

## PEMANFAATAN DNA *BARCODING* UNTUK KETERTELUSSURAN LABEL BERBAGAI PRODUK OLAHAN IKAN BERBASIS SURIMI KOMERSIAL

Asadatun Abdullah\*, Hana Aulia Sativa, Tati Nurhayati, Mala Nurilmala

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.  
Jalan Lingkar Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

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

Diterima: 6 November 2019/ Disetujui: 18 Desember 2019

**Cara sitasi:** Abdullah A, Sativa HA, 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.

### Abstrak

Produk olahan ikan berbasis surimi memiliki potensi dalam kesalahan pelabelan bahan baku, yaitu menggunakan bahan yang tidak sesuai dengan persyaratan keamanan pangan. Terdapat juga kasus yang dilaporkan pada penelitian sebelumnya dan menunjukkan adanya potensi penggunaan jaringan ikan toksik pada produk *seafood* komersial. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menentukan bahan baku yang digunakan pada berbagai produk olahan surimi dengan menggunakan marka gen *cytochrome oxidase I* (COI) DNA *barcoding*. Tahapan penelitian meliputi isolasi DNA, amplifikasi DNA yang dilakukan menggunakan beberapa primer target yaitu F1R1/F2R2, *mini-barcode*, serta primer spesies spesifik terhadap ikan buntal beracun *Lagocephalus lunaris*, serta penentuan urutan nukleotida. Hasil penentuan urutan nukleotida dan analisis bioinformatika menunjukkan sampel S1 adalah *Coryphaena hippurus* atau ikan mahi-mahi, sampel S2 dan S3 adalah *Nemipterus bathybius* atau ikan kurisi dan sampel CS adalah spesies *Evynnis cardinalis* atau ikan kuro. Deteksi sampel dengan primer spesies spesifik ikan buntal *Lagocephalus lunaris* dengan suhu 54°C, 57°C, dan 60°C menunjukkan tidak terdapatnya pita DNA pada enam sampel yang dianalisis.

Kata kunci: DNA *barcode*, olahan ikan, label pangan, produk

### *DNA Barcoding Application for Seafood Label Traceability of Various Commercial Surimi-Based Products*

#### Abstract

Surimi-based processed products are prone to mislabeling using raw materials that are not in accordance with food safety requirements. There were cases reporting use of toxic fish tissue in commercial seafood products. This study was aimed to identify and determine the raw materials used in various processed surimi products using cytochrome oxidase I (COI) gene marker. The experiment consisted of DNA isolation, DNA amplification using several target primers namely full-length barcodes, mini-barcodes, as well as specific species primers against poisonous puffer fish *Lagocephalus lunaris* and genetic analysis. The results of bioinformatics analysis revealed that S1 samples were *Coryphaena hippurus* or mahi-mahi fish, S2 and S3 samples were *Nemipterus bathybius* or curuted fish and CS samples were *Evynnis cardinalis* or kuro fish. Detection of samples with species specific primers of puffer fish *Lagocephalus lunaris* with annealing temperatures of 54°C, 57°C, and 60°C showed no DNA bands in the six samples analyzed.

Keywords: DNA barcode, processed fish, products, seafood label

## PENDAHULUAN

Konsumsi *seafood* terus mengalami peningkatan per kapita dari tahun 2015 sebesar 20,2 kg, menjadi 20,3 kg pada tahun 2016 dan pada tahun 2017 menjadi 20,5 kg (FAO 2018). Permintaan terhadap produk olahan *seafood* yang terus meningkat juga meningkatkan proses impor produk *seafood*. Oleh sebab itu kualitas *seafood* harus terjaga dengan menerapkan keamanan pangan, salah satunya dengan penjaminan terhadap spesifikasi produk secara detail pada label. Pemeriksaan label dilakukan untuk menunjang sistem ketertelusuran yang penting untuk menjamin kualitas keamanan pangan pada *seafood*, karena informasi produk dapat diketahui secara lengkap (Leal *et al.* 2015). Informasi label yang tidak diperiksa secara detail dapat menyebabkan peningkatan kesempatan *mislabeled*. Kasus *mislabeled* produk *seafood* menyebabkan terjadinya *seafood fraud*. Kasus *mislabeled* yang terdapat di Indonesia di antaranya adalah kerupuk udang tidak mengandung udang (Ajitama 2017) dan penggunaan jenis ikan hiu yang terdaftar dalam IUCN *red list* (Muttaqin *et al.* 2019).

