	100%	0.00	0.001	1089				XM_006637840	
x cultivar W1 Gly m Bg 28K allergen. partial.c.ds	Glycine max	50.1	50.1	100%	0.00	0.001	14.1				EU843457.1	
x cultivar k4.LY75 Gly allergen. gene. partial cds	Glycine max	50.1	50.1	100%	0.00	0.001	14.1				EU493568.1	
x cultivar X2S I6Gly m Bg28k gene. partial cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	0.00	0.002	18.1				EU493485.1	
x cultivar pene Bh gm Bg 28k gene. partial cds	Glycine max	40.1	40.1	100%	0.00	0.004	3703				KM_034687.1	
stha breast tyrosin chromosome 29	Glycine max	40.1	40.1	100%	0.00	0.001	1089				EU949457.1	
\ cleavage endonuclease Eligia lype group f5 _complete sequence	Ceria max	41.1	41.1	91%	2.9	0.29	63				DD11210.1	
oschba gop geomosce 29	Glycine max	41.1	41.1	91%	2.9	0.29	96				XM_05554847	
NA cleavage endonuesie RT\flivo uyp 15 c/nique complex	Pipedquains	41.1	41.1	91%	2.9	0.28	92				XM_05554842	
ichus albianachas MQB (GPMB) , transcript variant. mRNA	Moschus ben...	41.1	41.1	92%	2.9	0.29	96				XM_05554842	
ichus albarolus goneute MOB (GP) h transcript variant. mRNA	Moschus ben...	41.1	41.1	81%	2.9	0.28	96				KM_05554847	
erosellies.cherenels complete genome. L.envisdrit variant x. mRNA	Moschus ben...	41.1	41.1	86%	9.6	0.28	5685				KM_0555467.1	
presterollies genome	Chenae choer...	40.1	40.9	96%	9.2	0.38	3885				KM_01418783	
omalulils genome	Leedias azure...	38.9	39.1	96%	9.2	0.38	9835				KM_01418783	
is albianachas ribloc factor (OCS ganscriptote variant x mitc) . mRNA	Choria halucha	38.2	39.1	92%	9.2	0.37	MN9912				MND56.621.1	
ntolfeolhit ablin RIST compression 1 (moon) . mRNA	PREDICTED cent...	38.2	39.1	16%	100	0.29	9855				XP_Q3099588	

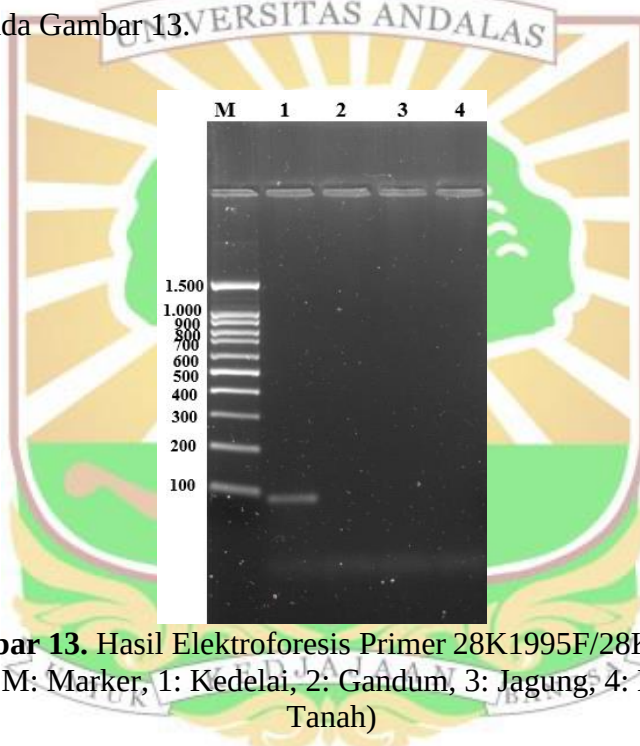
Gambar 12. Hasil Analisis BLAST Primer *Reverse* G-Max-28K-2080R

Berdasarkan Gambar 11 dan 12 menunjukkan kecocokan sempurna (100% identity dan 100% query cover). Semua hasil memiliki nilai *E-value* sebesar 1,5 yang menunjukkan kecocokan signifikan antara sekuens primer dengan target gen *Gly m Bd 28K*. Selain itu, kecocokan juga ditemukan pada spesies kedelai lain seperti *Glycine soja*, yang masih dalam satu genus dengan *Glycine max*. Hal ini mendukung bahwa primer memiliki spesifisitas yang baik terhadap gen target dalam genus kedelai.

Primer *forward* juga menunjukkan kecocokan parsial dengan sekuens dari spesies lain seperti *Trifolium pratense*, *Cajanus cajan*, *Phaseolus vulgaris*, dan bahkan beberapa spesies burung seperti *Sitta europaea* dan *Viola epipsila*. Walaupun identitas sekuensnya tinggi (hingga 100%) nilai total score dan *E-value* pada hasil ini relatif lebih rendah dibandingkan dengan target utama (*Glycine max*), serta kemungkinan amplifikasi pada PCR aktual sangat kecil karena posisi kecocokan biasanya terjadi secara parsial dan tidak melibatkan keseluruhan panjang primer.

Primer *reverse* ini memiliki identitas 100% dan query cover 100% terhadap berbagai kultivar *Glycine max*, dengan *E-value* sangat rendah (0,003) dan skor total tinggi (50,1) yang menunjukkan kecocokan sangat spesifik terhadap target. Meski demikian, kecocokan parsial juga terdeteksi pada spesies non-target seperti *Cairina moschata*, *Danio rerio*, dan *Moschus berezovskii*. Namun, identitas sekuens yang menurun (80–92%) dan *E-value* yang meningkat (hingga 2,9) memperkuat dugaan bahwa kemungkinan terjadinya amplifikasi silang (*cross-reactivity*) terhadap spesies tersebut sangat kecil. Kedua primer *Gly m Bd 28K* menunjukkan spesifisitas yang sangat baik secara *in silico*, karena kecocokan tertinggi hanya terjadi pada sekuens target dalam genus *Glycine*. Potensi amplifikasi silang pada spesies lain sangat kecil karena nilai *E-value* yang tinggi dan kecocokan sekuens yang tidak sempurna.

Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memvisualisasikan hasil amplifikasi DNA dengan primer target gen *Gly m Bd* 28K. Marker DNA (M) digunakan sebagai pembanding untuk menentukan ukuran fragmen yang dihasilkan. Tujuan analisis ini adalah untuk memastikan apakah primer berhasil mengamplifikasi fragmen DNA sesuai ukuran target. Adapun visualisasi *forward* dan Hasil analisis BLAST primer *reverse* 28K1995F/28K2080R secara *in vitro* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 13.



Gambar 13. Hasil Elektroforesis Primer 28K1995F/28K2080R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)

Berdasarkan hasil elektroforesis PCR yang ditunjukkan pada Gambar 13, terlihat bahwa primer *Gly m Bd* 28K menghasilkan pita DNA dengan ukuran yang sesuai dengan target amplifikasi, yaitu 85 bp . Pita DNA terlihat jelas, tegas, dan berada tepat pada posisi marker yang sesuai, menunjukkan bahwa primer berhasil mengenali dan mengamplifikasi sekuens targetnya secara spesifik. Terlihat hanya satu pita tunggal pada masing-masing reaksi

singleplex menunjukkan bahwa tidak terjadi amplifikasi non-spesifik atau pembentukan dimer primer yang dapat mengganggu hasil PCR. Hasil ini mengonfirmasi bahwa desain primer telah berhasil dan memiliki spesifisitas yang tinggi terhadap gen target *Gly m Bd* 28K. Tidak ditemukannya pita lain di luar ukuran target juga memperkuat bahwa primer ini tidak mengikat pada sekuens DNA lain dalam template, sehingga cocok digunakan untuk deteksi spesifik alergen kedelai.

Keberhasilan amplifikasi fragmen DNA berukuran ± 1.500 bp dapat dijelaskan oleh beberapa faktor. Pertama, desain primer yang tepat dan spesifik terhadap target meminimalkan kemungkinan terjadinya amplifikasi non-spesifik. Kedua, kemurnian dan integritas DNA template yang baik mendorong efisiensi reaksi PCR sehingga menghasilkan pita tunggal yang jelas (Sambrook, J. and Russell, 2001). Ketiga, kondisi PCR yang teroptimasi (suhu annealing, konsentrasi Mg^{2+} , dan jumlah siklus) berperan penting dalam memastikan spesifisitas dan efisiensi reaksi (Green & Sambrook, 2019). Tidak adanya *smearing* atau pita non-target memperkuat bahwa proses isolasi DNA dan optimasi PCR dilakukan dengan baik.

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa amplifikasi DNA menggunakan primer yang dirancang dalam penelitian ini berhasil menghasilkan fragmen tunggal dengan ukuran ± 1.500 bp pada semua sampel uji. Hasil ini mengonfirmasi keberhasilan proses PCR yang spesifik dan efisien. Dengan demikian, primer ini layak digunakan untuk deteksi target gen kedelai, baik pada tahap verifikasi di laboratorium maupun pengujian lapangan. Tidak ditemukannya pita non-spesifik atau degradasi DNA menunjukkan kualitas hasil yang baik dan konsisten.

Pengujian spesifisitas primer secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan program NCBI BLAST untuk mengetahui sejauh mana primer yang dirancang hanya mengenali sekuens target gen *Gly m Bd* 28K pada kedelai (*Glycine max*). Analisis ini

penting untuk memastikan bahwa primer tidak menempel pada gen lain yang berpotensi menghasilkan amplifikasi non-spesifik. Adapun Gambar *forward* dan *reverse* primer 30K1072F/30K1506R secara *in silico* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 14 dan 15.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc.	Accessi
luring seed vacuolar thiol protease mRNA, complete cds	Glycine max	40.1	10.1	100%	1.5	1227	1227	J16556
bp P3d, probable thiol protease (LOC11443303285), mRNA	Glycine max	40.1	10.1	100%	1.5	1140	1883	XM_014
9573.34.10kA maturing seed protein Gly m Bd 30k mRNA gene, complete cds	Glycine max	40.1	10.1	100%	1.5	796	307	EU1834
rmm Bd 34k allergen (P34), gene, complete cds	Glycine max	40.1	10.1	100%	1.5	422	1422	EU1883
r Gly Md 30k, complete cds	Glycine max	40.1	10.1	100%	1.5	1422	1421	EU1883
5d 30k, complete cds, mRNA	Glycine max	40.1	10.1	100%	1.5	1422	1422	NM_001
ible thiol protease (P34), mRNA cds	Glycine max	36.2	1e-0	1e-09	1e-09	1471	1422	XM_0644
84k allergen (P34), gene, complete cds	Rana temporaria	36.2	1e-0	1e-09	1e-09	1471	1366	EU1883
testis expressed 14, intercellular bridge forming factor (TEX14), transcrip...	Rana temporaria	36.2	1e-0	1e-09	1e-09	1471	1366	EU1883
testis expressed 14, intercellular bridge forming factor (TEX14), transcrip...	Rana temporaria	36.2	1e-0	1e-09	1e-09	2826	3133	XM_034
testis expressed 14, intercellular bridge forming factor (TEX14), transcrip...	Rana temporaria	36.2	1e-0	1e-09	1e-09	2825	3136	EU1883
testis expressed 14, intercellular bridge forming factor (TEX14), transcrip...	Sordaria macrosp	36.2	1e-9	1e-09	2.8	282695	700181	EU1883
uchacterized protein (SMACA, 07795), mRNA	Sordaria macrosp	36.2	1e-9	1e-09	2.8	313098	PHY31	XM_003
sp isolate ots88d/c/c 1 tea6/aeb/b-58ate5518172 genome asse rnyasser laly	Crocosimobium	36.2	1e-9	1e-09	3.0	12866	3136	PHY313
ifra equalivbi chitinase 4 like (LOC109595518), mRNA	Atrubulum in ...	36.2	1e-9	1e-09	1.4	3133	10201	XM_002
ter planci chromosome, complete genome	Sphingobacter sp.	36.2	1e-0	1e-09	1.28	10201	1286	XM_012

