

## KARAKTERISTIK MOLEKULER CYTOCHROME B UNTUK DNA *BARCODING* IKAN TENGGIRI

### *Molecular Characteristics of Cytochrome B for Mackerel Barcoding*

Deden Yusman Maulid<sup>\*1</sup>, Mala Nurilmala<sup>1</sup>, Nurjanah<sup>1</sup>, Hawis Madduppa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Bogor 16680, Jawa Barat  
Telepon (0251) 8622915, Faks (0251) 8622916

<sup>2</sup>Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Bogor 16680, Jawa Barat  
Telepon (0251) 8623644, Faks (0251) 8623644

\*Korespondensi: dyusmanmaulid@yahoo.com

Diterima: 8 Desember 2015/ Review: 22 Maret 2016/ Disetujui: 10 April 2016

**Cara sitasi:** Maulid DY, Nurilmala M, Nurjanah, Madduppa H. 2016. Karakteristik molekuler cytochrome untuk DNA *barcoding* ikan tenggiri. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 19(1): 9-16.

#### Abstrak

Cytochrome b (cyt b) adalah salah satu gen pada DNA mitokondria yang sering digunakan sebagai marka molekuler untuk mengidentifikasi spesies melalui metode DNA *barcoding*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik bioinformatika gen penyandi cyt b yang diisolasi dari ikan tenggiri (tenggiri papan dan tenggiri totol). Hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa panjang DNA cyt b yang diisolasi dari ikan tenggiri papan 803 pasangan basa dengan komposisi purin 312 pasangan basa dan pirimidin 491 pasangan basa, sedangkan ikan tenggiri totol 791 pasangan basa dengan komposisi purin 316 pasangan basa dan pirimidin 475 pasangan basa. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa kedua sampel termasuk kedalam kelompok *Scomberomorus commerson* dan *Scomberomorus koreanus* yang merupakan jenis ikan tenggiri. Titik isoelektrik cyt b ikan tenggiri papan 6,38 dan berat molekul 29826,23; ikan tenggiri totol 8,67 dan berat molekul 29372,77. Cyt b ikan tenggiri papan dan tenggiri totol memiliki kecenderungan hidrofobik. Dugaan pemodelan 3D cyt b pada kedua jenis ikan terdapat delapan bagian berbeda berdasarkan perbedaan warna yang ditampilkan.

Kata kunci: karakteristik molekuler, cytochrome b, ikan tenggiri

#### Abstract

Cytochrome b (cyt b) is one of the genes in mitochondrial DNA that is often used as a molecular marker to identify species through DNA *Barcoding*. The aim of the present study was to investigate the bioinformatic of cyt b that isolated from mackerel fish. PCR amplification showed the length of DNA cyt b from king mackerel was 803 bp within purine 312 bp and pyrimidine 491 bp while Korean mackerel 791 bp within purine 316 bp and pyrimidine 475 bp. Phylogenetic analysis showed all sample join in mackerel groups (*Scomberomorus commerson* and *Scomberomorus koreanus*). The Isoelectric point value of cyt b from king mackerel is 6.38 and molecular weight is 29826.23; Korean mackerel are 8.67 and molecular weight is 29372.77. Hydrophaty plot showed cyt b of mackerel more hydrophobic. Based on 3D modelling both of them have eight different sections showing by different colors.

Keywords: characteristic molecular, cytochrome b, Mackerel

#### PENDAHULUAN

Cytochrome b (cyt b) adalah salah satu gen yang ada pada DNA mitokondria dan sering digunakan dalam analisis DNA

untuk mengidentifikasi spesies bahan baku pada produk perikanan (Sotelo *et al.* 2001). Identifikasi spesies menggunakan DNA mitokondria memiliki keuntungan karena