Produk olahan perikanan umumnya menggunakan surimi. Bahan baku utama yang digunakan dalam pembuatan surimi secara umum adalah jenis Alaska *pollock*. Pembuatan surimi di Indonesia dapat dilakukan menggunakan beberapa jenis ikan di antaranya daging filet ikan kakap merah (Rostini 2013), ikan baronang (Wawasto *et al.* 2018), dan ikan swanggi (Astuti *et al.* 2014). Surimi merupakan bahan baku setengah jadi yang diolah sehingga menjadi produk pangan berbasis surimi. Produk berbasis surimi yang dikomersialkan telah diolah sehingga tidak diketahui jenis bahan baku yang digunakan. Pemalsuan bahan baku surimi dapat disebabkan oleh peningkatan keuntungan yang diinginkan dengan harga asli bahan baku yang lebih mahal, serta permintaan yang semakin meningkat (Keskin dan Atar 2012). Permintaan produk *seafood* yang semakin meningkat dapat memicu terjadinya *seafood fraud* dengan cara menyubstitusi produk *seafood* menggunakan ikan tergolong toksik misalnya ikan buntal atau *puffer fish*

(Hsieh *et al.* 2010).

*Puffer fish* atau ikan buntal merupakan ikan yang memiliki potensi racun dan dikenal dengan istilah tetrodotoksin (TTX). Racun TTX pada *puffer fish* bersifat eksogenus, bersumber dari rantai makanan yang dimulai dari bakteri yang memproduksi tetrodotoksin yaitu *Vibrio alginolyticus*, *Shewanella alga* dan *Alteromonas tetraodonis*. Konsumsi makanan yang terakumulasi TTX pada manusia dapat menyebabkan gangguan pada sistem syaraf hingga kematian (Noguchi dan Arakawa 2008). Jaringan toksik pada ikan buntal terdeteksi pada hampir seluruh jenis spesies, kecuali pada *Lagocephalus gloveri* dan *Lagocephalus wheeleri*. Spesies tersebut tidak mengandung jaringan toksik dan dapat digunakan sebagai bahan baku untuk memproduksi filet kering di Taiwan. Penelitian menjelaskan dari 60 sampel filet komersial di Taiwan, terdeteksi 46 sampel adalah *L.gloveri*, empat sampel *L. wheeleri*, delapan sampel *L. lunaris* dan dua sampel tidak teridentifikasi. Spesies *L. lunaris* merupakan salah satu spesies ikan buntal yang memiliki jaringan toksik (Hsieh *et al.* 2010). Kasus ini menunjukkan adanya potensi substitusi penggunaan jaringan ikan toksik pada produk *seafood* komersial.

Autentikasi label pangan dapat dilakukan berdasarkan protein dan DNA. DNA *barcoding* merupakan metode berdasarkan perbedaan urutan nukleotida gen terstandar 655-bp gen *cytochrome c oxidase I* (COI) sehingga dapat mengidentifikasi spesies dengan tingkat kesesuaian tinggi (Ward *et al.* 2005). Metode DNA *barcode* juga digunakan dalam membedakan spesies dari produk perikanan termasuk produk beku, filet, dan produk surimi (Chang *et al.* 2016, Barcaccia *et al.* 2016). DNA *barcoding* merupakan metode taksonomi menggunakan penanda genetik pendek dari bagian genom DNA standar yang secara umum didasarkan pada amplifikasi fragmen DNA pendek pada mitokondria genom.