Gambar 14. Hasil Analisis BLAST Primer *Forward* G-Max-30K-1072F



Par 15. Hasil Analisis BLAST Primer Reverse G-Ma
1506R

Berdasarkan Gambar 14 dan 15 primer *forward* dan *reverse* *ym Bd 30K* menunjukkan hasil yang sangat baik. Kedua primer telah dirancang menunjukkan kecocokan sempurna dengan target dari spesies *Glycine max* dan *Glycine soja*. Sumber utama dari gen alergen 30 kDa. Berdasarkan hasil BLAST yang ditampilkan, primer memiliki *percent identity* 100% dan *query cover* 100%, dengan nilai *E-value* sangat rendah (1.5×10^{-15}), yang menunjukkan bahwa kesesuaian sekuens primer dengan target adalah signifikan dan bukan karena kebetulan.

Kecocokan terhadap gen alergi kedelai (*Glycine max*) menunjukkan bahwa desain primer telah memenuhi kriteria spesifisitas tinggi. Tingginya *Query cover* dan *Percent Identity* terhadap kedelai mengindikasikan bahwa primer mampu mengenali target secara tepat tanpa terpengaruh oleh variasi genetik internal kedelai.

Kehadiran hasil BLAST pada spesies lain dengan tingkat identitas yang rendah (<100%) dan *Query cover* yang tidak penuh

menunjukkan bahwa kemungkinan amplifikasi silang (cross-amplification) pada bahan pangan non-kedelai sangat kecil. Hal ini penting untuk menjamin keandalan metode deteksi dalam sistem keamanan pangan, karena kesalahan positif (*false positive*) dapat berdampak pada label pangan dan kepercayaan konsumen.

Hasil ini sekaligus menguatkan uji spesifisitas secara *in silico* bahwa primer yang digunakan hanya akan memberikan hasil positif pada sampel yang mengandung DNA kedelai, dan memberikan hasil negatif pada bahan pangan lain seperti jagung, gandum, atau kacang tanah. Dengan demikian, metode ini memiliki potensi besar untuk diaplikasikan dalam *Multiplex* PCR sebagai bagian dari inovasi deteksi cepat alergen kedelai dalam produk olahan pangan.

Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memvisualisasikan hasil amplifikasi DNA dengan primer target gen *Gly m Bd* 28K. Marker DNA (M) digunakan sebagai pembanding untuk menentukan ukuran fragmen yang dihasilkan. Tujuan analisis ini adalah untuk memastikan apakah primer berhasil mengamplifikasi fragmen DNA sesuai ukuran target. Adapun visualisasi *forward* dan Hasil analisis BLAST primer *reverse* 30K1072F/30K1506R secara *in vitro* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 16.





Gambar 16. Hasil Elektroforesis Primer 30K1072F/30K1506R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)

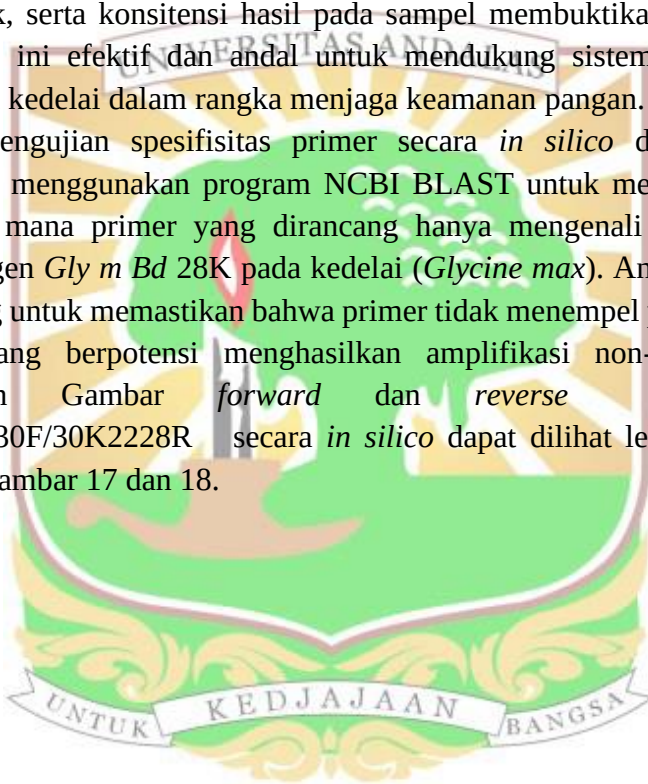
Hasil elektroforesis pada menunjukkan pita DNA tunggal yang teramplifikasi pada sampel kedelai dengan ukuran 434 bp pada lajur 1. Jalur M merupakan market DNA dengan rentang ukuran 100-1500 bp yang digunakan sebagai acuan. Primer yang digunakan dalam reaksi PCR mampu mengamplifikasi target gen alergen kedelai secara spesifik dan konsisten pada berbagai sampel yang diuji. Tidak terdeteksi adanya pita non-spesifik atau smear, yang menunjukkan bahwa reaksi PCR berlangsung dengan efisien tanpa gangguan amplifikasi dari fragmen DNA lain.

Menurut (Maksum et al., 2019) prinsip deteksi DNA berbasis PCR untuk keamanan pangan, suatu metode deteksi alergen harus menghasilkan amplifikasi pita target yang jelas, spesifik, dan bebas dari amplifikasi non-spesifik. Ukuran pita target harus sesuai dengan desain primer yang telah ditetapkan sebelumnya. Pada penelitian ini, primer dirancang untuk mendeteksi gen protein alergen kedelai dengan ukuran amplifikasi 434 bp. Hasil yang diperoleh sesuai dengan standar tersebut, di mana semua pita yang

dihasilkan berada pada ukuran yang tepat dan tidak menunjukkan adanya pita tambahan menandakan keberhasilan dalam mencapai spesifisitas deteksi.

Hasil ini menunjukkan bahwa metode PCR yang dikembangkan mampu mendeteksi gen alergen kedelai secara spesifik dengan ukuran pita 434 bp sesuai dengan primer yang di desain. Spesifisitas yang tinggi, ketiadaan amplifikasi non-spesifik, serta konsistensi hasil pada sampel membuktikan bahwa metode ini efektif dan andal untuk mendukung sistem deteksi alergen kedelai dalam rangka menjaga keamanan pangan.

Pengujian spesifisitas primer secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan program NCBI BLAST untuk mengetahui sejauh mana primer yang dirancang hanya mengenali sekuens target gen *Gly m Bd 28K* pada kedelai (*Glycine max*). Analisis ini penting untuk memastikan bahwa primer tidak menempel pada gen lain yang berpotensi menghasilkan amplifikasi non-spesifik. Adapun Gambar *forward* dan *reverse* primer 30K1830F/30K2228R secara *in silico* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 17 dan 18.



select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results			
Description	Scientific Name	Max. Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
PREDICTED: Glycine soja P34 probable thiol protease (LOC114422085), mRNA	Glycine soja	42.1	42.1	100%	0.0	1426	XM 023588721
Glycine max multi Bd 30k allergen (P34) gene, complete sequence	Glycine max	42.1	42.1	100%	0.0	1446	LE165821.1
Glycine max gene for Bd 30K, complete cds	Glycine max	42.1	42.1	100%	0.0	1444	AB18321.1
Glycine max P34 probable thiol protease (P34), mRNA	Glycine max	42.1	42.1	100%	0.0	1444	NM_00125
Glycine max Gly m Bd 30K allergen (P34) gene, complete cds	Glycine max	42.1	42.1	100%	0.0	1444	XM 023388721
Calluna vulgaris genome assembly, chromosome: 7	Calluna vulgaris	40.1	40.1	90%	0.0	1889	OE285081.1
Calluna vulgaris genome assembly, chromosome: 6	Timema bartma	40.1	40.1	90%	0.0	1089	OE288508.1
Calluna vulgaris genome assembly, chromosome: 6	Timema bartman	40.1	40.1	90%	0.0	1089	OE289081.1
Prunus dulcis genome assembly, chromosome: 6	Prunus dulcis	38.2	40.1	90%	0.0	1038	OE285081.1
Sephanium insi genome assembly, chromosome: me1	Sephanium insi	36.2	38.2	90%	0.0	2689	UC0374010.1
PREDICTED: Girardinithylis multiaudens tegne tyrosine kinase 3 (nk), mRNA	PREDICTED: Gir	38.2	30.0	90%	186	2959	OM4467285.
PREDICTED: Hoplias malinbatous SUMO specific peptidase 5a (senpe5b), transcript variat	Hoplias malinbatou	36.2	30.0	80%	0.0	1710	OM4467285.
PREDICTED: Hoplias malinbatous SUMO specific peptidase 6a (senpe6b), transcript variat	Hoplias malinbatou	34.3	30.0	80%	9.9	1320	OM4483295
PREDICTED: Hoplias malinbatous SUMO specific peptidase 6a (senpe6), transcript variat	Hoplias malinbatou	34.3	30.0	80%	9.2	1710	OM448416.1
Eukaryotic synthetic construct-chromosome.16	Eukaryotic syn.	36.2	30.0	80%	360	3604	FAL049129
Melaguris gallavo genome assembly, chromosome: Z	Melaguris gallav	36.2	38.0	86%	860	7767874	HG395884.