ukurannya lebih kecil, jumlah salinannya banyak, informasi urutan DNA tersedia lengkap untuk organisme akuatik, dan tidak ada rentang *non-coding* (Mackie *et al.* 1999). DNA *barcoding* merupakan metode yang sering digunakan dalam forensik taksonomi karena efektif dalam mengidentifikasi dalam berbagai kondisi sampel uji dan tidak menghasilkan data yang ambigu (Dawnay *et al.* 2007; Wong *et al.* 2011). Huang *et al.* (2014) menggunakan cyt b untuk mengidentifikasi pemalsuan *fillet pufferfish*. Penggunaan gen penyandi cyt b untuk identifikasi spesies telah dilakukan oleh Wulansari *et al.* (2015) untuk mengidentifikasi kepalsuan produk yang menggunakan ikan tuna sebagai bahan baku.

DNA mitokondria pada penelitian ini diisolasi dari ikan tenggiri. Ikan tenggiri merupakan salah satu jenis ikan yang sering digunakan sebagai bahan baku produk perikanan yaitu bakso, pempek, otak-otak, dan kerupuk. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik molekuler cyt b yang meliputi urutan DNA, pohon filogenetik, titik isoelektrik, *Hydrophaty plot*, dan pendugaan model 3 dimensi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan tenggiri segar (tenggiri papan dan tenggiri totol), kit isolasi DNA *dneasy blood and tissue kit* (Qiagen Vaenlow-Netherland), DNA *dneasy mericoon food kit* (Qiagen Vaenlow-Netherland), larutan *mix Kapa Taq Extra Hotstart Ready Mix* (kappa biosystem, Massachusetts-USA), etanol 96%, kloroform, agarose (Vivantis invitrogen, Massachusetts-USA), *Etidium Bromida*, *gel loading buffer* (Invitrogen, Massachusetts-USA), dan DNA *ladder* (Invitrogen, Massachusetts-US).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *freezer*, pipet tips (*Axygen Scientific*, California-USA), mikro pipet (*Thermo scientific*, vantaa-finland), tabung mikro (Qiagen, Venlow-Netherland), *sentrifuse*

*perfectspin 24 plus* (*peqlab biotechnologie* GMvH, Erlanger-Jerman), mesin PCR *Termocycler Biometra T1* (Biometra GmbH, Gottingen-Jerman), Inkubator Digital Block Heater HX-1 (*Peqlab Biotechnologie* GmbH, Erlangen-Jerman), elektroforesis Mupid-Exu, (Advance, Tokyo-Japan), timbangan digital Adam vw 254 (Adam *equipment* co. Milton Keynes-England), *spindown perfectspin mini* (*Peqlab Biotechnologie* GmbH, Erlangen-Jerman), *vortex peqTwist vortex mixer* (*Peqlab Biotechnologie* GmbH, Erlangen-Jerman), *microwave* Panasonic NN-SM320M, alat sinar Ultraviolet Viewer (UV-1) (Extrogene Inc, Taichung City-Taiwan), dan nanodrop nanofotometer p360 (*implant* GmbH eschtzboegen-Germany).

## METODE PENELITIAN

### Koleksi Sampel

Ikan tenggiri terdiri dari tenggiri papan dan tenggiri totol diperoleh dari Muara Baru, Jakarta. Bagian ikan yang diambil adalah jaringan otot (*muscle*) dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL dan direndam dalam larutan etanol 96%, kemudian disimpan pada suhu -70°C.

### Isolasi DNA (CTAB dengan Modifikasi)

Isolasi DNA berdasarkan metode CTAB (Sambrook dan Russel, 2001) yang telah dimodifikasi mengikuti protokol *Dneasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen). Prinsip pemurnian DNA menggunakan protokol qiagen terdiri dari tiga tahap yaitu, penghancuran membran sel, pemisahan DNA dengan molekul lain, dan pemurnian DNA.

### Amplifikasi PCR

Sampel yang telah isolasi kemudian diperbanyak dengan menggunakan mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Tahapan PCR terdiri dari predenaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 5 menit, *annealing* 56°C selama 1 menit, *extention* 72°C selama 1 menit, *post extention* 72°C selama 7

menit dan preservasi 8°C selama 5 menit.