Gen COI merupakan penanda molekuler utama yang efektif dalam keterlacakan produk, namun fragmen DNA lebih dari 200-bp sulit diperoleh dari surimi karena adanya kemungkinan degradasi DNA (Khallaf *et al.* 2016). Degradasi DNA dapat diakibatkan

oleh penambahan bahan pengawet dan aditif yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas DNA produk. Salah satunya terjadi pada lebih tingginya konsentrasi ikan layur segar dari pada ikan layur olahan pada penelitian Abdullah *et al.* (2019). DNA *mini-barcoding* merupakan alternatif yang digunakan dengan memfokuskan pada fragmen DNA yang lebih pendek dan telah terbukti efektif dalam memperoleh informasi urutan DNA dari spesimen DNA yang telah terdegradasi (Shokralla *et al.* 2015). Autentikasi produk olahan berbahan dasar surimi penting untuk dilakukan, dalam mengantisipasi dan mencegah terjadinya *mislabeling* dan penggunaan bahan baku ikan hasil dari *overfishing*, mengandung toksik, serta ikan yang dilindungi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah enam produk olahan surimi impor yaitu *crabstick* (CS), surimi *crab claw king* (CL), *chikuwa* (C), dan tiga sampel *fish ball* dari berbagai merek dengan kode S1, S2, dan S3. Sampel produk olahan dengan bahan dasar surimi dapat diperoleh dari pasar modern dan kemudian disimpan di dalam *freezer*. Bahan lainnya yaitu kit isolasi DNA (QIAGEN DNeasy Food Mericon, Venlo, Netherlands), kit PCR (KAPA Taq PCR Kits, Kapabiosystems, Wilmington, USA), ddH<sub>2</sub>O, empat jenis primer (primer spesifik ikan buntal atau *puffer fish* yang dirancang pada penelitian ini, primer fish universal F1R1/F2R2 (Ward *et al.* 2005), dan primer *fish universal mini-barcode* (Shokralla *et al.* 2015), *marker* DNA (VC 100 bp plus *DNA ladder*, VIVANTIS, Selangor Darul Ehsan, Malaysia), *cybergreen*, agarosa (SeaKem®LE Agarose, Lonza, Rockland, ME USA), *buffer* TBE (AccuGENETIM 10X TBE Buffer, Lonza, Rockland, ME USA).

Alat-alat yang digunakan yaitu *microtubes* TUBE-150-C (Extragene, Taichung, Taiwan) dan PCR-02-C (Axygen, California, USA), pipet tips RC-10/20-L dan RC-250/20-C (Mettler Toledo, Bekasi, Indonesia), *micropipette* 2-10 µL, dan 20-200 µL (ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland),

*freezer*, *waterbath sonicator* (BANDELIN electronic, Berlin, Germany), *vortex* (V1-Plus, Biosan, Warren, USA), *spindown* (Corning, New York, USA), sentrifugasi (Centurion Scientific 2041, Libertyville, USA), *microwave* (Sharp, Osaka, Japan), timbangan digital (PGW 254, ADAM®, England), PCR (Applied Biosystem GeneAmp PCR System 9700, ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland), *UV-Transilluminator* (Uvitec, Cambridge, England), elektroforesis (HU6, SCIE-PLAS, Cambridge, England).

### Metode Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari beberapa tahapan. Tahap-tahap tersebut adalah desain primer spesies spesifik ikan buntal yang mengandung jaringan toksik *L. lunaris*, preparasi dan persiapan sampel, isolasi DNA, analisis kemurnian dan konsentrasi DNA, amplifikasi DNA menggunakan PCR, elektroforesis, dan sekuensing.