Gambar 17. Hasil Analisis BLAST Primer *Forward* G-Max-30K-1830F

select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results				MSA V
Description	Scientific Name	Max. Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession	
PREDICTED: Glycine sia P34 probable thiol protease (LOC114422085), mRNA	Glycine soja	42.1	42.1	100%	0.0	0.0	XM.028388721	
Glycine mas multi Bd 30k allergen (P34) gene, complete sequence	Glycine max	42.1	42.1	100%	0.0	0.0	LE185821.1	
Glycine max gene for Bd 30K, complete cds	Glycine max	42.1	42.1	100%	0.0	0.0	AB188010.1	
Glycine max Gly m Bd 30K allergen (P34), Mm mRNA	Glycine max	40.1	42.1	100%	0.0	0.0	NM_001257192	
Glycine max Gly m Bd 30K allergen (P34) gene, complete cds	Calluna vulgaris	40.1	40.1	95%	0.0	0.0	XM 072536721.1	
Calluna vulgaris genome assembly, chromosome: 7	Timema bartma	40.1	209	90%	2.0	2.0	OE285081.1	
Calluna vulgaris genome assembly, chromosome: 6	Timema bartma	40.1	209	90%	2.0	2.0	OE785081.1	
Prunus dulcis genome assembly, chromosome: 6	Sephanium insi	36.2	2.0	90%	2.0	2.0	QZ7255090.1	
Sephanium insi genome assembly, chromosome: ma.1	Sepayomum sd	38.2	2.0	58	2.0	3.6	OM4487288.1	
PREDICTED: Girardinithylis multiaudens tegne tyrosine kinase 5 (nk), mRNA	PREDICTED: H	36.2	2.0	26%	2.0	3.0	OM44708716.1	
PREDICTED: Hoplias malinbatous SUMO specific peptidase 5a (senpe5b), h.c.t. mRNA	PREDICTED: H	36.2	98	90%	2.0	3.0	OM4487285.1	
PREDICTED: Hoplias malinbatous SUMO specific peptidase 5a (senpe6b), h.c.t. mRNA	PREDICTED: H	38.2	90	90%	2.0	3.8	OM4487285.1	
PREDICTED: Hoplias malinbatous SUMO specific peptidase 6a (senpe5), transcript variat	PREDICTED: H	36.2	90	90%	2.0	3.6	OM4484129.1	
Eukaryotic synthetic construct chromosome 16	Eukaryotic synt	36.2	86	86%	23	3.0	MOC K990341	
Melaguris gallavo genome assembly, chromosome Z	Maoguris salie	36.2	86	86%	23	3.0	HG393884.1	
Calluna assembly genomes assembly, n	Sephanium insi	38.2	86	90%	20	3.0	OMCK87738.1	
Melaguris gallavo genome assembly, chromosome: z	HG9985884.1	38.2	86	80%	23	3.0	HG395884.1	

Gambar 18. Hasil Analisis BLAST Primer *Reverse* G-Max-30K-2228R

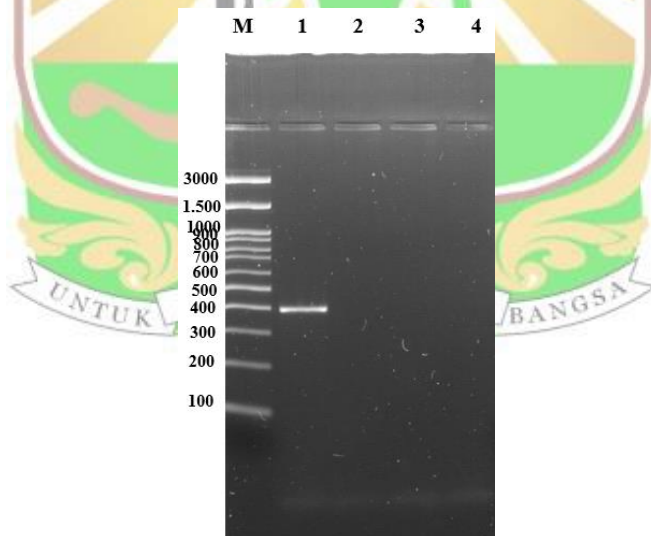
Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sekuens target memiliki kesesuaian tertinggi dengan *Glycine soja* dan *Glycine max*, yang merupakan spesies kedelai, dengan *percent identity* mencapai 100% dan nilai *E-value* 0,0. Beberapa hit teratas juga menunjukkan kesesuaian dengan gen pengkode protein alergen P34 (*thiol protease*) dan alergen Bd 30K dan Bd 28K, yang umum ditemukan pada kedelai. Selain itu, ditemukan pula kecocokan parsial dengan spesies lain seperti *Calluna vulgaris*, *Prunus dulcis*, dan *Trifolium pratense*, meskipun dengan nilai *Max Score* dan *Total Score* yang lebih rendah dibanding *Glycine* sp. Hasil ini menunjukkan bahwa sekuens target memiliki kemiripan yang sangat tinggi dengan sekuens kedelai dan berpotensi mengindikasikan keberadaan DNA kedelai dalam sampel.

Tingkat identitas yang mencapai 100% pada *Glycine max* dan *Glycine soja* mengindikasikan bahwa sekuens hasil amplifikasi kemungkinan besar berasal dari kedelai. Nilai *E-value* yang sangat rendah (0,0) memperkuat validitas kecocokan tersebut, karena semakin kecil *E-value*, semakin kecil kemungkinan kecocokan terjadi secara kebetulan. Adanya kemunculan alergen P34 dan Bd 28K/Bd 30K relevan karena gen ini sering digunakan sebagai penanda molekuler untuk identifikasi kedelai dalam produk pangan olahan. Kecocokan parsial dengan spesies non-kedelai dapat disebabkan oleh adanya konservasi urutan genetik di antara spesies yang berkerabat atau kebetulan memiliki daerah homolog.

Kecocokan 100% dengan gen spesifik kedelai mengindikasikan bahwa metode PCR dan sekuens yang digunakan berhasil mengamplifikasi target DNA secara spesifik. Keberadaan alergen P34 sebagai salah satu gen hasil amplifikasi sesuai dengan laporan bahwa gen ini merupakan marker genetik yang konsisten untuk deteksi kedelai dalam bahan pangan (Mulalapele & Xi, 2021). Selain itu, hasil BLAST yang menunjukkan *query cover* 100% terhadap sekuens kedelai menegaskan bahwa kualitas data sekuensing cukup baik, tanpa adanya *gap* yang signifikan.

Berdasarkan hasil BLAST, dapat disimpulkan bahwa sekuens DNA yang diuji memiliki identitas yang sangat tinggi dengan gen alergen kedelai, khususnya P34 dan Bd 28K/Bd 30K, dengan *percent identity* 100% dan *E-value* 0,0. Hal ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan efektif untuk mendeteksi DNA kedelai dalam sampel. Temuan ini dapat digunakan sebagai dasar untuk analisis lebih lanjut terkait keamanan pangan, pelabelan bahan pangan, dan autentikasi produk.

Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memvisualisasikan hasil amplifikasi DNA dengan primer target gen *Gly m Bd 28K*. Marker DNA (M) digunakan sebagai pembanding untuk menentukan ukuran fragmen yang dihasilkan. Tujuan analisis ini adalah untuk memastikan apakah primer berhasil mengamplifikasi fragmen DNA sesuai ukuran target. Adapun visualisasi *forward* dan Hasil analisis BLAST primer *reverse* 30K1830F/30K2228R secara *in vitro* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 19.



Gambar 19. Hasil Elektroforesis Primer 30K1830F/30K2228R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)

Hasil elektroforesis amplifikasi PCR menunjukkan bahwa pita DNA target berhasil diamplifikasi sesuai dengan ukuran yang diharapkan. Sampel pada jalur 1 menampilkan pita tunggal berukuran 398 bp yang sesuai dengan target gen *Gly m Bd 30 K*, sementara jalur 2-4 tidak menunjukkan pita non-spesifik. Marker (M) menunjukkan ukuran fragmen DNA mulai dari 100b bp hingga 3000 bp sebagai acuan penentuan ukuran.

Berdasarkan literatur (Kutateladze et al., 2021) juga berhasil mengamplifikasi gen tersebut dengan ukuran yang sesuai, perbedaan utama penelitian ini adalah primer yang digunakan dirancang secara mandiri melalui analisis sekuens gen target, sehingga menghasilkan desain primer baru yang tetap mampu mengamplifikasi target dengan spesifisitas tinggi. Keberhasilan amplifikasi dapat dikatakan spesifik apabila pita DNA yang terbentuk berada tepat pada ukuran tersebut tanpa munculnya pita tambahan atau *smear* yang dapat mengindikasikan amplifikasi non-spesifik atau degradasi DNA.

Pengujian spesifisitas primer secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan program NCBI BLAST untuk mengetahui sejauh mana primer yang dirancang hanya mengenali sekuens target gen *Gly m Bd 28K* pada kedelai (*Glycine max*). Analisis ini penting untuk memastikan bahwa primer tidak menempel pada gen lain yang berpotensi menghasilkan amplifikasi non-spesifik. Adapun Gambar *forward* dan *reverse* primer 30K106F/30K234R secara *in silico* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 20 dan 21.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Perc. ident	Acc. Len	Accession
ne max mutant Gly m Bd 30K allergen (P34) gene, complete sequence	Glycine max	441	44.1	44.1	100.0	0.0	2776	EAS18281.1
ne max gene for Bd.30K allergen (P34) gene	Glycine max	441	44.1	44.1	100.0	0.0	8575	EAS18261.1
ne max Gly m Bd.30K allergen (P34) gene, complete apk	Timema mol	441	44.1	44.1	100.0	0.0	2272	EAS18261.1
h2y04B	Timema mola	66.2	44.1	44.1	100.0	0.0	253620	QB735107.1
h2y04C	Timema calita	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	2537	OC786674.1
h2y04E	Timema calita	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	363401	OC753674.1
lori10bryblyasherikas strain MA2414 chromosome 1, complete sequence	Dimocarpus di	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	3412851	OR913781.1
ocripes dacloytidries gonadotropin-releasing hormone receptor (UNRP8) mRNA	Dimocarpus di	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	587	XP_376374.1
rhem chromosomes 110 repetitive sergaphase.z (VDFFC_01773), senital mRNA	Pocombia ch	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	1650	PO053721.1
h3y04	Timema mola	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	667	CTD23224.1
CTED: Hemibagnus putativiv, sywetlvin rsoeat/ ankyrin repea.t and colled-call-containing p Hemibagnue	Hemibagnus	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	6513	TUHBSY04.1
hy05	Timema calita	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	2517	XP_378674.1
CTED: Hemibagnus vyckides tetraetriopeet/danuyinh repeat repeontaing pcRNA	Hemibagnus	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	1280	VD053721.1
CTED: Salinirus brasiliensis WAPL coublal repea	Tiszama calita	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	3379	PO053721.1
CTED: Cerica cervana nouthn respiantlik putaivient 770 (rwapfb), transcript varRNA	Dierca cervna	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	6380	CTD23224.1
CTED: Salinirus brasiliensis WAPL cohasin release factor p (wapfb), transcript v.rRNA	Cereica cervna	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	6912	OR913724.1
CTED: Hemibagnus wycklodes oxidase like (LOC110618348), mRNA	Saccosysyopa	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	4530	VD053721.1
CTED: Saccosivsus kosvalveskil putative leucin rich repeat repeat-onlating protein bDR GC Saccosistogwe	Saccosistogwe	36.2	36.2	36.2	100.0	0.0	3520	XM_002258136.1