Reaksi PCR sebanyak 50 µL yang terdiri dari: akuades (ddH<sub>2</sub>O) sebanyak 21,5 µL ditambahkan “*kappa mastermix PCR*” 25 µL, ditambahkan *primer forward* dan *reverse* (Maulid dan Nurilmala 2015) masing masing 1,25 µL, terakhir cetakan DNA sebanyak 1 µL yang dicampur didalam mikrotube.

Amplifikasi dilakukan sebanyak 40 siklus di dalam mesin PCR. Produk PCR kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 1% dan selanjutnya divisualisasi menggunakan sinar UV. Produk PCR diamati menggunakan sinar UV dilanjutkan dengan sekuensing yaitu penerjemahan untai DNA menjadi basa nukleotida (ACGT). Pengiriman sampel dilakukan oleh perusahaan *Firstbase* (Malaysia). Hasil sekuensing kemudian disejajarkan menggunakan software *Mega 5.2 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis)* (Tamura *et al.* 2011).

Komposisi basa nukleotida dipisahkan berdasarkan jenis basanya yaitu basa purin dan pirimidin. Penandaan panjang untai DNA secara otomatis terlihat berdasarkan penomoran pada rantai DNA. Translasi untai DNA menjadi untai asam amino dilakukan dengan menggunakan standar kode genetik untuk hewan bertulang belakang (vertebrata).

*Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) digunakan untuk mencari kemiripan spesies berdasarkan urutan basa nukleotida

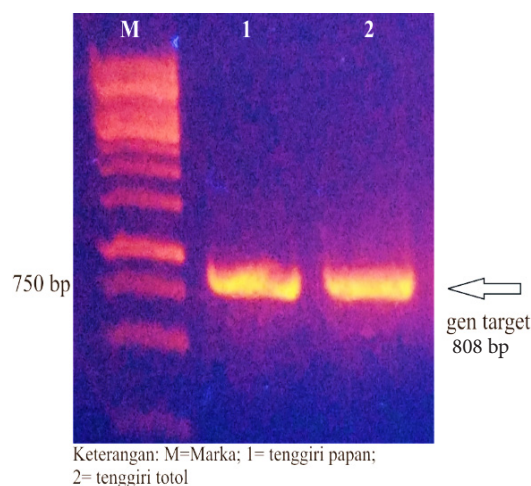
yang dihasilkan. Urutan basa nukleotida sampel diperbandingkan dengan database yang tersedia pada GenBank, kemiripan spesies dilihat berdasarkan nilai *homology* tertinggi.

### Pohon Filogenetik

Pohon filogenetik dibuat dengan menggunakan metode *Neighbour-Joining Tree* model Kimura 2-Parameter dan *bootstrap* 1.000. Pohon filogenetik digunakan untuk melihat kelompok suatu spesies dengan spesies lain sehingga sampel yang diuji bisa ditentukan berdasarkan pengelompokkan tersebut.

### Titik Isoelektrik, Hydrophaty Plot, dan Pendugaan Model 3 Dimensi

Titik isoelektrik adalah pH dimana protein memiliki muatan negatif dan muatan positif yang sama besar. Titik isoelektrik dihitung berdasarkan jumlah asam amino dengan menggunakan analisis tools *expasy server* (Gasteiger *et al.* 2005). *Hydrophaty plot* adalah analisis kuantitatif untuk mengukur derajat hidrofobik maupun hidrofilik dari suatu protein. *Hydrophaty plot* diukur dengan menggunakan *Transporte Classification Database* (TCDB) (Kyte dan Doolittle 1982). Model tiga dimensi protein *cyt b* dianalisis menggunakan *swiss model expasy* (Biasini *et al.* 2014).