### Desain primer (Sambrook dan Russell 2001)

Desain primer penting dilakukan untuk keberhasilan proses PCR. Desain primer dapat dilakukan dengan menyejajarkan urutan dari basa nukleotida. Sampel urutan nukleotida diperoleh melalui laman *GenBank* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan memilih bagian *gene* pada *All databases*. Nama spesies ikan buntal atau *Lagocephalus lunaris* ditulis pada kolom pencarian dan dipilih data gen penanda *Cytochrome b* (*cyt b*). Gen penanda *cyt b* merupakan bagian DNA mitokondria yang mempunyai sekuen basa nukleotida bervariasi sehingga memiliki cakupan target lebih luas (Irene 2013). Data basa nukleotida *L. lunaris* yang diperoleh dianalisis menggunakan Primer-BLAST dan diperoleh kandidat pasangan primer ukuran produk PCR 250-350 bp. Kandidat pasangan primer masing-masing di-BLAST melalui situs web <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> dan diperoleh pasangan primer yang spesifik. Desain primer yang telah diperoleh kemudian dievaluasi kembali untuk melihat potensi struktur sekunder serta primer dimernya. Evaluasi tersebut dilakukan menggunakan perangkat

lunak Oligoevaluator™ yang terdapat pada situs web <http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>.

### Isolasi DNA

Proses isolasi DNA dilakukan menggunakan sampel yang telah dihaluskan sebanyak 0,25 gram. Isolasi DNA dilakukan dengan kit komersial Qiagen DNeasy Food Mericon (2016) yang ditujukan untuk ekstraksi asam nukleat khusus sampel makanan. Tahapan isolasi DNA diawali dengan pencampuran sampel dengan *food lysis buffer* sebanyak 1 mL dan 5 µL Proteinase-K. Campuran tersebut kemudian dihomogenisasi dengan vortex, dan di-*spindown*. Tahap selanjutnya adalah inkubasi dengan *waterbath shaker* menggunakan suhu 60°C selama 12 jam dan dihomogenisasi dengan vortex setiap satu jam. Sampel yang telah diinkubasi, disentrifugasi dengan kecepatan 2500 g selama 5 menit. Supernatan diambil 700 µL dan dipindahkan pada *tube* baru, dan ditambahkan dengan kloroform 500 µL kemudian dihomogenisasi dengan vortex.

Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 g selama 15 menit dan terpisah menjadi dua bagian. *Microtube* baru dimiringkan dan ditambahkan larutan *buffer* BP dan supernatan 350 µL kemudian dihomogenkan. Sampel dipindahkan ke QIA *quick spin column* dan disentrifugasi selama 1 menit, 16.300 g. Cairan di *collect tube* dibuang, dan dipasang kembali kemudian disentrifugasi 16.300 g 1 menit. *Tube spin column* dipindahkan ke *microtube* baru dan ditambahkan *buffer* EB 200 µL, kemudian diinkubasi 5 menit pada suhu 15-25°C, disentrifugasi 16.300 g selama

2 menit, dan akan diperoleh isolat DNA. Isolat DNA kemudian dianalisis konsentrasi dan kemurniannya untuk digunakan dalam proses amplifikasi DNA.

### Amplifikasi DNA (Abdullah *et al.* 2019)

DNA isolat yang diperoleh dari proses isolasi, menggunakan teknik amplifikasi PCR. Bahan-bahan untuk PCR *mix* yang digunakan yaitu Kappa Taq *biosystem*, ddH<sub>2</sub>O, primer *forward* dan *reverse*, dan *template* DNA. Primer yang digunakan pada proses amplifikasi adalah primer *full length fish universal* F1R1/ F2R2 dan *fish universal mini barcode* yang dapat dilihat pada *Table 1*, serta primer spesies spesifik ikan buntal yang terdapat pada *Table 4*. Primer *fish universal* dapat diaplikasikan untuk mendeteksi keberadaan DNA ikan secara universal, sedangkan primer spesies spesifik ikan buntal diaplikasikan untuk mendeteksi keberadaan ikan buntal spesies *Lagocephalus lunaris*. PCR *mix* tersebut kemudian dihomogenisasi menggunakan vortex sebelum dimasukkan ke dalam alat PCR. Proses yang terjadi pada DNA selama tahap PCR yaitu predenaturasi, denaturasi, *annealing*, ekstensi, dan *post*-ekstensi dengan kondisi yang berbeda pada setiap jenis primer. Kondisi PCR pada masing-masing primer dapat dilihat pada *Table 2*. Hasil amplifikasi DNA atau disebut produk PCR, kemudian dianalisis secara visual menggunakan elektroforesis untuk mengetahui keberhasilan proses PCR sebelum dilanjutkan pada tahap sekuensing.

