



## IDENTIFIKASI RAJUNGAN (*Portunus pelagicus*) MELALUI PENGEMBANGAN PRIMER SPESIFIK DAN METODE LAMP KOLORIMETRI BERBASIS *FIELD DNA EXTRACTION*

Asadatun Abdullah<sup>1\*</sup>, Puji Rianti<sup>2</sup>, Sri Widy Yani<sup>1</sup>, Sabila Diana Ahmad Sauqi<sup>1</sup>,  
Dianty Dwi Nandita<sup>1</sup>, Mutiara Fajar Ananda<sup>1</sup>, Evira Lisnaina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB University  
Jalan Agatis, Lingkar Kampus IPB Dramaga, Bogor, Indonesia 16680

<sup>2</sup>Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University  
Jalan Agatis, Lingkar Kampus IPB Dramaga, Bogor, Indonesia, 16680

Diterima: 2 Agustus 2025/Disetujui: 30 Oktober 2025

\*Korespondensi: [asabdullah@apps.ipb.ac.id](mailto:asabdullah@apps.ipb.ac.id)

**Cara sitasi (APA Style 7<sup>th</sup>):** Abdullah, A., Rianti, P., Yani, S. W., Sauqi, S. D. A., Nandita, D. D., Ananda, M. F., & Lisnaina, E. (2025). Identifikasi rajungan (*Portunus pelagicus*) melalui pengembangan primer spesifik dan metode LAMP kolorimetri berbasis *field DNA extraction*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 28(10), 885-902. <http://dx.doi.org/10.17844/r3v5ys15>

### Abstrak

Produksi rajungan yang tinggi mendorong penerapan standar ketat terhadap bahan baku pada produk rajungan kaleng, terutama terkait kesalahan label (*mislabeling*). Metode identifikasi berbasis DNA merupakan pendekatan akurat untuk autentikasi spesies, namun pelaksanaan di lapangan masih terbatas karena memerlukan fasilitas laboratorium. Pengembangan metode analisis berbasis DNA yang dapat dilakukan di lapangan menjadi hal yang sangat penting untuk dilakukan. Penelitian ini bertujuan merancang primer spesifik untuk spesies *Portunus pelagicus* menggunakan markah gen *Cytochrome c Oxidase subunit I* (COI) serta mengoptimalkan waktu dan suhu amplifikasi pada metode *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) kolorimetri dengan isolat DNA dari metode *field-based extraction*. Sampel yang digunakan terdiri atas rajungan segar, rajungan olahan kaleng, serta spesies nontarget *Charybdis feriata*, *Scylla serrata*, dan *Podophthalmus vigil*. Metode yang dilakukan meliputi konfirmasi spesies target, desain dan evaluasi primer, serta uji coba secara *in vitro* set primer *P. pelagicus*. Desain primer menghasilkan satu set primer COI dengan parameter dalam rentang ideal dan spesifisitas tinggi terhadap *P. pelagicus* berdasarkan analisis *in-silico*. Uji *in vitro* menunjukkan bahwa primer mampu mendeteksi DNA *P. pelagicus* baik pada sampel segar maupun olahan dengan waktu optimum 40–60 menit pada suhu 65°C. Isolat DNA yang diperoleh melalui metode *dipstick* dan *direct lysis* juga dapat teramplifikasi, menunjukkan bahwa metode ekstraksi sederhana tersebut dapat digunakan untuk deteksi lapangan tanpa kehilangan sensitivitas. Hasil ini menunjukkan set primer yang dikembangkan terbukti spesifik untuk *P. pelagicus* dan metode LAMP yang dioptimalkan berpotensi diterapkan sebagai sistem autentikasi cepat dan portabel untuk bahan baku rajungan di lapangan.

Kata kunci: autentifikasi, COI, DNA, *mislabelling*, primer spesifik

## Identification of Crab (*Portunus pelagicus*) Using Field-Based DNA Extraction Method and Isothermal Amplification

### Abstract

High crab production encourages the implementation of strict standards for raw materials in canned crab products, particularly regarding labeling errors (i.e., *mislabeling*). DNA-based identification methods are accurate for species authentication; however, their application in the field remains limited because of laboratory equipment requirements. Therefore, the development of an on-site DNA-based analytical method is essential. This study aimed to design specific primers for *Portunus pelagicus* using the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene marker and to optimize the amplification time and temperature using the

colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method with DNA isolates obtained from field-based extraction methods. The samples included fresh crabs, canned crab products, and non-target species (*Charybdis feriata*, *Scylla serrata*, and *Podophthalmus vigil*). The methods comprised target species confirmation, primer design and evaluation, and in vitro testing of the *P. pelagicus* primer set. Primer design resulted in a COI primer set within ideal parameter ranges and high specificity to *P. pelagicus* based on in-silico analysis. In vitro assays demonstrated that the primers successfully detected *P. pelagicus* DNA in both fresh and processed samples, with an optimal reaction time of 40–60 min at 65 °C. DNA isolates obtained using dipstick and direct lysis methods were also successfully amplified, indicating that these simple extraction techniques can be applied for on-site detection without loss of sensitivity. These findings demonstrate that the developed primer set is specific to *P. pelagicus* and that the optimized LAMP method has strong potential as a rapid and portable authentication system for crab raw materials in the field.

Keywords: authentication, COI, DNA, mislabelling, specific primer

## PENDAHULUAN

Rajungan (*Portunus pelagicus*) merupakan salah satu komoditas perikanan penting di Indonesia dengan nilai ekonomi tinggi. Rajungan saat ini menjadi andalan ekspor Indonesia (Kusumaningrum *et al.* 2025), dengan kandungan protein 17,98-21,24% (Sari *et al.* 2025). Rajungan atau *blue swimming crab* merupakan jenis kepiting renang yang memiliki habitat alami hanya di laut pada substrat berpasir (Setiyowati, 2016). Hasil tangkapan rajungan sebagian besar diolah menjadi produk kaleng, sehingga berpotensi terjadi permasalahan dalam rantai pasok, salah satunya kesalahan pelabelan (*mislabeling*). Produk makanan laut mentah maupun olahan memiliki risiko tinggi terhadap substitusi spesies karena harga jual yang bervariasi antarspesies dan kesulitan identifikasi secara morfologis pada produk olahan (Silva *et al.*, 2021).

Kasus *seafood mislabeling* telah dilaporkan di berbagai negara, salah satunya di Amerika Serikat suatu perusahaan dilaporkan menjual daging rajungan impor asal Asia dan Amerika Selatan dengan label “Product of USA” senilai lebih dari 4 juta USD (WTVD, 2016). Kasus serupa juga ditemukan di kawasan Chesapeake Bay, yaitu 38% produk *crab cake* yang dijual sebagai rajungan lokal Maryland ternyata berasal dari spesies impor Asia Tenggara (Oceana, 2015). Permasalahan tersebut menunjukkan bahwa kesalahan pelabelan produk rajungan umumnya disebabkan faktor ekonomi yang berpotensi merugikan nelayan lokal dan konsumen.

Kesalahan pelabelan di Indonesia, juga juga telah ditemukan oleh Joesidawati

*et al.* (2023) di Kabupaten Tuban, Jawa Timur. Melalui analisis DNA *barcoding* dengan gen *cytochrome c oxidase subunit I* (COI), dua dari sembilan spesimen rajungan teridentifikasi sebagai *Charybdis feriata*. Hal ini mengindikasikan adanya potensi kesalahan identifikasi spesies dalam rantai pasok rajungan domestik. Kesalahan tersebut dapat menyebabkan kerugian ekonomi karena penggantian dengan spesies bernilai jual lebih rendah, sekaligus melanggar ketentuan bahan baku rajungan kaleng pasteurisasi yang telah diatur dalam SNI 6929:2016. Deteksi terhadap substitusi dan kesalahan pelabelan pada produk makanan laut merupakan langkah penting untuk melindungi hak konsumen, dengan menjamin bahwa mereka memperoleh produk yang sesuai dengan nilai yang dibayarkan (Kroetz *et al.*, 2020).

Pendekatan yang efektif untuk autentikasi spesies adalah metode identifikasi berbasis *deoxyribonucleic acid* (DNA). Namun, proses ekstraksi DNA konvensional umumnya membutuhkan biaya tinggi, waktu lama, dan fasilitas laboratorium yang memadai. Alternatif metode isolasi DNA, yaitu *direct lysis* dan *dipstick* telah dikembangkan untuk menyederhanakan tahapan analisis. Menurut Kim *et al.* (2024), metode *direct lysis* efektif untuk identifikasi DNA menggunakan teknik amplifikasi *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). Isolasi metode *direct lysis* bekerja dengan melisis sel secara langsung menggunakan buffer sederhana yang mengandung deterjen atau bahan kimia pengikat ion, sehingga asam nukleat dapat dilepaskan tanpa tahap pemurnian lanjutan.