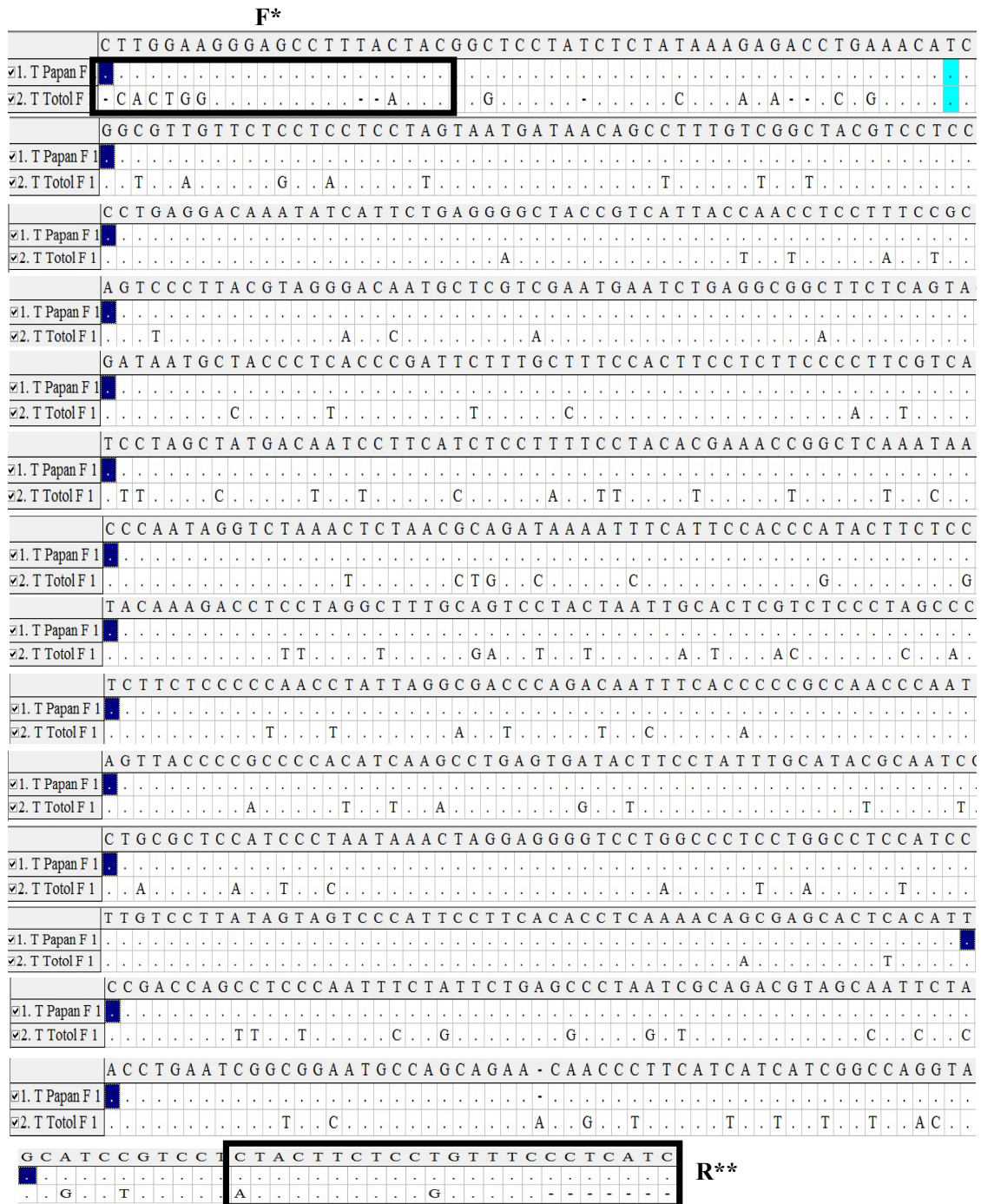
Gambar 1 Elektroforegram hasil PCR ikan tenggiri papan dan tenggiri totol