Gambar 20. Hasil Analisis BLAST Primer *Forward* G-Max-30K-106F

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Perc ident	A
) 12/1a.P34 probable thiol protease (LOC11442925), mRNA	Glycine soja	44.1	44.1	0.09	0.094	100.00%	1
) orth P34 probable thiol protease-like (LOC11245377), mRNA	Glycine ortho	44.1	44.1	0.09	0.094	100.00%	1
) r 24.1 dDa metathesia seed vacuolar ribol protease mRNA, partial 3'	Glycine max	44.1	44.1	0.09	0.094	100.00%	5
) Gly m Bd 30K allergen (P34), mRNA	Glycine max	44.1	44.1	0.09	0.094	100.00%	E
) Gly m 30K allergen (P34) gene complete cds	Glycine max	44.1	44.1	0.09	0.094	100.00%	Q
) ignensi genome assembly, chromosome 14	Schyzosio ignen	44.1	44.1	0.09	0.094	100.00%	49
) colabalis strain A44 chromosome, complete genome	Nakamoadla cola	44.1	44.1	0.09	0.094	100.00%	E
) a sp. HL15 chromosome complete genome	Primulin humilis	44.1	44.1	0.09	0.094	100.00%	Cf
) Primulinu mapative late blight resistance protein homolla homolog R1A1.2(LOC3313G3/firc,nilin humitis		44.1	44.1	0.09	0.094	100.00%	C
) Silene latifolia dūbsp kavanaash kuyōoshi phosphate/phosphatate junctionsporter	Fabaceae confici	44.2	36.2	0.09	0.094	100.00%	Ci
) Apocentra infimus putative late blight resistance protein 2(ZUtochr2)	Silene latifolia	36.2	36.2	0.09	0.094	100.00%	SJl
) Apocentra infimus uncharacterized protein 2(Zuóde2) (ty6/raterof varmint X2, mRN	Apocentra infimus	36.2	36.2	0.09	0.094	100.00%	Al
) Apocentra infimus uncharacterized protein (LOC138429523), transcript variant X2	Lampropta fusilla	36.2	36.2	0.09	0.094	100.00%	G
) Circeia infimulome assembly, chromosome 43, yfexpmde 44	Circeia gratus	36.2	36.2	0.09	0.094	100.00%	Cf
) Lampropta infimus gnom assembly, 4S	Lampropta fuedila	36.2	36.2	0.09	0.094	100.00%	XI
) infimus uncharacterized protein (LOC3981342952), same cricnot variant X2, mRN	Circeia gratus	36.2	36.2	0.09	0.094	100.00%	B
) Apocentra infimus uncharacterized protein (LOC139428523), transcript variant X2	Aromedra infimus	36.2	36.2	0.09	0.094	100.00%	Al

Gambar 21. Hasil Analisis BLAST Primer *Reverse* G-Max-30K-234R

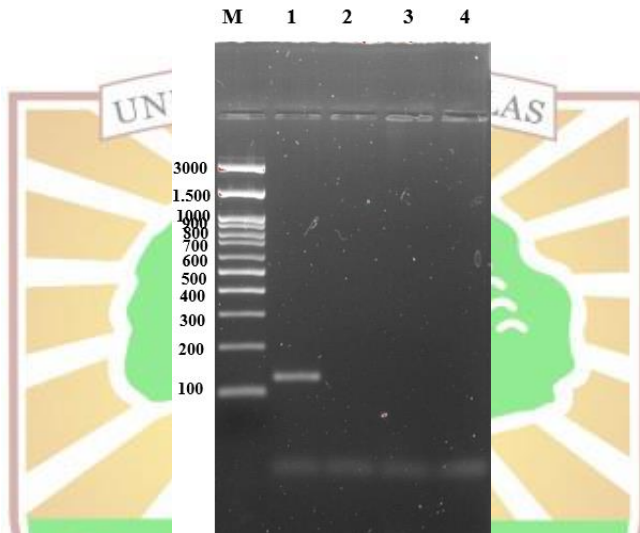
Berdasarkan hasil yang ditampilkan pada Gambar 20 dan 21, primer yang dirancang memiliki *percent identity* 100% dan *query cover* 100% terhadap sekuens gen *Gly m Bd* 30K dari *Glycine max*. Primer juga menunjukkan kecocokan penuh dengan sekuens dari *Glycine soja*, termasuk gen seperti *P34 probable thiol protease* dan bentuk lengkap CDS dari gen 30K, dengan *E-value* sangat kecil (0,094) yang menunjukkan kecocokan yang sangat signifikan dan tidak acak.

Beberapa aksesioan number penting yang menjadi target utama antara lain FJ616287.1, AB013289.1, NM_001251290.2, dan XM_028388279.1, yang semuanya merupakan bagian dari gen atau transkrip alergen 30kDa pada kedelai. Hasil ini mengonfirmasi bahwa primer berhasil mendeteksi target sekuens alergen secara akurat sesuai dengan desainnya. Selain itu, terdapat hasil pencocokan terhadap sekuens dari spesies non-target seperti *Timema cristinae*, *Toxocara canis*, *Sphagnum jensenii*, *Mycobacterium xenopi*, dan lainnya. Meskipun hasil ini juga menunjukkan nilai identitas 100%, mereka memiliki *query cover* yang lebih rendah (82–91%) dan *E-value* jauh lebih tinggi (hingga 5,8 dan 23).

Hasil ini menunjukkan bahwa kemungkinan keterikatan primer secara non-spesifik terhadap organisme non-kedelai sangat kecil dan tidak relevan dalam konteks praktis, terutama untuk aplikasi deteksi alergen pada bahan pangan berbasis kedelai. Hasil ini membuktikan bahwa primer *forward* dan *reverse* 30K yang dirancang memiliki spesifisitas tinggi terhadap gen target baik pada *Glycine max* maupun *Glycine soja*, dan dapat digunakan untuk mendeteksi DNA kedelai secara akurat dalam produk olahan makanan menggunakan metode PCR.

Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memvisualisasikan hasil amplifikasi DNA dengan primer target gen *Gly m Bd* 28K. Marker DNA (M) digunakan sebagai pembanding untuk menentukan ukuran fragmen yang dihasilkan.

Tujuan analisis ini adalah untuk memastikan apakah primer berhasil mengamplifikasi fragmen DNA sesuai ukuran target. Adapun visualisasi *forward* dan Hasil analisis BLAST primer *reverse* 30K106F/30K234R secara *in vitro* dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 22.



Gambar 22. Hasil Elektroforesis Primer 30K106F/30K234R (Ket. M: Marker, 1: Kedelai, 2: Gandum, 3: Jagung, 4: Kacang Tanah)

Berdasarkan hasil elektroforesis PCR yang ditunjukkan pada Gambar 22, terlihat bahwa primer *Gly m Bd* 30K menghasilkan pita DNA dengan ukuran yang sesuai dengan target amplifikasi, yaitu sekitar 128 bp. Kedua pita tampak jelas, tegas, dan berada tepat pada posisi marker yang sesuai, menunjukkan bahwa kedua primer berhasil mengenali dan mengamplifikasi sekuens targetnya secara spesifik.

Terlihat hanya satu pita tunggal pada masing-masing reaksi *singleplex* menunjukkan bahwa tidak terjadi amplifikasi non-spesifik atau pembentukan dimer primer yang dapat mengganggu hasil PCR. Hasil ini mengonfirmasi bahwa desain primer telah

berhasil dan memiliki spesifisitas yang tinggi terhadap gen target *Gly m Bd* 30K. Tidak ditemukannya pita lain di luar ukuran target juga memperkuat bahwa primer ini tidak mengikat pada sekuens DNA lain dalam template, sehingga cocok digunakan untuk deteksi spesifik alergen kedelai.

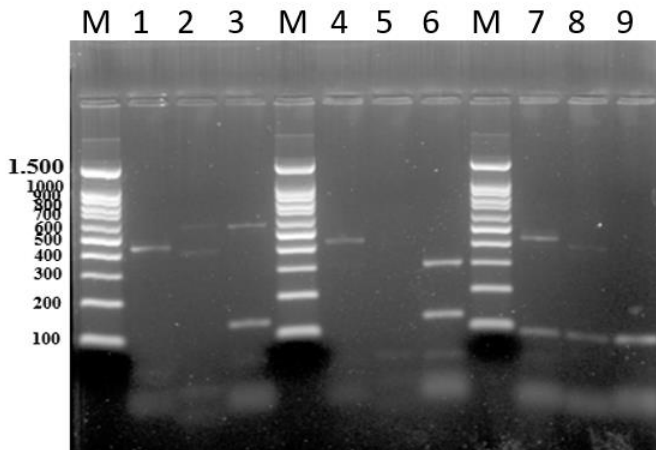
Primer tersebut sangat penting dalam mendeteksi alergen utama pada kedelai, yaitu protein 30K, yang merupakan bagian dari protein penyebab alergi *Gly m Bd* 30K. Dengan demikian, keberhasilan amplifikasi target ini menunjukkan bahwa metode *singleplex* PCR dengan primer yang telah dirancang dapat digunakan untuk identifikasi keberadaan DNA kedelai dalam sampel pangan.

4.3 Multiplex PCR

Multiplex PCR merupakan salah satu inovasi dalam teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) yang memungkinkan amplifikasi simultan dari dua atau lebih target DNA dalam satu reaksi PCR. Berbeda dengan PCR konvensional (*singleplex*) yang hanya memperbanyak satu fragmen DNA target, *Multiplex* PCR menggunakan beberapa pasang primer dalam satu tabung reaksi, sehingga menghasilkan beberapa produk amplifikasi dalam satu siklus reaksi yang sama.

Pada penelitian ini, *Multiplex* PCR digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen alergen utama kedelai yaitu *Gly m Bd* 28K dan *Gly m Bd* 30K. Penggunaan metode ini dipilih karena memiliki keunggulan dalam hal efisiensi waktu, biaya, serta kemampuan skrining yang lebih luas dibandingkan metode *singleplex*. Dengan menggabungkan beberapa primer dalam satu reaksi, *Multiplex* PCR dapat mengidentifikasi lebih dari satu target sekaligus, yang sangat penting dalam deteksi alergen pangan, terutama pada produk olahan yang kompleks dan berpotensi mengandung lebih dari satu sumber alergen.

Pada penelitian ini dilakukan uji spesifisitas dilakukan untuk memastikan pasangan primer yang digunakan pada reaksi *Multiplex* PCR hanya mengamplifikasi target gen spesifik tanpa menghasilkan pita non-spesifik atau pita ganda. Pada penelitian ini, digunakan 6 pasang primer spesifik yaitu 28K12F/28K577R, 28K949F/28K1258R dan 28K1995F/28K2080R yang ditujukan untuk gen *Gly m Bd* 28K, pasangan primer 30K1072F/30K1506R, 30K1830K/30K2228R, dan 30K106F/30K234R yang ditujukan untuk gen *Gly m Bd* 30K. Adapun visualisasi pengujian secara *Multiplex* PCR dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 23.



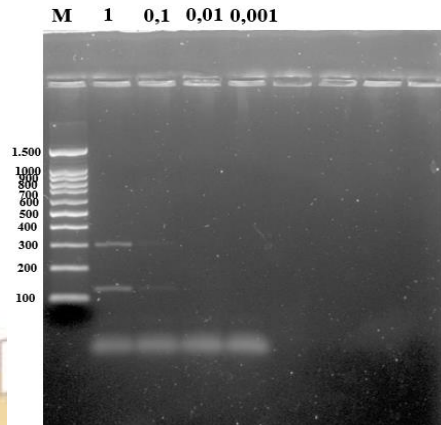
Gambar 23. Hasil Elektroforesis Spesifisitas *Multiplex* Primer 28K dan 30K

Berdasarkan hasil elektroforesis, diperoleh pita tunggal berukuran 434 bp, 398 bp dan 128 bp untuk gen *Gly m Bd* 30K dan 565 bp, 309 bp dan 85 bp untuk gen *Gly m Bd* 28K pada seluruh sampel kedelai murni. Tidak terdapat pita tambahan maupun pita non-spesifik pada hasil amplifikasi, yang menunjukkan bahwa kedua primer bekerja secara spesifik terhadap targetnya dalam kondisi *Multiplex* PCR. Keberhasilan amplifikasi dua target gen

dalam satu reaksi PCR menandakan bahwa kedua pasangan primer memiliki kompatibilitas yang baik dan tidak terjadi gangguan silang (*cross-reactivity*) antar primer.