Sementara itu, metode *dipstick* berbasis selulosa juga dinilai ideal untuk diagnostik molekuler karena bersifat portabel, biaya rendah, dan mudah diaplikasikan. Metode ini memanfaatkan prinsip adsorpsi DNA pada permukaan batang atau kertas selulosa. Tahap ekstraksi, batang selulosa dicelupkan ke dalam lisat sampel sehingga DNA berikatan dengan serat selulosa melalui interaksi elektrostatis. Batang tersebut kemudian dicuci dengan *wash buffer* untuk menghilangkan inhibitor, dan langsung digunakan sebagai *template* DNA dalam reaksi amplifikasi (Zou *et al.*, 2017). Biaya isolasi menggunakan kit komersial relatif tinggi, yaitu berkisar Rp50.000,00–Rp158.000,00 per sampel (Nandita, 2024), nilai ini belum termasuk biaya analisis lanjutan. Oleh karena itu, pengembangan metode ekstraksi sederhana menjadi solusi *cost-effective* untuk deteksi DNA di lapangan.

Metode LAMP merupakan teknik amplifikasi DNA yang berlangsung pada suhu tetap (*isothermal*) tanpa memerlukan *thermocycler*, sehingga lebih efisien dibandingkan PCR konvensional (Suwandi, 2021). Reaksi LAMP melibatkan enam wilayah pengikatan primer spesifik dan berlangsung melalui tiga tahapan, yaitu pembentukan struktur *dumbbell* (*starting material*), amplifikasi siklik, dan perpanjangan berulang (Zhang *et al.*, 2025). Prosedur metode ini sederhana dengan waktu analisis yang singkat ( $\pm 1$  jam), dan tidak memerlukan peralatan kompleks.

Berbagai penelitian telah membuktikan efektivitas LAMP sebagai metode autentikasi produk hasil perairan. Xiong *et al.* (2021) berhasil mengidentifikasi *Katsuwonus pelamis* pada produk ikan kaleng dan abon menggunakan target gen *cytochrome b* (*cyt b*) dengan spesifisitas tinggi bahkan setelah pemanasan. Ali *et al.* (2022) juga mengembangkan LAMP untuk deteksi cepat *Thunnus albacares* (*yellowfin* tuna) pada produk komersial dalam waktu kurang dari 15 menit. Komoditas rajungan juga telah dilaporkan oleh Benjakul dan Saetang (2022) yang berhasil mendeteksi beberapa spesies *Portunus spp.* baik dalam kondisi mentah maupun matang menggunakan metode LAMP. Hasil tersebut menunjukkan potensi

metode ini yang dapat diaplikasikan secara efektif untuk autentikasi bahan baku rajungan kaleng.

Desain primer merupakan salah satu tahap penting dalam keberhasilan amplifikasi LAMP. Metode LAMP menggunakan empat hingga enam primer spesifik yang menempel pada beberapa bagian spesifik dari DNA target. Masing-masing primer memiliki peran sebagai titik awal untuk menggandakan bagian DNA tertentu. Primer dalam LAMP terdiri atas dua primer luar (F3 dan B3), dua primer dalam (FIP dan BIP), serta dua primer tambahan (*loop primer*) yang dapat mempercepat proses reaksi. Gen yang umumnya digunakan sebagai target berasal dari gen yang konservatif dan dapat membedakan antarspesies, misalnya gen *cytochrome c oxidase subunit I* (COI), *cytochrome b* (*cyt b*), atau 16S rRNA (Arai *et al.*, 2023; Widayanti, 2025). Primer yang baik harus memenuhi sejumlah parameter, diantaranya kandungan basa GC sekitar 40–60% agar ikatan stabil, suhu leleh ( $T_m$ ) primer luar dan dalam relatif sama sekitar 60–65 °C, panjang primer sekitar 18–24 basa, primer tidak membentuk struktur sekunder (*hairpin* atau *dimer*), dan daerah pengikatan antar-primer tidak saling tumpang tindih (Anisa *et al.*, 2024; Abdullah *et al.*, 2019).

Teknik PCR konvensional saat ini telah banyak digunakan untuk identifikasi spesies, namun metode ini masih memiliki keterbatasan seperti biaya tinggi, waktu lama, dan ketergantungan pada fasilitas laboratorium (Suwandi, 2021). Integrasi metode isolasi DNA sederhana, yaitu *direct lysis* dan *dipstick* dengan teknik amplifikasi LAMP menjadi alternatif strategis untuk autentikasi spesies rajungan secara cepat dan akurat. Penelitian ini bertujuan merancang primer spesifik untuk spesies *P. pelagicus* menggunakan markah gen *Cytochrome c Oxidase subunit I* (COI) serta mengoptimalkan waktu dan suhu amplifikasi pada metode *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) kolorimetri dengan isolat DNA dari metode *field-based extraction*. Penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan metode autentikasi *P. pelagicus* menggunakan kombinasi isolasi DNA sederhana dan LAMP, yang diharapkan dapat mempercepat proses identifikasi,

menekan biaya, serta memungkinkan aplikasi langsung di lapangan tanpa ketergantungan pada kit komersial maupun peralatan laboratorium yang kompleks.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi DNA menggunakan Metode *Dipstick* dan *Direct lysis*

Sampel rajungan yang digunakan dalam penelitian ini, terdapat 5 sampel dengan kode (LIA, FIA, KIB, PPBG, dan RSI) dan sampel non-rajungan sebanyak 3 sampel dengan kode (SS, CFT dan PVG) yang digunakan berasal dari industri pengolahan rajungan kaleng pasteurisasi di Jawa Tengah dan Indramayu serta rajungan segar yang dibeli di toko *seafood* kota Bogor. Proses ekstraksi DNA dengan *direct lysis* menggunakan 0,05 g sampel daging, lalu ditambahkan 250 µL buffer *direct lysis*, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* V1-Plus (Biosan, Warren, USA). Sampel diinkubasi pada suhu 95 °C selama 3 menit dan disentrifugasi menggunakan *microcentrifuge* Micro 17 (Thermo Fisher Scientific, Finland) pada kecepatan 4000 ×g selama 1 menit. Supernatan yang terbentuk digunakan sebagai isolat DNA. Tahap ekstraksi dengan metode *dipstick* diawali dengan sampel daging ditambahkan 100 µL *extraction buffer*, ditumbuk selama 1 menit, lalu ditambahkan kembali 400 µL *extraction buffer*. Batang selulosa *dipstick* dicelupkan lima kali ke dalam larutan ekstraksi, sepuluh kali ke dalam *wash buffer*, dan tiga kali ke dalam *TE buffer*. Ujung batang kemudian dipotong, lalu dimasukkan ke dalam *microtube* TUBE-150-C (Axygen, California, USA), dan divortex. Konsentrasi dan kemurnian isolat DNA yang diperoleh diukur menggunakan spektrofotometer SPECTROstar Omega (Ortenberg, Jerman).

### Desain Primer Spesifik Spesies *Portunus pelagicus*

Desain primer diawali dengan pengunduhan 23 sekuens gen COI spesies target dari GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), lalu dua sekuens referensi diseleksi untuk disejajarkan menggunakan metode *Multiple Sequence Alignment* (MSA) di *software* MEGA 11. Sekuens referensi

kemudian dibandingkan dengan sekuens non-target, yaitu kepiting salib (*Charybdis feriata*), kepiting bakau (*Scylla serrata*), dan rajungan angin (*Podophthalmus vigil*) untuk mengidentifikasi daerah konservatif yang unik pada *P. pelagicus*. Wilayah ini disimpan dalam format FASTA dan dianalisis menggunakan BLAST NCBI untuk memastikan spesifisitas terhadap target. Primer selanjutnya dilakukan perancangan menggunakan *platform* NEB LAMP (<https://lamp.neb.com/>) yang menghasilkan satu set primer terdiri dari F3, B3, FIP, BIP, dan LF. Evaluasi primer dilakukan menggunakan OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) untuk menilai panjang primer, suhu leleh ( $T_m$ ), kandungan GC, dan struktur sekunder. Primer yang memenuhi seluruh parameter kelayakan dipilih untuk digunakan pada tahap amplifikasi.

### Optimasi Teknik Loop-Mediated Isothermal Amplification

Isolat DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai *template* untuk reaksi amplifikasi *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP). Reaksi LAMP dilakukan terhadap sampel target yaitu PPBG (*Portunus pelagicus* Bogor), KIB (daging olahan rajungan kaleng), LIA (daging olahan rajungan lokal), FIA (daging olahan rajungan import) atau FIB, dan RSI (rajungan segar Indramayu) (sampel tambahan), sampel non-target PVG (*Podophthalmus vigil*), SS (*Scylla serrata*), dan CFT (*Charybdis feriata*), serta *no template control* (NTC) sebagai kontrol negatif untuk menguji spesifisitas primer. Reaksi dilakukan pada volume total 12,5 µL, terdiri dari 8 µL WarmStart® Colorimetric LAMP 2× Master Mix (New England Biolabs), 0,5 µL masing-masing primer F3, B3, FIP (F2 dan F1c), BIP (B2 dan B1c) dan LF, serta 2 µL DNA *template*. Tahap optimasi dilakukan untuk menentukan suhu dan waktu inkubasi terbaik, dengan suhu antara 60-70°C dan waktu inkubasi antara 30-60 menit menggunakan alat *thermoblock*. Keberhasilan proses amplifikasi ditandai berdasarkan perubahan warna larutan reaksi dari merah muda (negatif) menjadi kuning (positif) yang menunjukkan adanya amplifikasi DNA target secara spesifik.





## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Identifikasi Molekuler dan Verifikasi Spesies Referensi *Portunus pelagicus*

Identifikasi spesies secara molekuler merupakan langkah penting dalam memastikan keakuratan sampel yang digunakan dalam penelitian ini. Tahap ini, dilakukan analisis berbasis sekuens DNA untuk mengonfirmasi bahwa sampel target berasal dari spesies *P. pelagicus*. Proses identifikasi melibatkan ekstraksi DNA, amplifikasi DNA gen target, pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA, elektroforesis serta analisis hasil sekuensing menggunakan metode *Sanger Sequencing*. Proses ekstraksi menggunakan *Geneaid* kit *extraction* memudahkan proses isolasi DNA karena proses pengikatan DNA dilakukan dalam satu tube yang memiliki matriks untuk mengikat DNA (Kamaliah, 2017). Isolat DNA hasil ekstraksi diukur konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer dengan prosedur *nanophotometer* pada panjang gelombang absorbansi  $A_{260}/A_{280}$ . Analisis kuantitatif ini digunakan untuk menentukan tingkat keberhasilan ekstraksi dengan melihat kemurnian dan nilai konsentrasi yang dihasilkan (Sophian & Syukur, 2021). Hasil kemurnian dan konsentrasi DNA dapat dilihat pada *Table 1*.

Hasil konsentrasi DNA menunjukkan data yang beragam. Nilai konsentrasi dan

kemurnian DNA terendah terdapat pada sampel SSB dengan nilai 7,6 ng/μL dan nilai kemurnian sebesar 1,56. Penyebab rendahnya konsentrasi DNA terindikasi karena saat proses ekstraksi, sampel tidak lisis dengan baik (Mulyani *et al.*, 2011). Sari *et al.* (2014) juga menyatakan bahwa faktor lain penyebab rendahnya konsentrasi DNA, disebabkan karena pengikatan DNA yang kurang maksimal saat tahap *binding* DNA. Nilai konsentrasi dan kemurnian DNA tertinggi terdapat pada sampel PVG dengan nilai 381,90 ng/μL dan nilai kemurnian sebesar 1,85. Konsentrasi DNA yang baik, yaitu memiliki konsentrasi >20 ng/μL (Utaminingsih *et al.*, 2022). Sementara, kemurnian DNA yang baik berdasarkan uji *nanodrop* memiliki kemurnian pada rentang 1,8 - 2,0 (Mollah *et al.*, 2022).

Proses selanjutnya adalah amplifikasi terhadap isolat DNA menggunakan primer universal. Keberadaan fragmen DNA, kemudian diverifikasi melalui elektroforesis gel agarosa. Isolat yang berhasil teridentifikasi pada tahap ini adalah sampel PPBG dan LIA. *Output* dari *Sanger Sequencing* berupa kromatogram dan sekuens DNA. Sekuens DNA yang berhasil teridentifikasi adalah sampel PPBG dan LIA. Hasil konfirmasi menggunakan BLAST menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut merupakan rajungan dengan spesies target yaitu *P. pelagicus*. Berdasarkan sembilan sampel yang dianalisis,

Table 1 DNA concentration and purity of samples using the spin column method

Tabel 1 Konsentrasi dan kemurnian DNA sampel metode *spin column*

Number	Sample code	DNA concentration (ng/μL)	$A_{260}/A_{280}$	Extraction methods
1	SSB	7.60	1.56	Spin column
2	PVG	381.90	1.85	Spin column
3	CFT	38.40	1.80	Spin column
4	SS	159.02	1.78	Spin column
5	PPBG	114.00	1.81	Spin column
6	PP	65.78	1.76	Spin column
7	LIA	38.29	1.80	Spin column
8	KIB	58.28	1.78	Spin column
9	FIA	39.91	1.85	Spin column

hanya dua isolat yang berhasil teridentifikasi sebagai *P. pelagicus* dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya primer universal gagal mengamplifikasi karena adanya variasi genetik pada daerah penempelan primer.

Hal ini juga dapat disebabkan karena fragmentasi gen target pada sampel olahan, misalnya KIB dan FIA. Xiong *et al.* (2019) menyatakan bahwa fragmentasi DNA menyebabkan hanya sebagian kecil sekuens target yang masih utuh, meskipun nilai kemurnian DNA berada dalam rentang ideal, faktor perbedaan komposisi jaringan dapat memengaruhi hasil amplifikasi. Sekuens yang telah terverifikasi selanjutnya digunakan dalam pensejajaran (*alignment*) bersama sekuens lain dari pangkalan data GenBank NCBI untuk proses desain primer. Hasil BLAST dapat dilihat pada *Table 2*.

Berdasarkan hasil analisis BLAST sampel LIA dan PPBG memiliki tingkat kemiripan sekuens DNA yang tinggi dengan spesies *P. pelagicus*, masing-masing sebesar 98,62% dan 99,25%. Keduanya menunjukkan nilai *e-value* sebesar 0,0 yang menunjukkan bahwa kecocokan tersebut sangat signifikan dan bukan terjadi secara kebetulan. Nomor akses GenBank yang menjadi acuan adalah KF793331.2 untuk sampel LIA dan KP976341.1 untuk sampel PPBG. Data ini diakses pada tanggal 24 Oktober 2024. *Percent identity* >98% mengindikasikan bahwa kedua sampel berasal dari spesies yang sama atau sangat serupa (Su'udi *et al.*, 2023; Suphandi *et al.*, 2023).

### Hasil Analisis *Multiple Sequence Alignment* (MSA) Sekuens Target dan Non-Target

Sekuens yang telah diunduh merupakan bagian dari *complete genome gene partial coding sequences* (CDS) dan *Cytochrome c*

*Oxidase subunit I* (COI) spesies target dan non-target. Novianti *et al.* (2019) menyatakan bahwa sekuens CDS memiliki daerah lestari yang tinggi sehingga dapat dibuat sebagai acuan untuk desain primer. Spesies target yang digunakan dalam penelitian ini adalah *P. pelagicus* yang diunduh dari GenBank serta dua sekuens dari hasil *Sanger sequencing*. Sampel LIA dan PPBG telah divalidasi menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dan diketahui spesiesnya yaitu *P. pelagicus*. Proses MSA bertujuan menemukan kesamaan atau daerah lestari antar sekuens target dan mengidentifikasi perbedaan basa antar sekuens target dan non-target. Sekuens *P. pelagicus* dengan markah gen COI yang diunduh memiliki panjang basa yang berkisar antara 573 - 1253 bp. Proses MSA pertama dilakukan pada 25 sekuens target *P. pelagicus* menghasilkan sekuens konsensus COI sepanjang 561 bp.

Hasil MSA kedua, yaitu sekuens konsensus *P. pelagicus* yang disejajarkan kembali bersama sekuens pembandingan spesies *Podophthalmus vigil*, *Charybdis feriata* dan *Scylla serrata*. Hasil MSA kedua menghasilkan sekuens konsensus COI sepanjang 546 bp. Sekuens target dan pembandingan diunduh dari GenBank dan disimpan menggunakan format FASTA. Hasil MSA kedua menghasilkan sekuens konsensus COI sepanjang 546 bp. Masing-masing simbol bintang menandakan basa yang sepenuhnya identik dan disebut sebagai daerah lestari. Persentase daerah lestari didapatkan dari hasil jumlah daerah lestari dibagi dengan panjang sekuens di kali 100% sehingga dapatkan persentase tersebut.

Analisis MSA pada daerah lestari desain primer gen COI menunjukkan tingkat kelestarian sebesar 93,9% terhadap sekuens target *P. pelagicus* dan menandakan bahwa wilayah ini memiliki tingkat kelestarian yang

Table 2 BLAST results of sanger sequencing samples LIA and PPBG  
 Tabel 2 Hasil BLAST sampel sanger sekuensing LIA dan PPBG

Sample	Genbank accession number	Species	Percentage identify	E-value	Access date
LIA	KF793331.2	<i>Portunus pelagicus</i>	98.62%	0.0	24/10/2024
PPBG	KP976341.1	<i>Portunus pelagicus</i>	99.25%	0.0	24/10/2024



tinggi. Perbandingan dengan spesies non-target menghasilkan nilai kelestarian berturut-turut sebesar 44,6% (*Podophthalmus vigil*), 35,3% (*Charybdis feriata*), dan 30,4% (*Scylla serrata*). Daerah target tersebut selanjutnya diidentifikasi menggunakan uji homolog dengan *tools* BLAST untuk menilai parameter kesesuaian yang dapat menunjukkan tingkat homologi pada daerah tersebut. Hasil uji homolog menggunakan BLAST daerah target desain primer ditunjukkan pada *Table 3*.

Daerah target desain primer terhadap sekuens basa target menunjukkan tingkat homologi yang tinggi untuk sekuens target pada desain primer. Hasil *Basic local alignment search tool* (BLAST) menunjukkan dari total 250 sekuens yang ditampilkan terdapat 248 sekuens target (*P. pelagicus*). Dua Sekuens lain merupakan sekuens *Portunus segnis* yang merupakan jenis kepiting renang dalam famili Portunidae. Cakupan kueri merupakan persentase kesamaan antara panjang sekuens sampel dengan database pada GenBank. Semakin tinggi persentase menunjukkan tingginya cakupan *query* dan pencocokan urutan target sekuens.