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Isolasi DNA**

DNA hewan terletak pada inti sel dan mitokondria. Sel hewan dilapisi oleh membran terdiri dari protein dan lipid. Prinsip isolasi DNA adalah pelisisan sel, ekstraksi, dan pengendapan. Pelisisan adalah perusakan membran sel oleh protease. Ekstraksi adalah

penghancuran organel sel sehingga materi yang berada dalam organel sel keluar. Pengendapan adalah pemisahan antara DNA dengan materi lain melalui perbedaan berat (Nishiguchi *et al.* 2002). Hasil isolasi DNA tenggiri papan memiliki nilai konsentrasi 69,6 nmol/μL dengan kemurnian 1,7. Tenggiri totol memiliki nilai konsentrasi 87 nmol/μL dengan kemurnian 1,99.



Gambar 2 Urutan DNA cyt b tenggiri papan dan tenggiri totol

### Amplifikasi PCR

DNA yang telah diperbanyak melalui proses amplifikasi dengan bantuan mesin PCR selanjutnya divisualisasi di bawah sinar UV seperti ditunjukkan oleh Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan panjang gen target berkisar antara 750-1.000 pasangan basa. Panjang tersebut sesuai dengan panjang gen target yaitu 808 pasangan basa. Laju perpindahan DNA dipengaruhi oleh konsentrasi gel dan tegangan listrik. Semakin rendah konsentrasi gel dan semakin besar tegangan listrik maka laju perpindahan DNA semakin cepat (Sambrook dan Russel 2001).

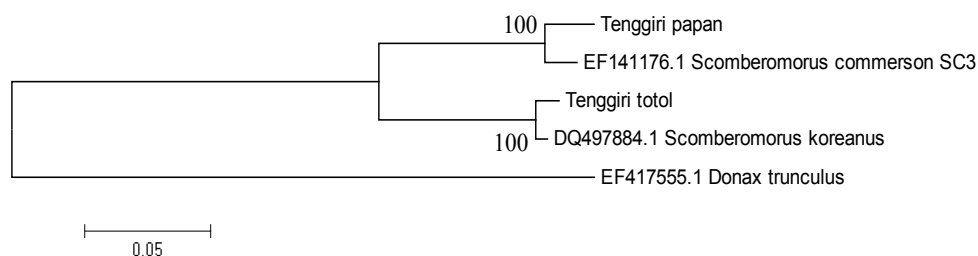
Produk PCR hasil amplifikasi kemudian disekuens untuk diketahui urutan basa nukleotidanya. Hasil urutan DNA ikan tenggiri papan berdasarkan marka molekuler terdiri dari 803 pasangan basa dengan komposisi purin 312 pasangan basa (adenin 189 pasangan basa; guanin 123 pasangan basa) dan pirimidin 491 pasangan basa (timin 215 pasangan basa; sitosin 276 pasangan basa). Hasil urutan DNA ikan tenggiri total berdasarkan marka molekuler terdiri 791 pasangan basa dengan komposisi purin 316 pasangan basa (adenin 195 pasangan basa; guanin 121 pasangan basa) dan pirimidin 475 pasangan basa (timin 245 pasangan basa; sitosin 230 pasangan basa). Jumlah basa nukleotida pirimidin dalam satu utas DNA lebih banyak dibanding pirimidin baik ikan tenggiri papan maupun tenggiri total. Lin *et al* (2008) menyatakan dari sampel DNA yang dikoleksinya menunjukkan bahwa basa pirimidin lebih banyak dibanding dengan basa purin. Urutan DNA *cyt b* ikan tenggiri

papan dan tenggiri total ditunjukkan pada Gambar 2. Tanda titik (.) menunjukkan bahwa daerah tersebut merupakan daerah yang sama (*conserve*) antar kedua sekuen tersebut.