### Analisis Data Genetik

Data yang diperoleh dalam penelitian adalah data urutan sekuen basa nukleotida

Table 1 Primers applied in the study of DNA barcoding application for seafood label traceability of various commercial surimi-based products

Primers	Sequences (5'-3')	Amplicon size (bp)	Targets	References
F1R1	<i>FishF1</i> TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	655	<i>Fish universal</i>	Ward <i>et al.</i> (2005)
	<i>FishR1</i> TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA			
F2R2	<i>FishF2</i> TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	655	<i>Fish universal</i>	Ward <i>et al.</i> (2005)
	<i>FishR2</i> ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA			
Mini-barcode	<i>MiniF</i> ATCACAAAGACATTGGCACCCCT	295	<i>Fish universal</i>	Sultana <i>et al.</i> (2017)
	<i>MiniR</i> AATGAAGGGGGGAGGAGTCAGAA			

Table 2 Amplification conditions for all primers in the study of DNA barcoding application for seafood label traceability of various commercial surimi-based products

PCR Steps	Primers					
	F1R1/F2R2 (Ward <i>et al.</i> 2005)		Mini-barcode (Sultana <i>et al.</i> 2017)		Lago F/R (designed in this research)	
	Temperature (°C)	Time	Temperature (°C)	Time	Temperature (°C)	Time
Pre denaturation	95	3 min	95	3 min	95	5 min
Denaturation	95	30 sec	95	30 sec	95	30 sec
Annealing	54	30 sec	62	35 sec	59	30 sec
Extention	72	30 sec	72	40 sec	72	30 sec
Post extention	72	1 min	72	5 min	72	1 min

yang dihasilkan dari proses sekuensing. Proses sekuensing dilakukan pada isolat DNA yang sudah berhasil diamplifikasi dengan metode Sanger (Sanger *et al.* 1977) di PT Genetika Science. Analisis data dilakukan dengan analisis bioinformatika menggunakan piranti lunak MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis 6*) untuk analisis komparatif DNA dari data yang dihasilkan (Kumar *et al.* 2016). Urutan basa nukleotida yang diperoleh dicocokkan dengan data yang terdapat pada GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dan juga dengan basis data BOLD *system* khusus untuk DNA *barcoding*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Konsentrasi dan Kemurnian Isolat DNA Produk

Isolasi DNA memiliki peran yang penting pada keberhasilan dalam ekstraksi pemurnian dan kuantitas dari DNA. Prinsip isolasi DNA adalah adanya proses pelisisan pada sel, ekstraksi, dan pengendapan

(Maulid *et al.* 2016). Pelisisan merupakan proses lisis atau perusakan sel menggunakan protease, dilanjutkan dengan ekstraksi yaitu mengeluarkan materi di dalam organel sel dengan menghancurkannya. Proses pengendapan merupakan pemisahan material DNA dengan materi lain pada organel sel melalui perbedaan berat. Isolat DNA yang diperoleh dapat diketahui konsentrasi serta kemurniannya. Analisis dilakukan menggunakan spektrofotometer NanoDrop dengan volume sampel yang dianalisis yaitu 1  $\mu$ L pada masing-masing sampel. Hasil analisis konsentrasi dan kemurnian isolat DNA terdapat pada *Table 3*.