### Desain Primer dan Spesifisitas Primer

Desain primer merupakan tahapan penting dalam pengembangan metode deteksi berbasis DNA misalnya *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP). LAMP sangat bergantung pada spesifisitas primer terhadap sekuens target. Desain primer dilakukan menggunakan *tools* NEBLAMP dengan input berupa sekuens hasil MSA kedua. Akurasi dan efektivitas primer

yang dihasilkan, dilakukan analisis lebih lanjut secara *in-silico* menggunakan *tools* *Oligoanalyzer*. Parameter yang diperhatikan dalam desain primer adalah suhu leleh ( $T_m$ ), % GC, dan panjang basa. Pemilihan daerah konservatif yang spesifik ini menjadi dasar dalam penyusunan set primer LAMP yang terdiri dari lima jenis primer yaitu primer F3, B3, FIP, BIP dan primer LF.

Penentuan persentase kandungan GC yang optimal sangat diperlukan pada perancangan sebuah primer. Kandungan %GC merupakan persentase basa guanin-sitosin dalam primer. Secara keseluruhan pada set primer kandungan %GC berada pada rentang 36-55%. Kandungan %GC terendah berada pada primer B2 yaitu 36% sedangkan %GC tertinggi berada pada primer LF yaitu 55%. Primer dengan kandungan GC tinggi lebih stabil dibandingkan dengan primer dengan kandungan GC rendah (Nugraha *et al.*, 2022). Kandungan %GC berfungsi membuat primer lebih stabil karena terdapat ikatan hidrogen yang kuat pada pasangan G dan C, oleh karena itu kandungan %GC disarankan berkisar antara 40% hingga 60% (Anisa *et al.*, 2024). Primer yang memenuhi kriteria tersebut adalah primer LF, F2, F1C, B1c, dan B3. Primer yang masih belum sesuai kriteria adalah primer F3 dan B2 dengan nilai %GC sebesar 39,1% dan 36%. Persentase GC dengan rentang 40-60% bertujuan penempelan primer dengan DNA kuat (Prakoso *et al.*, 2017).

*Melting temperature* ( $T_m$ ) atau suhu leleh didefinisikan sebagai suhu dimana satu dari bagian DNA untai ganda akan terpisah menjadi untai tunggal atau *single stranded*. Nilai  $T_m$  yang dihasilkan dari set primer terbaik

Table 3 Homology test results using BLAST for primer design target region  
Tabel 3 Hasil uji homolog menggunakan BLAST daerah target desain primer

Parameter	COI gene marker	
	Target	Non-target
Query coverage	100-94 %	-
Max score	987	-
Total score	987	-
E-value	0.0	-
Percentage of identity	98.08%	-

berada pada rentang 60,2-64,8 °C. Nilai  $T_m$  terendah berada pada di primer F3 dengan nilai 60,2 °C dan tertinggi berada pada primer F1c dengan nilai 64,8 °C. Kriteria standar suhu leleh pada perancangan primer adalah rentang 52-68 °C. Nilai  $T_m$  yang terlalu rendah akan menyebabkan terdeteksinya sebuah produk yang tidak spesifik akibat adanya ketidakcocokan pasang basa, sedangkan nilai  $T_m$  yang terlalu tinggi pada rancangan primer dapat menyebabkan struktur sekunder (Abdullah *et al.*, 2019). Nilai  $T_m$  juga akan berpengaruh pada suhu denaturasi untai *double helix* DNA (Maitriani *et al.*, 2015). Panjang primer juga berpengaruh terhadap penempelan primer. Primer yang memiliki panjang lebih dari 30 pasang basa akan menyebabkan penempelan primer menjadi tidak spesifik (Saraswati *et al.*, 2019). Primer set awal yang terpilih telah memenuhi syarat standar dari panjang primer yaitu berkisar antara 20 hingga 25 bp.

### Spesifisitas primer secara *in-silico*

Uji spesifisitas primer secara *in-silico* dilakukan dengan menggunakan BLAST untuk mengecek apakah setiap primer hanya cocok dengan DNA *P. pelagicus* (spesies target) dan tidak cocok dengan DNA spesies lain (non-target). Setiap urutan primer dimasukkan ke database NCBI untuk melihat hasil pencocokan (hits). Primer dianggap spesifik jika hanya cocok dengan *P. pelagicus* dan tidak menunjukkan kecocokan tinggi dengan spesies seperti *Charybdis feriata*, *Scylla serrata*, atau *Podophthalmus vigil*. Spesies

tersebut merupakan spesies yang memiliki nilai ekonomis yang lebih rendah (Benjakul dan Saetang 2022). Uji ini memastikan bahwa primer tidak akan mengikat ke DNA selain target saat digunakan di laboratorium. Hasil Uji spesifisitas primer dapat dilihat pada Table 4. Pensejajaran menggunakan BLAST dilakukan untuk mencari kesamaan urutan terhadap beberapa pangkalan data yang terdapat di GenBank NCBI (Ramadhani *et al.*, 2023).

Berdasarkan hasil uji spesifisitas primer LAMP gen COI melalui analisis BLAST pada Table 4, diketahui bahwa sebagian besar primer menunjukkan spesifisitas yang tinggi terhadap spesies target *Portunus pelagicus*. Jumlah hits yang cukup tinggi, terutama primer COI-B3 (162 hits) dan COI-B2 (160 hits). Jumlah hits pada spesies non-target relatif rendah atau tidak ditemukan sama sekali, hal ini mencerminkan spesifisitas primer yang baik. Seluruh primer juga tidak menunjukkan spesies non-target seperti *Charybdis feriata*, *Podophthalmus vigil*, dan *Scylla serrata*.

Hasil tersebut mengindikasikan bahwa desain primer sudah cukup selektif terhadap sekuens milik *P. pelagicus*, meskipun berasal dari famili yang sama (Portunidae). Keberhasilan ini merupakan indikator penting dari desain primer yang baik, seperti yang dijelaskan oleh Kaltenbrunner *et al.* (2022) yang menyatakan spesifisitas molekuler harus diuji tidak hanya terhadap spesies jauh, tetapi juga terhadap spesies yang secara filogenetik dekat.

Table 4 Primer specificity toward *Portunus pelagicus*  
Tabel 4 Spesifisitas primer terhadap spesies *Portunus pelagicus*

Primer		Hits	Target species	Hits	Non-target
COI – F3	F3	147	<i>Portunus pelagicus</i>	1	<i>Majidae</i> sp.
COI – B3	B3	162		-	-
COI – F2	FIP	104		4	<i>Portunus segnis</i>
COI – F1c		22		24	<i>Cordyla</i> sp.
COI – B2	BIP	160		8	<i>Portunus segnis</i>
COI – B1c		115			<i>Lutjanus vivanus</i>
COI – LF	LF	155		6	<i>Akkermansia muxhipila</i>

Note: Cytochrome c Oxidase subunit I (COI), (-) no non-target species





### Konsentrasi dan Kemurnian DNA *Field-Based DNA Extraction*

Sampel daging diekstraksi menggunakan dua metode *field-based DNA extraction*, yaitu *direct lysis* dan *dipstick*. Parameter yang dianalisis meliputi konsentrasi DNA (ng/μL) dan rasio  $A_{260}/A_{280}$  sebagai indikator kemurnian. Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA dari sampel target dan non-target dapat dilihat pada *Table 5*. Data ini digunakan untuk melihat masing-masing metode dalam menghasilkan DNA yang cukup dan murni untuk analisis molekuler lebih lanjut. Perbandingan hasil dari kedua metode ini memberikan gambaran awal mengenai kelebihan dan keterbatasan masing-masing teknik, terutama dalam konteks penggunaannya di lapangan.

Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA menunjukkan metode *direct lysis* secara umum menghasilkan konsentrasi DNA (ng/μL) yang lebih tinggi dibandingkan metode *dipstick*, dengan nilai tertinggi pada sampel FIA 1453,34 ng/μL dan CFT 1328,63 ng/μL. Hal tersebut dapat terjadi karena tidak ada proses purifikasi atau pemurnian pada metode ini. Nilai kemurnian DNA (rasio  $A_{260}/A_{280}$ ) dari *direct lysis* yang berkisar antara 1,05 hingga 2,01, menunjukkan adanya variasi yang cukup besar dan kemungkinan kontaminasi protein pada beberapa sampel. Umumnya rasio  $A_{260}/A_{280}$  yang ideal untuk DNA murni berada pada kisaran 1,8–2,0. Nilai di bawah 1,8 menandakan kemungkinan

kontaminasi protein, fenol, atau senyawa organik lainnya, sedangkan nilai di atas 2,0 dapat mengindikasikan kontaminasi RNA (Pak dan Roh 2020; Pratiwi dan Widodo 2020).

Nilai rasio di bawah rentang ideal dapat menurunkan efisiensi PCR karena inhibitor misalnya protein atau garam dapat mengganggu kerja enzim Taq polimerase, sedangkan rasio yang terlalu tinggi juga dapat memengaruhi akurasi pengukuran konsentrasi DNA dan menyebabkan hasil amplifikasi yang tidak konsisten (Khairunisa *et al.*, 2018). Metode *dipstick* menghasilkan konsentrasi DNA yang lebih rendah dengan rata-rata 30–50 ng/μL dan memiliki rasio  $A_{260}/A_{280}$  yang lebih rendah pada rentang 0,50–0,69, yang mengindikasikan kemurnian rendah. Rendahnya kemurnian tersebut diduga disebabkan oleh kontaminasi residu bahan kimia atau protein dan keterbatasan pemisahan pada metode ekstraksi sederhana ini.

Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Aula *et al.* (2023), yang menyatakan bahwa metode *dipstick* sangat praktis dan cepat untuk aplikasi lapangan, namun memiliki keterbatasan dalam hal kemurnian DNA jika dibandingkan dengan metode konvensional. Metode ekstraksi *dipstick* tidak menghasilkan residu bahan kimia yang terdenaturasi akibat inkubasi seperti garam yang dapat menghambat reaksi amplifikasi (Mason & Botella 2020).

Table 5 Concentration and purity of field-based DNA extraction

Tabel 5 Konsentrasi dan kemurnian field-based DNA extraction

Sample	Direct lysis		Dipstick	
	DNA concentration (ng/μL)	$A_{260}/A_{280}$	DNA concentration (ng/μL)	$A_{260}/A_{280}$
CFT	1328.63	1.90	34.38	0.56
PVG	1132	1.57	25.61	0.50
SSB	775.09	1.52	34.06	0.64
SS	734.475	2.01	50.91	0.69
LIA	714.785	1.72	27.90	0.51
FIA	1453.34	1.05	29.70	0.55
KIB	926.79	1.42	30.42	0.54
PPBG	599.64	1.44	38.11	0.58

## Evaluasi In Vitro Desain Primer LAMP

Evaluasi in vitro terhadap desain primer LAMP dilakukan menggunakan sampel kontrol positif yang telah terkonfirmasi sebagai spesies target *Portunus pelagicus* dengan kode sampel PPBG dan LIA. Kedua sampel tersebut sebelumnya diisolasi menggunakan metode *spin column* untuk memperoleh DNA murni sebagai pembanding dalam pengujian spesifisitas primer. Metode *spin column* merupakan teknik ekstraksi DNA komersial dengan waktu pengerjaan sekitar 45 menit dan dikenal mampu menghasilkan DNA dengan tingkat kemurnian serta konsentrasi tinggi, dengan rasio A260/A280 berkisar antara 1,8–2,0 dan konsentrasi optimal 20–100 ng/μL (Yang *et al.*, 2024). DNA hasil metode ini digunakan sebagai kontrol positif karena kualitasnya yang baik dan minim risiko kontaminasi, meskipun memiliki kelemahan berupa waktu ekstraksi yang relatif lama.

Sementara proses amplifikasi LAMP pada sampel uji dilakukan menggunakan isolat DNA yang diisolasi dengan metode *direct lysis* dan *dipstick* untuk mengevaluasi efektivitas kedua metode dalam menghasilkan DNA yang dapat digunakan pada tahap amplifikasi. Metode *direct lysis* bekerja dengan melisis sel dan melepaskan asam nukleat secara langsung menggunakan agen pelepas nukleat. Isolat DNA hasil metode ini dapat langsung digunakan sebagai *template* pada tahap amplifikasi, tanpa proses pemurnian tambahan, sehingga mempercepat proses analisis (Yang *et al.*, 2024). Sampel makanan umumnya memiliki komposisi kompleks yang berpotensi mengandung inhibitor, namun pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa isolat DNA hasil *direct lysis* tetap memenuhi kualitas minimum untuk amplifikasi dengan rasio kemurnian sekitar 1,7–1,9. Keunggulan metode ini terdapat pada waktu ekstraksi metode hanya sekitar 6 menit. Selain itu, metode *dipstick* yang memanfaatkan batang selulosa untuk mengikat DNA yang kemudian tertahan selama tahap pencucian menggunakan *wash buffer*, memiliki waktu ekstraksi yang lebih singkat, yaitu sekitar 4 menit. Hasil in vitro primer *P. pelagicus* terhadap sampel target dan non-target dapat

dilihat pada *Figure 1*.

Pengujian LAMP secara spesifik dapat mendeteksi spesies target dalam bentuk segar maupun olahan. Pengujian LAMP terhadap kontrol positif mampu terdeteksi dalam waktu 30 menit pada suhu 65°C yang ditandai dengan perubahan warna dari merah menjadi kuning. Wilopo *et al.* (2015) menyatakan bahwa suhu 65°C merupakan kondisi optimum bagi enzim DNA polimerase untuk mempertahankan aktivitas amplifikasi secara isothermal. DNA untai ganda pada kondisi tersebut, berada dalam keadaan keseimbangan dinamis, yaitu kondisi di mana DNA tidak sepenuhnya terdenaturasi, tetapi mengalami proses buka - tutup ikatan hidrogen secara berulang dan cepat. Kondisi ini memungkinkan primer menempel pada sekuens komplementernya dan menginisiasi sintesis DNA baru.

Sampel LIA (rajungan lokal) yang diisolasi menggunakan metode *dipstick* menunjukkan perubahan warna paling cepat, yaitu pada menit ke-30. Hal ini dapat disebabkan oleh kualitas DNA yang baik akibat kondisi sampel yang masih segar dan minim perlakuan pengolahan. Sebaliknya, sampel lain, yaitu KIB (rajungan kaleng) dan FIA (rajungan impor) memerlukan waktu lebih lama untuk menunjukkan reaksi positif, kemungkinan karena proses penyimpanan dan pemanasan selama pengolahan menyebabkan degradasi DNA atau meningkatkan kandungan inhibitor. Faktor-faktor tersebut berpengaruh terhadap efisiensi amplifikasi LAMP, hal ini juga dilaporkan dalam penelitian Estinia *et al.* (2025) yang memperoleh hasil penyimpanan dan pengolahan ikan sebelum isolasi dapat menurunkan kualitas DNA yang dihasilkan.

Sampel KIB (rajungan kaleng) dan FIA (rajungan impor) yang diisolasi menggunakan *dipstick* maupun *direct lysis* menunjukkan perubahan warna oranye pada menit ke-30 yang menandakan amplifikasi belum sempurna. Sampel ini teramplifikasi secara sempurna baru pada menit ke-60 yang ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning. Perbedaan waktu deteksi pada sampel uji dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor pertama, proses pemanasan atau pasteurisasi selama pengolahan dapat menyebabkan degradasi DNA, sehingga

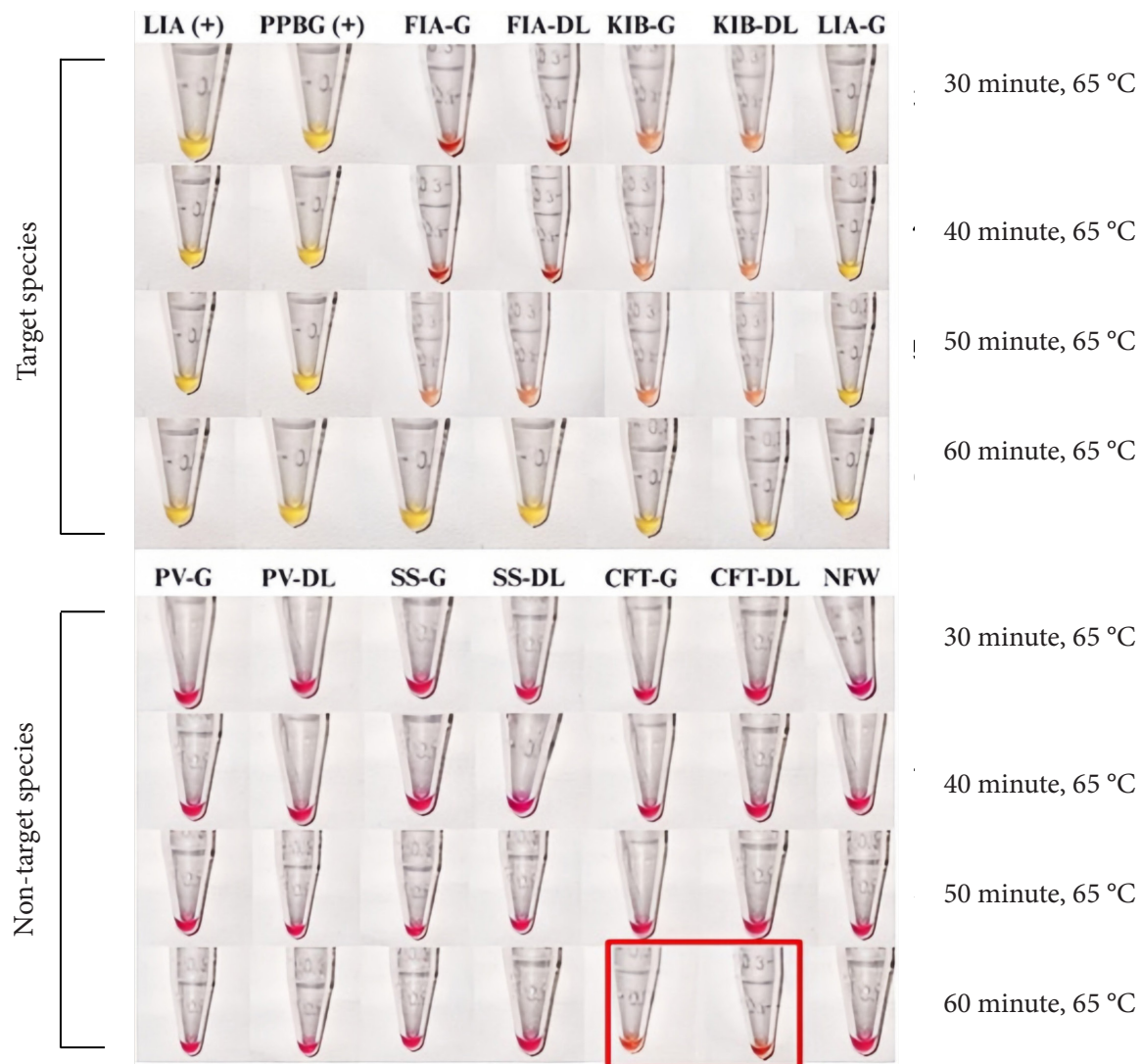


Figure 1 LAMP assay results of DNA isolates from dipstick and direct lysis methods. Isolation methods: DL (direct lysis); G (dipstick); + (spin column). LIA (Local Crab); FIA (imported crab); KIB (canned crab); PPBG (*P. pelagicus* Bogor); PV (*Podophthalmus vigil*); SS (*Scylla serrata*); CFT (*Charybdis feriata*). Red square: False positive on non-target sequences