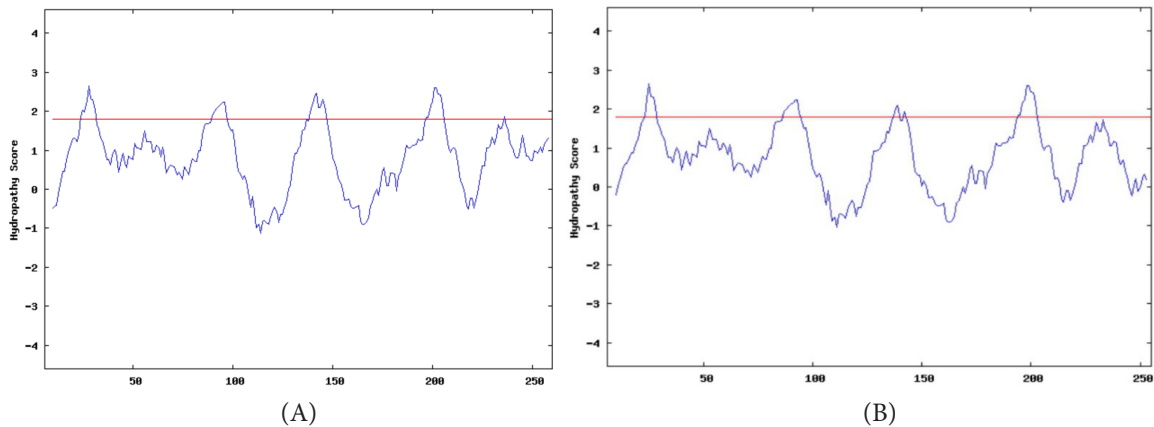
Asam amino yang berhasil diterjemahkan untuk ikan tenggiri papan 267 asam amino dan ikan tenggiri total 263 asam amino. Asam amino merupakan hasil translasi RNA dengan ketentuan tiga basa (kodon) menerjemahkan satu asam amino. DNA mitokondria tidak memiliki operon sehingga hanya ada satu jenis gen yang berada diantara start kodon dan stop kodon. Hal ini memudahkan dalam proses penentuan asam amino dengan asumsi tidak ada stop kodon diantara urutan asam amino yang diperoleh. Hasil BLAST menunjukkan bahwa ikan tenggiri papan memiliki tingkat kemiripan dengan *Scomberomorus commerson* (Accession number: EF141176.1) dengan persentase identity 99% dan e-value 0,0. Ikan tenggiri total memiliki tingkat kemiripan dengan *Scomberomorus koreanus* (Accession number: DQ497884.1) dengan persentase identity 98% dan e-value 0,0. Kedua sampel yang di BLAST memberikan nilai e value 0 hal ini menunjukkan bahwa hasil perbandingan yang diberikan identik dan dapat dipercaya. Nilai e-value semakin mendekati satu maka nilai e-value tidak bisa dipercaya (Narita *et al.* 2012). Pearson (2013) melaporkan bahwa e-value lebih akurat dan lebih sensitif ketika memperbandingkan protein dari ragi dengan protein manusia.

### Pohon Filogenetik

Pengelompokkan spesies berdasarkan pohon filogenetik memberikan penjelasan



Gambar 3 Pohon filogenetik ikan tenggiri



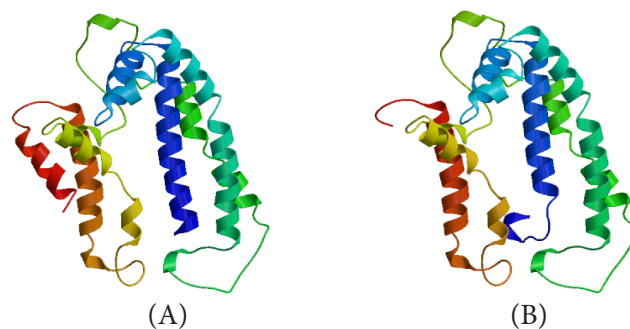
Gambar 4 (A) *Hydrophaty plot* cyt b tenggiri papan; (B) *Hydrophaty plot* cyt b tenggiri totol

bahwa dari pengulangan 1000 kali *bootstraps* memberikan hasil 100% sampel ikan tenggiri papan dikelompokkan kedalam spesies *Scomberomorus commerson* dan ikan tenggiri totol masuk kelompok *Scomberomorus koreanus*. Pohon filogenetik ditunjukkan oleh Gambar 3.