Primer hanya menempel pada daerah spesifik gen *Gly m Bd* 28K dan 30K yang sesuai dengan target yang diharapkan, tidak terdapat indikasi penempelan di luar target, sehingga mendukung bahwa rancangan primer memiliki spesifisitas tinggi terhadap gen kedelai. Spesifisitas ini penting dalam mendeteksi alergen, karena memastikan bahwa amplifikasi PCR berasal dari gen target yang dituju dan bukan dari sekuens DNA lain yang ditujukan. Pada penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Kutateladze et al., 2021) yang mengembangkan metode *Multiplex* PCR untuk deteksi alergen kedelai, termasuk *Gly m Bd* 28k dan *Gly m Bd* 30k. Pada penelitian ini menggunakan desain primer secara mandiri untuk dua gen alergen utama pada kedelai.

Uji sensitivitas dilakukan untuk mengetahui batas deteksi minimum DNA template kedelai yang masih dapat dideteksi oleh primer *Gly m Bd* 28K dan *Gly m Bd* 30K secara bersamaan melalui teknik *Multiplex* PCR. DNA template kedelai murni diencerkan secara serial mulai dari konsentrasi 10 ng/μL, 1 ng/μL, 0.1 ng/μL, 0.01 ng/μL, hingga 0.001 ng/μL. Primer yang digunakan adalah kombinasi pasangan yang terbaik yaitu pasangan primer 28K949F/28K1258R dan 30K106F/30K234R Adapun visualisasi elektroforesis dengan pengujian *Multiplex* PCR 28k dan 30k dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 24



Gambar 24. Hasil Elektroforesis Sensitivitas Primer *Multiplex* 28K dan 30K (Ket. M: Marker, Lajur 1-4 Konsentrasi)

Berdasarkan hasil pengamatan, pita amplifikasi yang jelas dan sesuai ukuran target masih terlihat hingga konsentrasi 0,1 ng/ μ L. Namun, pada konsentrasi 0,01 ng/ μ L dan 0,001 ng/ μ L, pita amplifikasi mulai menghilang atau tampak sangat redup, yang menunjukkan bahwa batas deteksi efektif (*limit of detection*) dari *Multiplex* PCR ini adalah pada konsentrasi 0,1 ng/ μ L DNA template. Keberhasilan deteksi pada konsentrasi DNA yang rendah menunjukkan bahwa primer 28K dan 30K memiliki sensitivitas tinggi ketika digunakan secara bersamaan dalam satu reaksi PCR. Hal ini menunjukkan efektivitas primer dalam mengenali gen target meskipun jumlah template sangat sedikit. Kombinasi primer ini memiliki sensitivitas sampai 0,1 dan efisien untuk deteksi gen alergen kedelai pada konsentrasi DNA yang rendah, yang sangat penting dalam aplikasi deteksi alergen pada produk olahan pangan.

Menurut (Ballmer-Weber et al., 2007) dosis kumulatif yang menimbulkan gejala subjektif berkisar 10 mg sampai 50 g protein kedelai, untuk gejala objektif mulai dari 454 mg sampai 50 g protein kedelai. WHO menyarankan *Reference Dose* (RfD) untuk kedelai 10 mg total protein dari kedelai, tetapi (Ballmer-Weber & Vieths, 2008) menyebutkan bahwa ambang dosis protein alergi

kedelai bisa sangat variatif mulai dari puluhan mg hingga gram, tergantung gejala ringan atau berat dan individual. Hasil PCR pada penelitian ini hanya menunjukkan keberadaan gen alergen kedelai, sehingga dapat mengindikasikan adanya kontaminasi selama proses produksi. Namun, gen pada kedelai bukanlah penyebab alergi, melainkan protein yang dihasilkan dari aktivitas gen. Gen pada dasarnya hanya berupa urutan DNA yang menyimpan informasi supaya bisa berfungsi, informasi tersebut ditranskripsi menjadi mRNA, lalu proses translasi menjadi protein. Dengan demikian, PCR hanya bisa mendeteksi keberadaan gen alergen, bukan langsung proteinnya. Jadi, PCR hanya menunjukkan potensi adanya alergen, sedangkan reaksi alergi pada konsumen benar-benar terjadi ketika protein hasil aktivitas gen tersebut tertelan dalam jumlah tertentu sesuai ambang sensitivitas individu.

4.4 Produk Olahan Pangan

Pengujian konsentrasi dan kemurnian asam nukleat dilakukan menggunakan spektrofotometer mikrovolume (NanoDrop). Sampel yang diuji berasal dari kentang *frozen food*, dengan tujuan mengetahui kualitas DNA atau RNA hasil isolasi. Berdasarkan hasil pengukuran yang dilihat pada Tabel 4, diketahui bahwa konsentrasi asam nukleat yang diperoleh sebesar 19,350 ng/ μ L. Hasil isolasi DNA pada produk olahan pangan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 9. Hasil Isolasi DNA Produk Olahan Pangan

Sampel	Rasio Absorbansi A260/A280	Rasio Absorbansi A260/230	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)
Kentang	2,076	0,010	19.350

Hasil pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA kentang dapat dilihat pada Tabel 4. Sampel kentang menunjukkan rasio

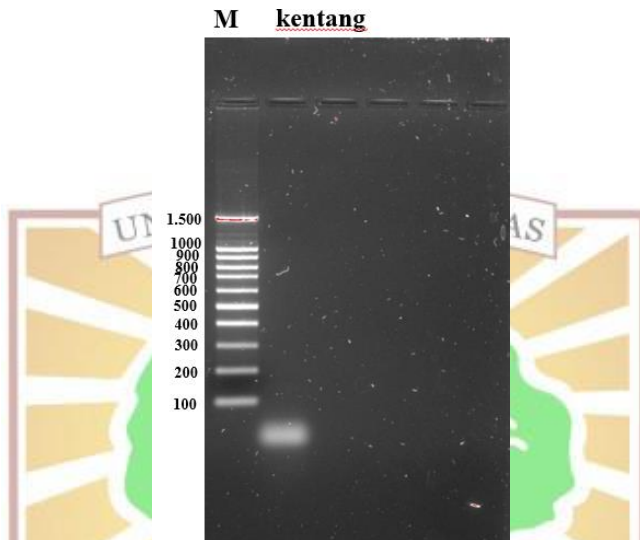
A260/A280 sebesar 2,076 rasio A260/230 sebesar 0,010 dan konsentrasi DNA sebesar 19.350 ng/ μ L. Rasio A260/A280 yang mendekati nilai ideal 1,8-2,0 menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi relatif bebas dari kontaminasi protein atau fenol. Nilai yang sedikit diatas 2,0 dapat mengindikasikan adanya kontaminasi RNA dalam jumlah kecil, namun secara umum masih dapat digunakan untuk analisis PCR (Sambrook, J. and Russell, 2001).

Rasio A260/230 pada sampel kentang rendah (0,010) jauh dari kisaran ideal 2,0-2,2. Nilai ini mengindikasikan adanya kontaminan yang menyerap pada panjang gelombang 230 nm, seperti karbohidrat, polifenol, atau residu buffer guanidin yang umum ditemukan pada jaringan umbi (Olson & Morrow, 2012). Kontaminasi ini berpotensi menghambat reaksi PCR. Konsentrasi DNA yang diperoleh sebesar 19.350 ng/ μ L tergolong memadai untuk digunakan dalam reaksi PCR, meskipun terdapat indikasi kontaminan pada rasio A260/230, hasil PCR menunjukkan bahwa DNA masih dapat diamplifikasi dengan baik.

DNA terfragmentasi pada suhu sedang 65 °C pH 4.0 selama 90 menit DNA mulai menunjukkan kerusakan, plasmid DNA berubah menjadi bentuk “nicked”, dan fragmen DNA tanaman yang lebih Panjang (>1.000 bp) mulai berkurang, meskipun fragmen pendek masih dapat terdeteksi dengan PCR. Pada suhu mendidih (100 °C, 10 menit) terjadi penurunan panjang fragmen DNA pada produk soymilk, dari ± 1.714 bp menjadi ± 1.339 bp. Ini menunjukkan meskipun DNA mengalami fragmentasi, masih ada potongan yang cukup panjang untuk dideteksi (Tian et al., 2014). Pemanasan kering pada 75–90 °C 30 menit gen *lectin* kedelai 414 bp tidak lagi terdeteksi, menunjukkan bahwa fragmen pendek pun bisa hilang bila dipanaskan cukup lama tanpa kelembapan.

Pengujian PCR dilakukan pada sampel produk olahan kentang untuk mendeteksi kemungkinan adanya kontaminasi DNA kedelai menggunakan primer spesifik gen *Gly m Bd* 28K dan 30K. Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memvisualisasikan

hasil amplifikasi DNA dengan membandingkan ukuran fragmen terhadap marker (M). Adapun visualisasi elektroforesis produk olahan pangan dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 25.



Gambar 25. Hasil Elektroforesis Produk Olahan Pangan (Ket. M: Marker, Lajur 1 Kentang)

Berdasarkan hasil elektroforesis pada Gambar 25, tidak ditemukan pita DNA pada jalur yang mewakili produk kentang olahan. Ketidakhadiran pita DNA mengindikasikan bahwa primer spesifik tidak berhasil mengamplifikasi target yang berarti kemungkinan besar produk tersebut bebas dari alergen kedelai.

Analisis kuantitas dan kualitas DNA kentang menunjukkan konsentrasi 19.350 ng/ μ L dengan rasio A260/A280 sebesar 2,076 yang mengindikasikan DNA relatif bebas dari kontaminasi protein. Namun, nilai A260/A230 rendah (0,010) jauh dibawah nilai standar yaitu ($> 2,0$) untuk DNA murni. Nilai ini menunjukkan adanya kontaminasi inhibitor seperti polisakarida dan polifenol yang umum terdapat pada umbi (ThermoScientific, 2010).

Pada kentang olahan, kandungan polisakarida dan polifenol sangat tinggi di jaringan umbi. Polisakarida dapat ikut terekstraksi

bersama DNA dan berinteraksi melalui ikatan hidrogen atau ikatan kovalen lemah, sehingga sulit dihilangkan meskipun dilakukan pencucian berulang. Keberadaan polisakarida dapat meningkatkan viskositas larutan DNA, menghambat difusi molekul, dan secara fisik menghalangi aktivitas enzim polimerase pada tahap PCR (Yu et al., 2024). Sementara itu, polifenol dapat mengalami oksidasi menjadi senyawa quinon yang bersifat reaktif, mengikat kovalen pada basa nitrogen DNA, dan menyebabkan degradasi atau penghambatan akses enzim terhadap cetakan DNA. Selain itu, sisa garam organik atau pelarut organik dari proses isolasi, seperti fenol atau guanidinium thiocyanate, juga dapat menyebabkan rasio A260/A230 menurun (Russo et al., 2022). Senyawa-senyawa ini bersifat chaotropic dan dapat mendestabilisasi enzim polimerase, sehingga mengganggu tahapan denaturasi, annealing, maupun ekstensi pada PCR.