Gambar 1 Hasil pengujian LAMP isolat DNA dipstick dan direct lysis. Metode isolasi DL (*direct lysis*); G (*dipstick*); + (*spin column*). LIA (rajungan Lokal); FIA (rajungan impor); KIB (rajungan kaleng); PPBG (*P. pelagicus* Bogor), PV (*Podophthalmus vigil*); SS (*Scylla serrata*); CFT (*Charybdis feriata*). Kotak merah: *false positif* pada sekuens non-target.

jumlah DNA yang masih utuh berkurang dan waktu amplifikasi menjadi lebih lama. Faktor kedua, bahan tambahan atau sisa hasil pengolahan, diantaranya garam dan lemak teroksidasi dapat berperan sebagai inhibitor enzim DNA polimerase (Alhamid *et al.*, 2023). Faktor selanjutnya, terkait hasil ekstraksi isolat DNA, di mana pada metode

*spin column* isolat DNA memiliki kemurnian yang lebih tinggi.

Pengujian LAMP dengan primer spesifik *P. pelagicus* tidak menunjukkan amplifikasi pada sampel uji *Podophthalmus vigil* (PV) dan *Scylla serrata* (SS). Namun, pada sampel *Charybdis feriata* (CFT) muncul perubahan warna oranye setelah 60 menit

inkubasi, sehingga dikategorikan sebagai *false positive*. *False positive* pada LAMP umumnya muncul pada waktu inkubasi yang panjang dan dapat disebabkan oleh beberapa mekanisme non-spesifik, misalnya *mispriming* antar primer, pembentukan primer-dimer, atau hasil penggandaan DNA yang tidak berasal dari target sebenarnya (*artifact amplification*), karena konsentrasi primer yang tinggi. Oleh karena itu, spesifisitas desain primer tetap menjadi faktor kunci untuk mencegah hasil non-spesifik (Augustine *et al.*, 2020).

Perbedaan antara hasil *in-silico* dengan hasil laboratorium dapat terjadi karena beberapa faktor, diantaranya analisis *in-silico* umumnya hanya memeriksa kesesuaian sekuens linear tetapi tidak selalu memperhitungkan kondisi eksperimen nyata, misalnya konsentrasi primer yang tinggi, struktur sekunder target atau primer, matriks sampel yang kompleks, atau fragmentasi DNA akibat perlakuan pengolahan. Reaksi LAMP, meskipun pada urutan DNA non-target hanya memiliki kesamaan sebagian kecil dengan primer, indikasi amplifikasi non-spesifik tetap dapat terjadi, terutama bila waktu inkubasi terlalu lama atau konsentrasi primer terlalu tinggi. Kondisi tersebut tidak dapat diprediksi melalui analisis *in-silico*, misalnya BLAST.

*Mismatch* pada ujung 3' merupakan faktor penting karena menjadi titik awal penambahan nukleotida oleh DNA polimerase. Ketidaksesuaian pada posisi ini dapat menurunkan efisiensi inisiasi amplifikasi dan mengurangi kemungkinan terjadinya *mispriming* (Hardinge & Murray 2019). Namun, *mismatch* pada ujung 3' tidak satu-satunya penyebab munculnya hasil positif palsu. Metode LAMP, desain primer yang kompleks, yang terdiri atas *inner* primer FIP/BIP, *outer* primer, dan *loop* primer, serta penggunaan konsentrasi primer yang tinggi dapat memungkinkan terjadinya amplifikasi non-spesifik meskipun terdapat *mismatch*. Oleh karena itu, kemunculan sinyal positif pada sampel *Charybdis feriata* (CFT) kemungkinan bersifat multifaktorial, meliputi kesamaan parsial pada domain primer tertentu, pembentukan struktur sekunder yang mendukung hibridisasi parsial, kondisi

reaksi pada waktu inkubasi atau komposisi buffer, maupun kemungkinan adanya kontaminasi silang.

### Modifikasi Primer F3 berdasarkan Analisis *Mismatch* pada Sekuens Non-target

Spesifisitas primer pada metode amplifikasi merupakan faktor krusial karena primer harus mampu mengenali dan berikatan secara komplementer hanya dengan sekuens target pada DNA, tanpa mengikat sekuens non-target. Primer dengan spesifisitas rendah berpotensi menghasilkan *false positive*, yaitu amplifikasi sekuens non-target akibat kemiripan susunan basa yang tinggi. (Ye *et al.*, 2012). Kondisi ini menyebabkan amplifikasi menjadi tidak spesifik, sehingga produk yang dihasilkan tidak lagi merepresentasikan target sebenarnya.

Analisis *mismatch* dilakukan untuk mengidentifikasi dan evaluasi ketidaksesuaian (*mismatch*) antara primer dengan sekuens target maupun non-target. Posisi *mismatch* memiliki pengaruh berbeda terhadap proses amplifikasi. *Mismatch* pada ujung 3' cenderung berdampak lebih besar dibandingkan *mismatch* diujung 5', karena ujung 3' merupakan titik awal (*starting point*) sintesis DNA selama proses amplifikasi. Ketidaksesuaian basa pada posisi ini dapat menghambat atau bahkan mencegah terjadinya elongasi oleh enzim polymerase, sehingga menjadi faktor penting dalam mencegah *false positive*. Hasil analisis *mismatch* antara primer dengan sekuens non-target disajikan pada Table 6.

Modifikasi primer F3 bertujuan mengurangi atau menghilangkan amplifikasi non-spesifik pada sekuens non-target *Charybdis feriata*. Primer sebelumnya menunjukkan masih terdapat *false positive* pada sampel non-target *Charybdis feriata*. Hasil primer F3 re-desain yang memiliki urutan TAT AAG AGG TAT AGT GGA AAG AGG, dengan nilai %GC sebesar 38,0%, suhu leleh ( $T_m$ ) sebesar 60,0 °C, dan panjang basa 24 nukleotida menunjukkan peningkatan jumlah *mismatch* terhadap spesies non-target.

Primer F3 yang didesain ulang juga telah memenuhi parameter ideal primer





Table 6 Mismatch analysis on non-target sequences

Tabel 6 Analisis Mismatch pada sekuens non-target

Sample	DNA concentration (ng/ $\mu$ L)	Number of mismatch					
		<i>Charybdis feriata</i>		<i>Podophthalmus vigil</i>		<i>Scylla serrata</i>	
		Starting point	Total bases	Starting point	Total bases	Starting point	Total bases
COI	F3 (Old)	0	2	1	3	2	12
	F3 (New)	1	3	2	4	3	14
	F2	2	3	2	3	2	13
	LF	1	6	1	4	3	12
	F1c	2	4	2	6	3	12
	B1c	2	7	1	7	2	13
	B2	1	4	1	6	2	13
	B3	3	6	3	10	4	10

berdasarkan suhu leleh ( $T_m$ ), panjang primer, dan kandungan GC yang cukup seimbang. Ujung 3' primer didesain bebas *mismatch* untuk sekuens target dan terdapat *mismatch* untuk sekuens non-target agar harapannya terjadi amplifikasi yang efisien dan spesifik. Primer juga telah diuji terhadap sekuens non-target untuk memastikan tidak terjadi ikatan parsial yang dapat menyebabkan *false positive*, sehingga primer hasil re-desain ini telah sesuai dengan standar desain primer yang direkomendasikan untuk metode LAMP. Hasil *in vitro* primer *P. pelagicus* dengan F3 re-desain terhadap sampel target dan non-target dapat dilihat pada *Figure 2*.

Hasil uji LAMP primer *P. pelagicus* dengan F3 re-desain menggunakan tiga waktu inkubasi (0, 30, dan 40 menit) pada suhu 65°C ditunjukkan pada *Figure 2*. Proses dilakukan hingga 40 menit karena terjadi *false positive* pada waktu tersebut, sehingga proses amplifikasi dihentikan. Sampel target, yaitu PPBG, LIA dan RSI mulai menunjukkan perubahan warna pada waktu inkubasi 30 menit dan berubah menjadi kuning terang pada waktu inkubasi 40 menit yang menandakan reaksi amplifikasi positif. Sementara pada sampel non-target SS-G, PV-G dan NTC tidak menunjukkan perubahan warna pada waktu inkubasi 30 menit dan sedikit mengalami

perubahan warna menjadi oranye pada waktu inkubasi 40 menit yang mengindikasikan hasil *false positive*. Pada kasus ini, *false positive* bisa terjadi akibat dimer dari primer tersebut.