Angka kemurnian dengan rasio lebih dari 2.0 terindikasi adanya kontaminan berupa RNA, sedangkan nilai kurang dari 1.8 dapat terindikasi adanya kontaminan berupa protein (Khosravinia *et al.* 2007). Parameter ini merupakan nilai yang digunakan dalam menjamin hasil PCR yang baik pada proses amplifikasi. Nilai kemurnian yang tidak berada pada angka tersebut diduga merupakan isolat dengan kontaminan yang

Table 3 DNA concentration of Surimi-based products

Sample	DNA Concentration (ng/ $\mu$ L)	DNA purity ( $A_{260}/A_{280}$ )
S1	8.5	1.06
S2	3.6	1.22
S3	4.4	1.06
C	2.0	0.80
CL	6.2	1.12

information : S1= fishball 1, S2= fishball 2, S3= fishball 3, C= chikuwa, CL= clawking crab, CS= crabstick.

berupa lipid, protein, polisakarida, serta senyawa anorganik dan organik. Kontaminan tersebut dapat mengurangi kualitas DNA dan mengganggu keberhasilan analisis pada tahap selanjutnya (Muhammad *et al.* 2016). Angka kemurnian rendah pada sampel dapat disebabkan oleh adanya kontaminasi protein yang diperoleh dari bahan campuran dalam proses pembuatan produk surimi.

### Profil Primer Spesifik Ikan Buntal

Hasil rancangan primer yang telah dievaluasi menunjukkan panjang pasang basa pada primer *forward* dan *reverse* yaitu 20 bp yang tergolong optimal. Panjang primer PCR yang optimal adalah 18-22 bp (Borah 2011). Hasil evaluasi primer yang diperoleh dapat dilihat pada *Table 4*. Rentang panjang pasang basa tersebut cukup optimal untuk pengikatan primer dengan template pada suhu *annealing*. *Melting temperature* ( $T_m$ ) atau suhu leleh dapat didefinisikan sebagai suhu dimana satu dari bagian DNA untai ganda akan terpisah menjadi untai tunggal atau *single stranded*. Suhu leleh yang terdapat pada hasil rancangan primer *forward* adalah 59,90°C dan pada primer *reverse* adalah 60,11°C. Kriteria standar suhu leleh pada perancangan primer adalah 52-68°C (Kalendar *et al.* 2011). Nilai  $T_m$  terlalu rendah dapat menyebabkan terdeteksinya produk yang tidak spesifik akibat adanya ketidakcocokan pasang basa, sedangkan nilai  $T_m$  yang terlalu tinggi pada suatu rancangan primer dapat menyebabkan hasil produk PCR yang cenderung lebih rendah dan berpotensi menghasilkan struktur sekunder (Borah 2011). Nilai  $T_m$  juga dapat digunakan dalam penentuan nilai  $T_m$  atau *annealing* temperatur pada proses PCR.

Nilai konten GC yang pada rancangan primer *L. lunaris* yaitu 55% pada primer *forward* dan *reverse*. Nilai konten GC yang sesuai berada pada angka dengan rentang nilai 45-65% (Kalendar *et al.* 2011). Konten

GC menunjukkan persentase jumlah G (guanin) dan C (sitosin) pada suatu primer yang membuat untai DNA yang lebih kuat dan stabil. Struktur sekunder pada primer dapat menghambat proses PCR dan menurunkan hasil produk PCR, oleh karena itu adanya struktur sekunder harus dihindari (Ozturk dan Can 2017). Primer dimer dapat disebabkan oleh adanya hasil amplifikasi dari primer itu sendiri sehingga dapat menyebabkan hasil yang tidak sesuai pada amplifikasi produk PCR (Dieffenbach *et al.* 1993). Formasi *hairpin loop* yang stabil pada primer dapat menurunkan kemampuan primer untuk mengikat target, sehingga dapat menyebabkan terjadinya primer dimer (Kalendar *et al.* 2009). Primer yang baik adalah primer yang tidak memiliki struktur sekunder dan primer dimer sehingga penting untuk diperhatikan hasil evaluasi dari primer yang telah dirancang.