Inhibitor tersebut dapat mengikat DNA atau mengganggu aktivitas taq polymerase, sehingga meskipun konsentrasi DNA berada dalam kisaran optimal, proses amplifikasi tidak dapat berlangsung. Rendahnya nilai A260/A230 salah satu faktor kegagalan deteksi gen target pada sampel kentang, pada rasio A260/A230 penting pada sampel tanaman, karena serat, polisakarida, dan zat lain menyerap pada 230 nm dan dapat menghambat enzim PCR (Olson & Morrow, 2012). Hasil ini menunjukkan bahwa keberhasilan *Multiplex PCR* tidak hanya bergantung pada kuantitas DNA, tetapi dipengaruhi juga oleh kemurnian DNA, terutama untuk sampel dengan bahan kompleks seperti produk olahan atau bahan baku yang kaya akan senyawa pengganggu. Oleh karena itu, perbaikan metode ekstraksi, seperti tahap pencucian tambahan dengan etanol 70% direkomendasikan untuk mengurangi kandungan polisakarida dan polifenol pada DNA dari umbi-umbian.

Berdasarkan uji spesifisitas membuktikan bahwa primer *Gly m Bd* 28K dan 30K bekerja secara efektif dan spesifik pada DNA

kedelai murni, namun kemampuan deteksi pada sampel dengan kualitas DNA rendah akan terhambat. Optimasi metode isolasi DNA yang mampu menghilangkan inhibitor menjadi langkah penting sebelum analisis *Multiplex* PCR pada bahan pangan non kedelai.



BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan :

1. Primer *Gly m Bd* 28K dan 30K berhasil mengamplifikasi target DNA kedelai secara spesifik dalam reaksi *Singleplex* dan *Multiplex* PCR.
2. Uji sensitivitas menunjukkan bahwa batas deteksi (*Limit of Detection*) untuk kombinasi primer dalam sistem *Multiplex* PCR adalah 0,1 ng/ μ L.
3. Uji spesifisitas menunjukkan tidak adanya amplifikasi silang (*cross-reactivity*) terhadap spesies non-kedelai seperti gandum, jagung, dan kacang tanah, yang membuktikan bahwa primer memiliki spesifisitas tinggi dalam sistem *Multiplex* PCR.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian disarankan :

Diperlukan pengembangan sistem *Multiplex* PCR yang mencakup alergen lain (misalnya dari gandum, susu, atau kacang) agar dapat digunakan sebagai alat deteksi alergen multispesies untuk mendukung pelabelan pangan yang aman dan transparan. Pada uji sensitivitas *Multiplex* PCR perlu dioptimalkan proses isolasi DNA, pengaturan PCR, dan rancangan primer.

DAFTAR PUSTAKA

- Akai, S. S., Oriyama, T. M., Risu, A. U., & Aitani, T. M. (2007). *Specific Detection of Soybean Residues in Processed Foods by the Polymerase Chain Reaction*. 60485(038), 3–6. <https://doi.org/10.1271/bbb.60485>
- B. Mahajan, V. (2019). Hair - A Good Source of DNA to Solve the Crime. *Archives of Clinical and Biomedical Research*, 03(04), 287–295. <https://doi.org/10.26502/acbr.50170074>
- Ballmer-Weber, B. K., Holzhauser, T., Scibilia, J., Mittag, D., Zisa, G., Ortolani, C., Oesterballe, M., Poulsen, L. K., Vieths, S., & Bindslev-Jensen, C. (2007). Clinical characteristics of soybean allergy in Europe: A double-blind, placebo-controlled food challenge study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(6), 1489–1496. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.01.049>
- Ballmer-Weber, B. K., & Vieths, S. (2008). Soy allergy in perspective. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 8(3). https://journals.lww.com/co-allergy/fulltext/2008/06000/soy_allergy_in_perspective.12.aspx
- Bedford, B., Liggans, G., Williams, L., & Jackson, L. (2020). Allergen removal and transfer with wiping and cleaning methods used in retail and food service establishments. *Journal of Food Protection*, 83(7), 1248–1260. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-025>
- BPOM RI. (2023). *Pedoman Sertifikasi Pelulusan Bets/Lot vaksin*. 1–33.
- Candra, Y., & dkk. (2011). Gambaran Sensitivitas Alergen terhadap Makanan. *Jurnal Kesehatan*, 15(4), 44–50.
- Candrea, A. M., Smaldini, P. L., Curciarello, R., Cauerhff, A., Fossati, C. A., Docena, G. H., & Petruccelli, S. (2015). Cross-reactivity between the soybean protein p34 and bovine caseins. *Allergy, Asthma Immunol. Res.*, 7, 60.
- Di Pinto, A., Forte, V. T., Conversano, M. C., & Tantillo, G. M. (2005). Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control*, 16(5), 391–394. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.04.004>

- Eling KS, D., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction(PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Informatika Medis 2014*, 93–102. <http://snimed.fit.uui.ac.id/>
- Fidel, N. and toldra. L. M. . (2011). *Safety Analysis Of Food Of Animal Origin*. CRC Press.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1). <https://doi.org/10.1101/pdb.top100388>
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 9(1), 17–29.
- Harisah, S. U. (2017). Analisis Cemarkan Daging Babi pada Sosis Sapi yang Beredar di Pasar Parung Menggunakan Metode Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR). In *UIN Syarif Hidayatullah Jakarta*.
- Holzhauser, T., Wackermann, O., Ballmer-Weber, B. K., Bindslev-Jensen, C., Scibilia, J., Perono-Garoffo, L., Utsumi, S., Poulsen, L. K., & Vieths, S. (2009). Soybean (Glycine max) allergy in Europe: Gly m 5 (β -conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.09.034>
- Iniesto, E., Jiménez, A., Prieto, N., Cabanillas, B., Burbano, C., Pedrosa, M. M., Rodríguez, J., Muzquiz, M., Crespo, J. F., Cuadrado, C., & Linacero, R. (2013). Real Time PCR to detect hazelnut allergen coding sequences in processed foods. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1976–1981. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.036>
- Kern, K., Havenith, H., Delaroque, N., Rautenberger, P., Lehmann, J., Fischer, M., Spiegel, H., Schillberg, S., Ehrentreich-Foerster, E., Aurich, S., Treudler, R., & Szardenings, M. (2019). The immunome of soy bean allergy: Comprehensive identification and characterization of epitopes. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 49(2), 239–251. <https://doi.org/10.1111/cea.13285>
- Kutateladze, T., Bitskinashvili, K., Sapojnikova, N., Kartvelishvili,

- T., Asatiani, N., Vishnepolsky, B., & Datukishvili, N. (2021). Development of *multiplex* PCR coupled DNA chip technology for assessment of endogenous and exogenous allergens in GM soybean. *Biosensors*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/bios11120481>
- López-Andreo, M., Garrido-Pertierra, A., & Puyet, A. (2006). Evaluation of Post-Polymerase Chain Reaction Melting Temperature Analysis for Meat Species Identification in Mixed DNA Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 7973–7978. <https://doi.org/10.1021/jf0615045>
- Lu, M., Jin, Y., Cerny, R., Ballmer-Weber, B., & Goodman, R. E. (2018). Combining 2-DE immunoblots and mass spectrometry to identify putative soybean (*Glycine max*) allergens. *Food and Chemical Toxicology*, 116(April), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.032>
- Luo, J., Zhang, Q., Gu, Y., Wang, J., Liu, G., He, T., & Che, H. (2022). Meta-Analysis: Prevalence of Food Allergy and Food Allergens — China, 2000–2021. *China CDC Weekly*, 4(34), 766–770. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2022.162>
- Madrid, R., García-García, A., Cabrera, P., González, I., Martín, R., & García, T. (2021). Survey of commercial food products for detection of walnut (*Juglans regia*) by two elisa methods and real time PCR. *Foods*, 10(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/foods10020440>
- Maksum, I. P., Sriwidodo, Gaffar, S., Hassan, K., Subroto, T., & Soetisojo Soemitro. (2019). Buku Teknik Biologi Molekular. In *Alqaprint* (Issue September).
- Mandaci, M., Çakir, Ö., Turgut-Kara, N., Meriç, S., Ari, Ş., & Ari, Ş. (2015). Detection of genetically modified organisms in soy products sold in turkish market. *Food Science and Technology (Brazil)*, 34(4), 717–722. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6441>
- Marmioli, N., & Maestri, E. (2007). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments*, 5(6), 147–187. <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50007-9>
- Muhammad, D. W., Kautsar, I. Al, & Latifah, E. (2023).

- Pencantuman Label Alergen dalam Pelabelan Produk Pangan Sebagai Bentuk Perlindungan Konsumen. *Jurnal Hukum Ius Quia Iustum*, 30(2), 420–441. <https://doi.org/10.20885/iustum.vol30.iss2.art9>
- Muladno. (2010). *Teknologi Rekayasa Genetika*. IPB Press.
- Mulalapele, L. T., & Xi, J. (2021). Detection and inactivation of allergens in soybeans: A brief review of recent research advances. *Grain and Oil Science and Technology*, 4(4), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2021.11.001>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Murakami, H., Ogawa, T., Takafuta, A., Yano, E., Zaima, N., & Moriyama, T. (2018). Identification of the 7S and 11S globulins as percutaneously sensitizing soybean allergens as demonstrated through epidermal application of crude soybean extract. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82(8), 1408–1416. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1460573>
- Ogawa, T., Tsuji, H., Bando, N., Kitamura, K., Zhu, Y. L., Hirano, H., & Nishikawa, K. (1993). Identification of the soybean allergenic protein, *Gly m Bd 30K*, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(6), 1030–1033. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1030>
- Olson, N. D., & Morrow, J. B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-668>
- Pedersen, M. H., Holzhauser, T., Bisson, C., & Conti, A. (2008). Soybean allergen detection methods – a comparison study. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 1486.
- Peraturan Pemerintah. (2019). Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 86 Tahun 2019 Tentang Keamanan Pangan. *Peraturan Pemerintah Tentang Keamanan Pangan*, 2019(86), 1–102.
- Platteau, C., De Loose, M., De Meulenaer, B., & Taverniers, I. (2011). Detection of allergenic ingredients using real-time