Hasil sampel target yang diisolasi menggunakan *dipstick*, yaitu FIB-G dan RSI-G juga terlihat tidak mengalami perubahan warna pada waktu inkubasi 30 menit, namun beberapa menjadi oranye pada waktu inkubasi 40 menit. Sampel LIA-G dan FIB-G yang berwarna oranye, mengindikasikan adanya amplifikasi lemah atau sebagian. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh variasi kualitas DNA hasil isolasi *dipstick*, yang umumnya memiliki konsentrasi dan kemurnian lebih rendah dibanding isolasi menggunakan kit. Hal ini sejalan dengan Mason & Botella (2020) yang menyebutkan bahwa metode *dipstick*, meskipun cepat dan mudah, menghasilkan jumlah DNA yang relatif kecil dibanding metode kit komersial. Sejumlah protein dapat menunda onset amplifikasi dan/atau mengurangi sinyal fluoresen pada LAMP efek yang bisa menurunkan sensitivitas atau menimbulkan keterlambatan hasil (Nwe *et al.* 2024).

## KESIMPULAN

Satu set primer spesies-spesifik rajungan dengan markah gen COI berhasil

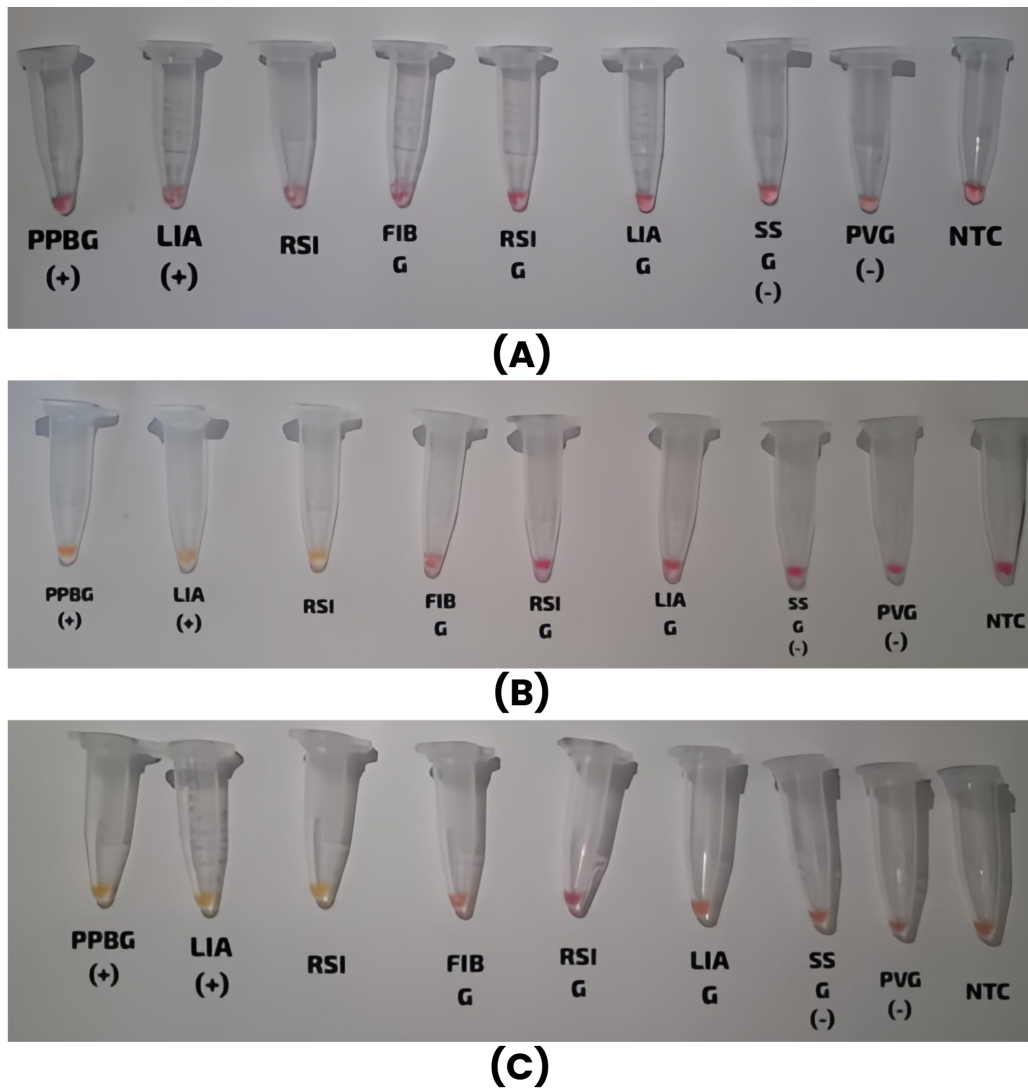


Figure 2 LAMP assay results of *P. pelagicus* primers with redesigned F3 on target and non-target samples; (A) 0-minute incubation; (B) 30-minute incubation; (C) 40-minute incubation. Isolation method: G (Dipstick). PPBG (*P. pelagicus* Bogor); LIA (local crab), RSI (Fresh crab from Indramayu); FIB (imported crab); PV (*Podophthalmus vigil*); SS (*Scylla serrata*); NTC (non template control).

Gambar 2 Hasil pengujian LAMP primer *P. pelagicus* dengan F3 re-desain terhadap sampel target dan non-target. (A) waktu inkubasi 0 menit; (B) waktu inkubasi 30 menit; (C) waktu inkubasi 40 menit. Metode isolasi: G (*Dipstick*). PPBG (*P. pelagicus* Bogor); LIA (rajungan lokal), RSI (rajungan segar Indramayu); FIB (rajungan impor); PV (*Podophthalmus vigil*); SS (*Scylla serrata*); NTC (*non template control*).

diperoleh dan mampu mendeteksi sampel target yaitu *Portunus pelagicus* dengan metode isolasi *field-based DNA Extraction*. Primer ini dapat mendeteksi spesies *Portunus pelagicus* pada rentang waktu 40-60 menit di suhu 65 °C. Penelitian selanjutnya diperlukan diagnostik

sumber *false positive* seperti NTC dan tiap primer tunggal.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Kementerian Pendidikan,



Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Republik Indonesia (KEMENDIKBUDRISTEK) melalui Skema Penelitian Dasar (PFR) TA 2024 atas nama Prof. Dr. Asadatun Abdullah, S.Pi., M.S.M., M.Si. dengan nomor kontrak 22008/IT3.D10/PT.01.03/P/B/2024.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A., Sativa, H. A., Nurhayati, T., & Nurilmala, M. (2019). Pemanfaatan DNA barcoding untuk ketertelusuran label berbagai produk olahan ikan berbasis surimi komersial. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(3), 508–519. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v22i3.28950>.
- Ali, A., Kreitlow, A., Ploetz, M., Normanno, G., & Abdulmawjood, A. (2022). Development of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and direct screening of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in commercial fish products. *PLoS ONE*, 17(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275452>.
- Anisa, R. K., Lisdiana, L., & Widyayanti, T. (2024). Optimasi metode nested PCR untuk deteksi *Vibrio parahaemolyticus* AHPND pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Lentera Bio*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v13n1.p1-13>.
- Arai, T., Taha, H., Alidon, N., Jumat, J., Azmey, S., Zan, N.D., & Habib, A. (2023). Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene analysis of the yellowfin snapper *Lutjanus xanثopinnis* in the Indo-Pacific region and a note on *Lutjanus lutjanus* population structure. *Heliyon*, 9(9), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19348>.
- Augustine, R., Hasan, A., Das, S., Ahmed, R., Mori, Y., & Notomi, T. (2020). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, sensitive, specific, and cost effective point of care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology*, 9(8), 2–17. <https://doi.org/10.3390/biology9080182>.
- Aula, O. P., McManus, D. P., & Jones, M. K. (2023). Optimisation of the DNA dipstick as a rapid extraction method for *Schistosoma japonicum* in infected mice samples and spiked human clinical samples. *Infectious Diseases of Poverty*, 12(71), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01118-8>.
- Benjakul, S., & Saetang, J. (2022). Development of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid authentication of three swimming crab species. *Foods*, 11(15), 2–12. <https://doi.org/10.3390/foods11152247>.
- Estinia, A. K., Safwanah, F. A., Ubaidillah, M. K., Fatimah, C. R., & Purnama, E. R. (2025). Teknik isolasi DNA dari daging ikan salmon (*Oncorhynchus masou*), tuna (*Thunnus obesus*), dan tongkol (*Euthynnus affinis*) menggunakan metode spin column. *Journal of Biotropical Research and Nature Technology*, 3(2), 103–109. <https://doi.org/10.52850/borneo.v3i2.19891>.
- Hardinge, P., & Murray, J. A. (2019). Reduced false positives and improved reporting of loop-mediated isothermal amplification using quenched fluorescent primers. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43817-z>.
- Joesidawati, R., Pratiwi, A., & Rahardjo, S. (2023). Identification of crab species in Tuban, East Java using DNA barcoding COI gene. *Indonesian Journal of Marine Biotechnology*, 8(1), 45–52.
- Kaltenbrunner, M., Hocheegger, R., & Cichna-Markl, M. (2021). Design of mismatch primers to identify and differentiate closely related (Sub) species: application to the authentication of meat products. New York: Springer US.
- Kamaliah. (2017). Perbandingan metode ekstraksi DNA phenol chloroform dan kit extraction pada sapi Aceh dan sapi Madura. *Jurnal Biotik*, 5(1), 60–65. <https://doi.org/10.22373/biotik.v5i1.2975>.
- Khairunisa, S. Q., Masyeni, S., Witaningrum, A. M., & Nasronudin, N. (2018). Comparison of low and high DNA purity for quantitative detection of ratio mitochondrial and nucleus dna among