### Titik Isoelektrik, *Hydropaty Plot*, dan Pendugaan Model 3 Dimensi

Hasil analisis titik isoelektrik menunjukkan bahwa cyt b ikan tenggiri papan memiliki isoelektrik 6,38 dan berat molekul 29.826,23 g/mol sedangkan cyt b ikan tenggiri totol memiliki isoelektrik 8,67 dan berat molekul 29.372,7 g/mol. Isoelektrik dan berat molekul dipengaruhi oleh jenis dan jumlah asam amino yang dimilikinya. Asam amino memiliki gugus aktif karboksil dan amina. Pada pH tertentu (isoelektrik) gugus amina terprotonisasi menjadi  $-NH^{3+}$  dan gugus karboksil terdeprotonisasi menjadi  $-COO^-$

(Simmons dan Williams 2006). Berdasarkan derajat keasaman, asam amino terbagi menjadi tiga kelompok yaitu asam amino bersifat asam, basa, dan netral. Asam amino yang bersifat asam diantaranya adalah asam glutamat (Glu, E) dan asam aspartat (Asp, D). Asam amino yang bersifat basa adalah lisin (Lys, K), arginin (Arg, R), dan histidin (His, H) (Bettelheim *et al.* 2010). Perbandingan asam amino yang bersifat asam dan basa pada ikan tenggiri papan adalah 12:17 asam amino sedangkan pada ikan tenggiri totol adalah 10:19 asam amino. Pengukuran titik isoelektrik dan berat molekul protein dari urutan DNA hanya mengukur protein hasil translasi dan tidak melibatkan *signal peptida* sehingga hasilnya lebih akurat. Gasteiger *et al.* (2005) menyatakan bahwa *sequence* asam amino yang telah ditampilkan telah mengalami reduksi atau penghilangan *signal peptida* sehingga meningkatkan akurasi hasil pI dan berat molekul.



Gambar 5 (A) Model 3 dimensi cyt b tenggiri papan; (B) model 3 dimensi cyt b tenggiri totol

*Hydrophaty plot* adalah visualisasi yang menggambarkan sifat hidrofilik maupun hidrofobik dari suatu protein secara keseluruhan. Cyt b merupakan salah satu protein transmembran yang berperan dalam proses transfer elektron pada membran dalam mitokondria (Espoti *et al.* 1992). Hasil analisis *Hydrophaty plot* menggunakan metode *Keyte-Doolittle* ditunjukkan seperti pada Gambar 4.

Sumbu X mewakili panjang protein (asam amino) dan sumbu Y mewakili nilai hidrofobilitas yang berkisar antara -4,6 sampai dengan 4,6. Semakin mendekati nilai -4,6 maka akan memiliki sifat hidrofilik dan semakin mendekati nilai 4,6 maka akan memiliki sifat hidrofobik. Garis merah menunjukkan batas wilayah antara wilayah permukaan dan wilayah transmembran. Bagian yang lebih besar atau melewati garis merah dinyatakan sebagai wilayah transmembran (Kyte dan Doolittle 1982). Ikan tenggiri papan dan tenggiri totol menunjukkan terdapat empat bagian yang melewati garis merah dan secara keseluruhan berada di atas nilai nol (0), hal ini berarti cyt b pada masing-masing ikan memiliki 4 region transmembran dan secara keseluruhan memiliki sifat hidrofobik. Esposti *et al.* (1990) melaporkan cytochrome P45 memiliki region transmembran yang bersifat hidrofobik. Skala yang digunakan menggunakan skala Kyte dan Doolittle yang berdasarkan sifat hidrofobik dari setiap asam amino.