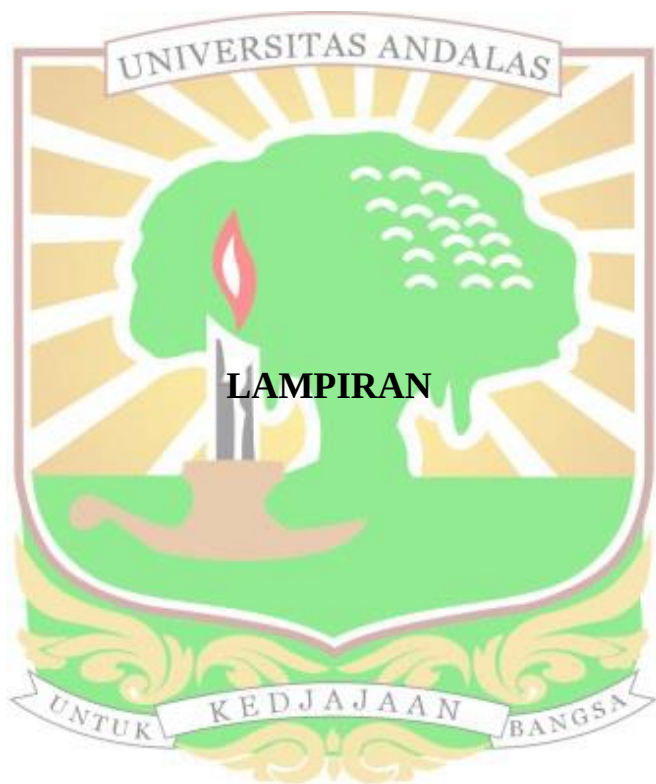
- PCR: a case study on hazelnut (*Corylus avellana*) and soy (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 10803–10814. <https://doi.org/10.1021/jf202110f>
- Pradnyaniti, D., Wirajana, I., & Yowani, S. (2013). Desain Primer secara *in silico* untuk amplifikasi fragmen Gen *rpoB* Mycobacterium tuberculosis dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal AGRITECH*, 2(3), 124–130. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/jfu/article/download/7387/5641>
- Renčová, E., Piskatá, Z., Kostelníková, D., & Tremlová, B. (2014). Simultaneous detection of peanut and hazelnut allergens in food matrices using *multiplex* PCR method. *Acta Veterinaria Brno*, 83(September), S77–S83. <https://doi.org/10.2754/avb201483S10S77>
- Renčová, E., & Tremlová, B. (2009). ELISA for detection of soya proteins in meat products. *Acta Veterinaria Brno*, 78(4), 667–671. <https://doi.org/10.2754/avb200978040667>
- Riantika Pratiwi. (2019). Pencantuman Komposisi Bahan Pada Label Makanan Kemasan Sebagai Hak Hukum Di Kota Pekanbaru. *Jurnal Gagasan Hukum*, 1(01), 63–87. <https://doi.org/10.31849/jgh.v1i01.2903>
- Rosenthal, A. (1992). PCR amplification techniques for chromosome walking. *Trends in Biotechnology*, 10(1–2), 44–48. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(92\)90167-t](https://doi.org/10.1016/0167-7799(92)90167-t)
- Russo, A., Mayjonade, B., Frei, D., Potente, G., Kellenberger, R. T., Frachon, L., Copetti, D., Studer, B., Frey, J. E., Grossniklaus, U., & Schlüter, P. M. (2022). Low-Input High-Molecular-Weight DNA Extraction for Long-Read Sequencing From Plants of Diverse Families. *Frontiers in Plant Science*, 13(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.883897>
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- Santaclara, F. J., Espiñeira, M., Cabado, A. G., Aldasoro, A., Gonzalez-Lavín, N., & Vieites, J. M. (2006). Development of a Method for the Genetic Identification of Mussel Species Belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and Other Genera.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8461–8470. <https://doi.org/10.1021/jf061400u>
- Shin, J., Kim, M.-J., & Kim, H.-Y. (2021). Development of triplex PCR for simultaneous detection of soybean and wheat. *Food Science and Biotechnology*, 30. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00926-8>
- Soares, S., Mafra, I., Amaral, J. S., & Oliveira, M. B. P. P. (2010). A PCR assay to detect trace amounts of soybean in meat sausages. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(12), 2581–2588. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02421.x>
- Sovová, T., Křížová, B., Kučera, L., & Ovesná, J. (2020). Detecting soybean and milk in dairy and soy products with post-PCR high resolution melting assays. *Czech Journal of Food Sciences*, 38(4), 209–214. <https://doi.org/10.17221/125/2020-CJFS>
- Spolidoro, G. C. I., Nyassi, S., Lisik, D., Ioannidou, A., Ali, M. M., Amera, Y. T., Rovner, G., Khaleva, E., Venter, C., van Ree, R., Worm, M., Vlieg-Boerstra, B., Sheikh, A., Muraro, A., Roberts, G., & Nwaru, B. I. (2024). Food allergy outside the eight big foods in Europe: A systematic review and meta-analysis. *Clinical and Translational Allergy*, 14(2), 1–22. <https://doi.org/10.1002/clt2.12338>
- Suseno, R., Palupi, N. S., & Prangdimurti, E. (2017). Alergenisitas Sistem Glikasi Isolat Protein Kedelai-Fruktooligosakarida (Alergenicity Properties of Soy Protein Isolate-Fruktooligosaccharide Glycation Systems). *Agritech*, 36(4), 450. <https://doi.org/10.22146/agritech.16770>
- ThermoScientific. (2010). Detection and Avoidance of Polysaccharides in Plant Nucleic Acid Extractions. *Application Note Nanodrop 2000/2000c*, 1–2. <http://www.nanodrop.com/Library/T111-Detection-and-Avoidance-of-Polysaccharides-in-Plant-Nucleic-Acid-Extractions.pdf>
- Tian, F., Guan, Q., Wang, X., Teng, D., & Wang, J. (2014). Influence of Different Processing Treatments on the Detectability of Nucleic Acid and Protein Targets in

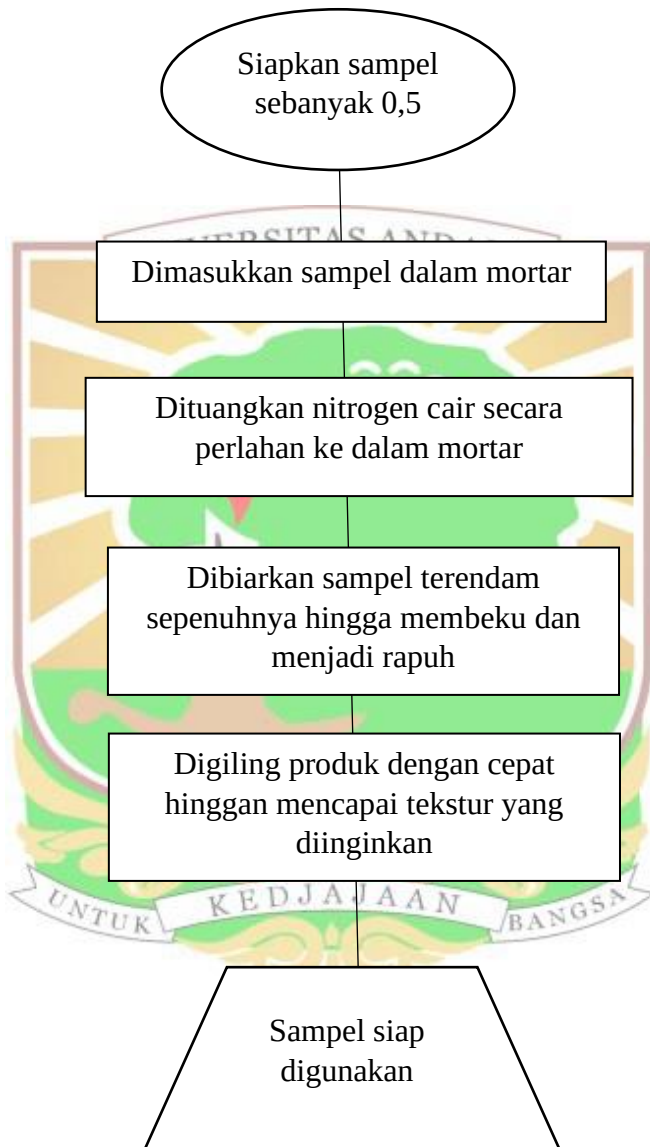
- Transgenic Soybean Meal. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(7), 3686–3700. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0760-2>
- Torp, A. M., Olesen, A., Sten, E., Stahl Skov, P., Bindslev-Jensen, U., Poulsen, L. K., Bindslev-Jensen, C., & Andersen, S. B. (2006). Specific, semi-quantitative detection of the soybean allergen *Gly m Bd 30K* DNA by PCR. *Food Control*, 17(1), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.08.005>
- Tramuta, C., Decastelli, L., Barcucci, E., Ingravalle, F., Fragassi, S., Lupi, S., & Bianchi, D. M. (2022). Detection of Peanut Traces in Food by an Official Food Safety Laboratory. *Foods*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/foods11050643>
- Trotta, M., Schönhuth, S., Pepe, T., Cortesi, M. L., Puyet, A., & Bautista, J. M. (2005). Multiplex PCR method for use in real-time PCR for identification of fish fillets from grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* species) and common substitute species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2039–2045. <https://doi.org/10.1021/jf048542d>
- Tsai, J.-J., Chang, C.-Y., & Liao, E.-C. (2017). Comparison of Alergenicity at *Gly m 4* and *Gly m Bd 30K* of Soybean after Genetic Modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(6), 1255–1262. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05135>
- Wang, B., Li, Z., Pawar, R., Wang, X., & Lin, H. (2012). PCR-based detection of traces of potentially allergenic soybean (*glycine max*) in food matrices. *Advanced Materials Research*, 343–344(September 2011), 618–624. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.618>
- Warren, C. M., Jiang, J., & Gupta, R. S. (2020). Epidemiology and Burden of Food Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 20(2). <https://doi.org/10.1007/s11882-020-0898-7>
- Weder, J. K. P. (2002). Identification of Plant Food Raw Material by RAPD-PCR: Legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4456–4463. <https://doi.org/10.1021/jf020216f>
- Yu, Y., Wang, X., Qu, R., OuYang, Z., Guo, J., Zhao, Y., & Huang,

- L. (2024). Extraction and analysis of high-quality chloroplast DNA with reduced nuclear DNA for medicinal plants. *BMC Biotechnology*, 24(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00843-8>
- Yusuf. (2010). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments*, 147–187. <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50007-9>
- Yuwono, T. (2006). *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Andi Offset.
- Zhu, L., Li, S., Sun, L., Zhao, J., Huang, J., Jiang, Y., Wan, S., Pavase, T. R., & Li, Z. (2022). Development and validation of a specific sandwich ELISA for determination of soybean allergens and its application in processed foods. *Process Biochemistry*, 117, 134–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.022>