- drug-treated HIV Patients by real-time PCR. *In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 434(1), 1-8. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/434/1/012338>
- Kim, E., Yang, S. M., & Kim, H. Y. (2024). Rapid on site authentication of three cockle species using real time loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Food Bioscience*, 60, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104318>.
- Kroetz, K., Luque, G. M., Gephart, J. A., Jardine, S. L., Lee, P., & Chicojay Moore, K. (2020). Consequences of seafood mislabeling for marine populations and fisheries management. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(48), 30318-30323. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003741117>.
- Kusumaningrum, I., Afiah, R. N., & Adhihendira, B. G. (2025). Physicochemical characteristics of lemi flavor powder of blue swimmer crab (*Portunus pelagicus*) lemi with maltodextrin addition. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 28(1), 13-23. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v28i1.59919>
- Maitriani, L. K. B., Wirajana, I. N., & Yowani, S. C. (2015). Desain primer untuk amplifikasi fragmen gen inhA isolat multidrug resistance tuberculosis (MDR TB) dengan metode polymerase chain reaction. *Cakra Kimia*, 3(2), 89-96.
- Mason, M. G., & Botella, J. R. (2020). Rapid (30 second), equipment free purification of nucleic acids using easy to make dipsticks. *Nature Protocols*, 15(11), 3663-3676. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0392-7>.
- Mollah, A., Ashan, M.A., & Khatimah, A.H. (2022). Uji kualitas dan kuantitas DNA porang (*Amorphophallus Muelleri Blume*) pada beberapa kawasan di Sulawesi Selatan. *Jurnal Agritechno*, 15(1), 1-7.
- Mulyani, Y., Purwanto, A., & Nurruhwati, I. (2011). Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini koi herpes virus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*, 2(1), 1-16.
- Nandita, D. D. (2024). Aplikasi metode isolasi DNA berbasis dipstick untuk metode point of care dengan berbagai variasi matriks pangan produk perikanan. [Skripsi]. IPB University.
- Novianti, T., Juniantito, V., Jusuf, A. A., Arida, E. A., Jusman, S. W. A., & Sadikin, M. (2019). Prediksi DNA primer gen PGC-1α cecak (*Hemidactylus platyurus*) dengan metoda phylogenetic, multiple alignment, dan qPCR. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1), 39-47. <https://doi.org/10.47007/ijobb.v3i1.3>.
- Nugraha, R., Dewi, P. S., & Nurilmala, M. (2022). Evaluasi primer gen COI sebagai biomarker ketertelusuran ikan menggunakan bioinformatika. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(1), 67-79. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v25i1.36501>.
- Oceana. (2015). Seafood fraud: crab cakes and claw meat—a case of mislabeling in U.S. markets. Oceana Report. <https://usa.oceana.org/reports/seafood-fraud-crab-cakes-and-claw-meat-case-mislabeling-us-markets/>.
- Pak, M. G., & Roh, M. S. (2020). Influence of cold ischemia time and storage period on DNA quality and biomarker research in biobanked colorectal cancer tissues. *Kosin Medical Journal*, 35(1), 26-37. <https://doi.org/10.7180/kmj.2020.35.1.26>.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18(6), 407-421. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>.
- Prakoso, S. P., Wirajana, I. N., & Suarsa, I. W. (2017). Amplifikasi fragmen gen 18S rRNA pada DNA metagenomik madu dengan teknik PCR. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*, 3, 16-22.
- Pratiwi, E., & Widodo, L. (2020). Kuantifikasi hasil ekstraksi gen sebagai faktor kritis untuk keberhasilan pemeriksaan RT-PCR. *Indonesian Journal for*





- Health Sciences*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.24269/ijhs.v4i1.2293>.
- Ramadhani, S., Putri, F. R., & Farma, S. A. (2023). Desain primer dan analisis *in silico* gen glutathione peroxidase 1 pada *Rattus norvegicus*. *Tarumanagara Medical Journal*, 5(2), 374–383. <https://doi.org/10.24912/tmj.v5i2.25751>.
- Saraswati, H., Seprianto, & Wahyuni, F. D. (2019). Desain primer secara *in silico* untuk amplifikasi gen *cryIII* dari *Bacillus thuringiensis* isolat lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1), 33–38. <https://doi.org/10.47007/ijobb.v3i1.37>.
- Sari, S. K., Listyorini, D., Mazieda, M. N., & Sulasmi, E. S. (2014). Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA pada daun cabai rawit (*Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau) menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Plant) Genaid. *Proceeding Biology Education Conference*, 11(1), 65–70.
- Sari, R. N., Marimin, Uju, Riani, E., Sukoraharjo, S. S., Hastarini, E., Priyono, F. E., Zulkifli, S., & Wicaksono, A. (2025). Mutu fisikokimia dan mikrobiologi rajungan (*Portunus pelagicus*) hasil tangkapan di Kabupaten Rembang, Jawa Tengah. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 28(1), 91–108. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v28i1.57136>
- Setiyowati, D. (2016). Kajian stok rajungan (*P. pelagicus*) di perairan Laut Jawa, Kabupaten Jepara. *Jurnal DISPROTEK*, 7(1), 84–97. <https://doi.org/10.34001/jdpt.v7i1.363>.
- Silva, A. J., Hellberg, R. S., & Hanner, R. H. (2021). Food fraud: a global threat with public health and economic consequences. In R. S. Hellberg, K. Everstine, & S. A. Sklare (Eds.), *Food fraud and food authentication* (pp. 3–28). Academic Press.
- Sophian, A., & Syukur, A. (2021). Analysis of purity and concentration of isolated DNA in making raw DNA of rat species. *Eruditio: Indonesia Journal of Food and Drug Safety*, 1(2), 1–5. <https://doi.org/10.54384/eruditio.v1i2.75>.
- Su'udi, M., Ulum, F. B., Ardiyansah, M., & Fitri, N. E. (2023). Evaluasi lokus potensial *matK* dan *ITS2* untuk DNA barcoding anggrek *Bulbophyllum lobbii* Lindl. *Al Kauniah: Jurnal Biologi*, 17(2), 406–418. <https://doi.org/10.15408/kauniah.v17i2.33897>.
- Suphandi, M., Sugata, M., & Tan, T. J. (2023). Aktivitas antimikroba bakteri asam laktat yang diisolasi dari susu sapi di Indonesia. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 2(3), 1–9. <https://doi.org/10.24002/biota.v8i2.6554>.
- Utaminingsih, S., Utami, S. D., & Sophian, A. (2022). Isolasi DNA pada produk otak-otak ikan bandeng. *Muhammadiyah Journal of Nutrition and Food Science*, 3(1), 36–41. <https://doi.org/10.24853/mjnf.3.1.36-41>.
- Widayanti, R. (2025). *Jejak Mitokondria: Strategi Genetik Modern untuk Mengungkap Rahasia Ikan Indonesia*. Sleman: Deepublish.
- Wilopo, B. A., Sudigdoadi, S., Sahiratmadja, E., & Dewi, I. M. (2015). Loop mediated isothermal amplification untuk mendeteksi gen *blaTEM* sebagai penyandi extended spectrum beta lactamase pada isolat *Enterobacteriaceae*. *Majalah Kedokteran Bandung*, 47(4), 242–249. <https://doi.org/10.15395/mkb.v47n4.618>.
- WTVD. (2021). North Carolina man sentenced for mislabeling foreign crabmeat as “Product of USA.” ABC11 Eyewitness News. ABC11 Eyewitness New. <https://abc11.com/crabmeat-mislabeling-capt-neills-seafood-north-carolina/10891172/>
- Xiong, X., Xu, W., Guo, L., An, J., Huang, L., Qian, H., & Wang, L. (2021). Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid screening of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) in processed fish products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 102, 104038. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104038>.
- Xiong, X., Yuan, F., Huang, M., Lu, L., Xiong, X., & Wen, J. (2019). DNA barcoding revealed mislabeling and potential health

- concerns with roasted fish products sold across China. *Journal of Food Protection*, 82(7), 1200–1209. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-514>
- Yang, Y., Wang, J., Sun, Y., Chen, H., Zhao, H., & Zhang, Y. (2024). Simple and rapid identification of beef within 30 min using a new food nucleic acid release agent combined with direct fast qPCR. *Food Chemistry*, 460, 140473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140473>.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(134), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
- Zhang, J., Hua, M. Z., Chen, H., Hou, H., Hu, Y., & Lu, X. (2025). Food authentication using the loop mediated isothermal amplification (LAMP) method: current trends and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 156, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2025.104874>.
- Zou, Y., Mason, M. G., & Botella, J. R. (2017). A low cost, portable, dual function readout device for amplification based point of need diagnostics. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(24), 1–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02172-17>.