Pendugaan model 3D bertujuan untuk menentukan struktur protein secara 3D. Hasil pendugaan model 3D diperlihatkan pada Gambar 5. Pendugaan model 3 dimensi cyt b baik tenggiri papan maupun tenggiri totol memberikan hasil yang hampir sama. Terdapat 8 fragmen yang berbeda ditandai dengan perbedaan warna yaitu merah, orange, kuning, biru, hijau, hijau muda, biru sian, dan biru muda.

Terdapat dua bentuk berbeda yaitu bagian yang panjang seperti benang dan bagian yang pipih seperti pita, kedua bagian tersebut merupakan penanda bagi struktur sekunder  $\alpha$ -helix dan  $\beta$ -sheet.

## KESIMPULAN

Panjang DNA cyt b tenggiri papan 803 pasangan basa dengan komposisi basa adenin, guanin, timin, dan sitosin adalah 189,123, 215, dan 276 pasangan basa. Asam amino hasil translasi sebanyak 267 asam amino. Panjang DNA cyt b tenggiri totol 791 pasangan basa dengan komposisi basa adenin, guanin, timin, dan sitosin adalah 195, 121, 245, dan 230 pasangan basa. Asam amino hasil translasi sebanyak 263 asam amino. Nilai titik isoelektrik cyt b ikan tenggiri papan 6,38 dan berat molekul 29826.23 g/mol sedangkan cyt b ikan tenggiri totol memiliki isoelektrik 8,67 dan berat molekul 29372.77 g/mol. Cyt b ikan tenggiri papan dan tenggiri totol memiliki kecenderungan hidrofobik dan memiliki masing-masing 4 daerah transmembran.

## Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi dengan skema penelitian kompetensi atas nama Dr Mala Nurilmala, SPi MSi pada tahun anggaran 2015-2016.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bettelheim FA, Brown WH, Campbell MK, Farrell SO. 2010. Introduction to Organic and Biochemistry. Seventh edition. ISBN-10:0495391964.p337.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A. 2014. Swiss-model:Modelling protein tertiary and quaternary, structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research* 252-258.
- Dawnay N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR, Thorpe RS. 2007. Validation of the *barcoding* gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173:(1-6).
- Espoti MD, Vries SD, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, Meyer A. 1992. Mitochondrial cytochrome b: evaluation and structure of the protein. *Biophysica Acta* 1141:243-271.
- Fennema OR. 1995. Food Chemistry 3rd. Ed

- CRC Press. Pp. 327-8 ISBN 08247-9691-8.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Humana Press.
- Huang YR, Yin MC, Hsieh YL. 2014. Authentication of consumer fraud in Taiwanese fish food by molecular trace evidence and forensically informative nucleotide sequencing. *Food Research International* 55:294-302.
- Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal Molecular Biology* 157:105-132.
- Lin WF, Hwang DF. 2008. A multiplex of PCR assay for species identification of raw and cooked Bonito. *Food Control* 19(9):879-885.
- Mackie IM, Pryde SE, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Pérez-Martin R, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Rehbein H. 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trend and Food Science and Technology* 10:9-14.
- Maulid DY, Nurilmala M. 2015. DNA *barcoding* autentikasi produk ikan tenggiri (*Scomberomus* sp.). *Jurnal Akuatika* VI(2): 154:160.
- Nishiguchi MK, Daukakis P, Egan M. 2002. DNA Isolation Procedures. Berkauser: Basel (SWZ).
- Sambrook J, Russel DW. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Simmons, William J. 2006. Principal of Medical Biochemistry. Mosby Elsevier. P 19. ISBN 0-323-02942-6.
- Sotelo CG, Mata C, Chapela MJ. 2001. Identification of flatfish species using DNA-based techniques. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49:4562-4569.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. Mega5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Wong LL. 2011. DNA *Barcoding* and Related Molecular Markers for Fish Species Authentication. Phylogenetic Assessment and Population Studies. Auburn University. Auburn. Alabama. p. 118.
- Wulansari N, Nurjanah, Nurilmala M. 2015. Deteksi ikan tuna dan produk olahannya berbasis protein dan DNA *barcoding*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 18(2):119-127.