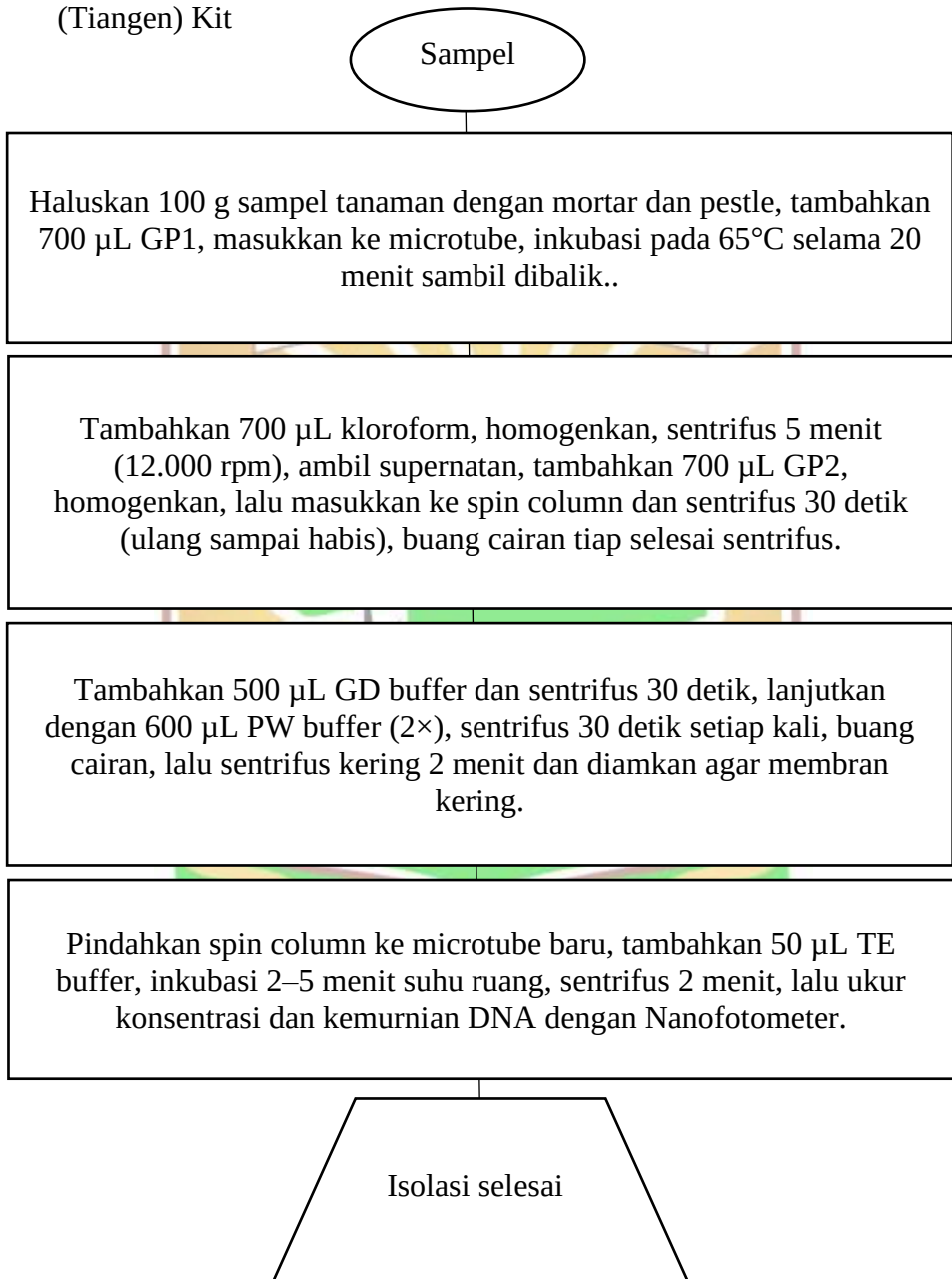




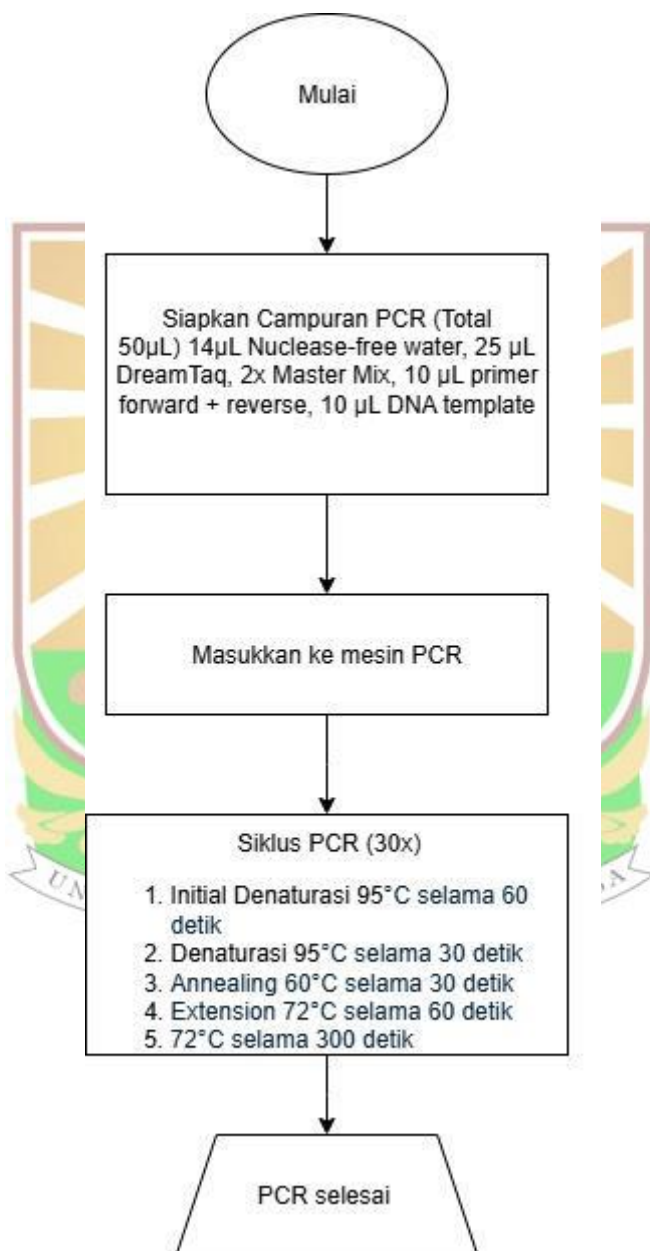
Lampiran 1. Desain Primer

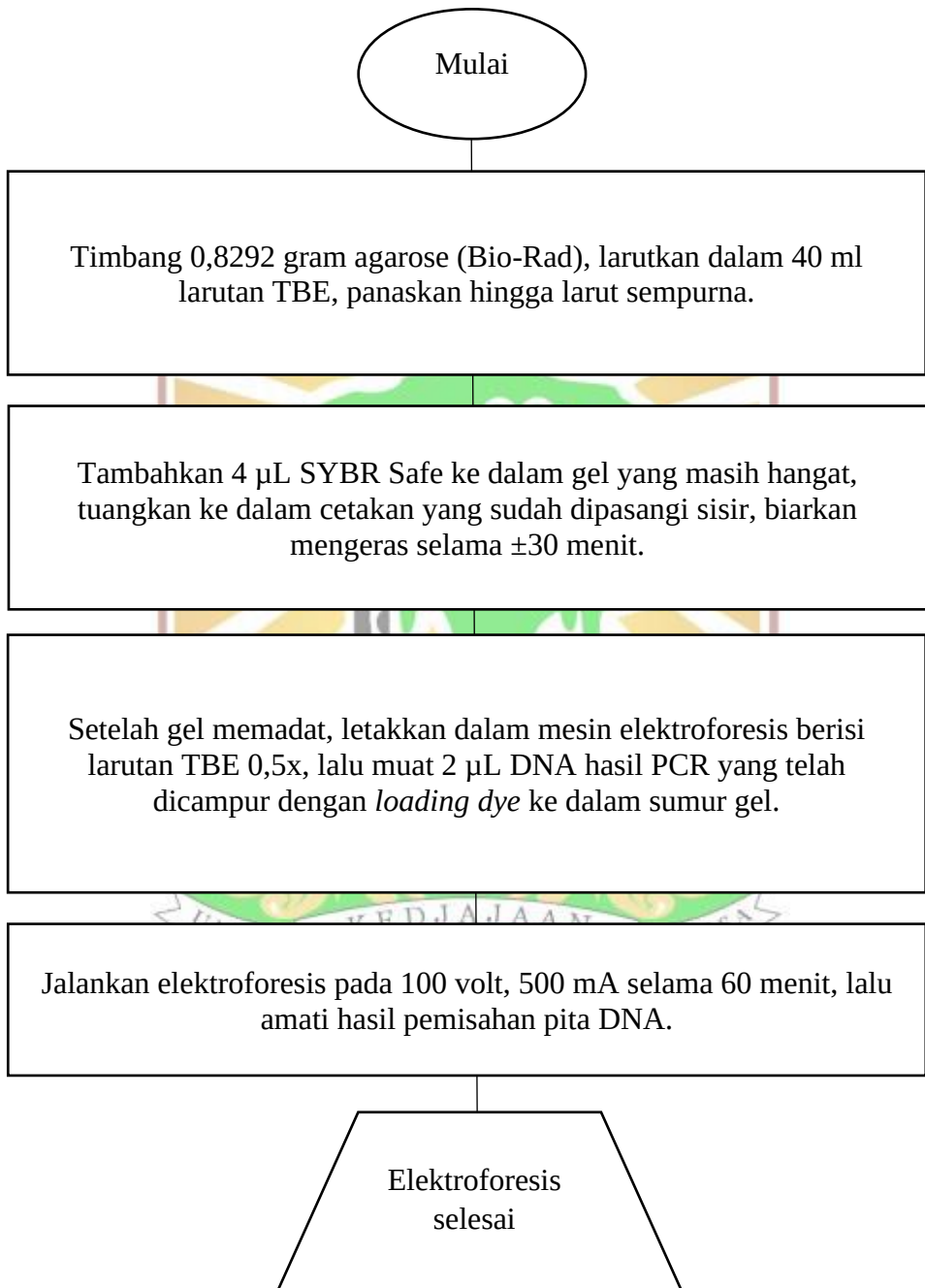
Lampiran 2. Preparasi Sampel

Lampiran 3. Isolasi DNA menggunakan Plant Genomic DNA (Tiangen) Kit



Lampiran 4. Amplifikasi DNA dengan *Multiplex* Polymerase Chain Reaction (PCR)

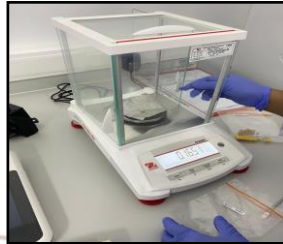


Lampiran 5. Elektroforesis

Lampiran 6. Dokumentasi



Primer



Sampel ditimbang



nitrogen cair



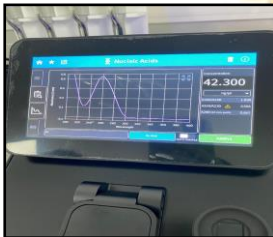
Sampel di inkubator



Sampel di sentrifus



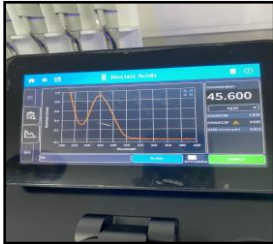
nanophotometer



**absorbansi kacang
tanah**



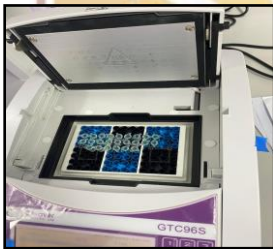
**absorbansi
gandum**



Absorbansi kedelai



Absorbansi jagung



Sampel di PCR



Agar di timbang



Agar dipanaskan



Sampel di elektroforesis

Skripsi_silvana 1. pdf.pdf

ORIGINALITY REPORT

10%

SIMILARITY INDEX

10%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	repository.uinjkt.ac.id Internet Source	4%
2	repository.unj.ac.id Internet Source	2%
3	adoc.pub Internet Source	1%
4	mdpi-res.com Internet Source	1%
5	es.scribd.com Internet Source	1%
6	docplayer.info Internet Source	1%

Exclude quotes Off

Exclude matches < 1%

Exclude bibliography On