### Amplikon DNA Produk PCR

Primer yang digunakan pada analisis produk olahan berbasis surimi ini di antaranya adalah primer universal ikan F1R1 dan F2R2, *fish universal mini barcode*, serta primer spesifik ikan buntal *Lagocephalus lunaris*. Proses PCR dilakukan menggunakan isolat DNA produk. Hasil amplifikasi produk PCR selanjutnya dianalisis secara kualitatif menggunakan gel agarosa pada proses elektroforesis.

Produk olahan surimi yang diamplifikasi dengan primer F1R1 dan F2R2 menggunakan suhu *annealing* 54°C menunjukkan terdapatnya pita pada sampel. Primer *fish universal* memiliki panjang 655 pasang basa (Ward *et al.* 2005). Amplifikasi DNA sampel selanjutnya dapat dilakukan menggunakan primer *universal fish mini-barcode*. Pendekatan *mini barcode* memfokuskan pada fragmen yang lebih pendek sehingga lebih efektif untuk mendapatkan informasi urutan DNA sampel pada produk olahan. Panjang pasang basa primer target yaitu 295 bp. Panjang pasang

Table 4 Species-specific primers for *Lagocephalus lunaris*

Primers	Sequences (5'-3')	Base pairs	$T_m$ (°C)	GC %	Secondary structure	Primer Dimer
Forward	CGCTGCTCGGACTATGTCTT	20	59.90	55	Weak	None
Reverse	ACGAAGGCAGTGGCTATGAC	20	60.11	55	None	None

basa pada primer mini *barcode* berada pada rentang angka 100-300 bp (Shokralla *et al.* 2015).

Optimasi suhu proses penempelan primer (*annealing*) dengan menggunakan primer *mini-barcode* dapat dilihat pada *Figure 1*. Optimasi suhu *annealing* dilakukan karena hasil produk PCR belum optimal apabila mengacu kepada hasil penelitian sebelumnya, sehingga diperlukan pencarian suhu optimum untuk produk olahan berbasis surimi. Tujuan lainnya adalah untuk memperoleh suatu kondisi optimum dimana seluruh sampel dapat teramplifikasi. Suhu *annealing* yang diujikan pada amplifikasi dengan primer *mini-barcode* yaitu 57°C, 59°C, 60°C, dan 62°C. Suhu amplifikasi optimum yang diperoleh berdasarkan hasil visualisasi dengan gel agarosa produk PCR adalah 62°C, yang ditandai dengan teramplifikasinya keenam jenis sampel.

Amplifikasi isolat DNA produk surimi menggunakan primer spesies spesifik *Lagocephalus lunaris* dilakukan dengan suhu *annealing* 54°C, 57°C dan 60°C. Primer spesifik dapat menunjukkan spesies spesifik pada DNA target, yang dilihat menggunakan visualisasi

gel agarosa dan sinar ultraviolet. Aplikasi penggunaan primer spesies spesifik ikan buntal *Lagocephalus lunaris* dengan panjang basa target 283 bp yang telah dirancang sudah diaplikasikan pada keenam sampel produk olahan surimi. Pita DNA yang tidak diperoleh tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu tidak digunakannya bahan baku *L. lunaris* pada keenam sampel atau kondisi PCR yang belum optimum diaplikasikan pada primer.

### Identitas Label Produk Berbasis Surimi

Identifikasi jenis spesies pada produk olahan surimi dilakukan pada empat sampel yaitu sampel *fishball* 1 (S1), sampel *fishball* 2 (S2), sampel *fishball* 3 (S3) dan *crabstick* (CS). Sampel yang diidentifikasi merupakan tiga sampel *fishball* dan satu sampel produk surimi yang mewakili produk kepiting imitasi. Sampel *Chikuwa* (C) tidak dianalisis lebih lanjut karena nilai konsentrasi dan kemurnian yang rendah berdasarkan *Table 3*, sehingga berpotensi terjadinya ketidakberhasilan pada proses identifikasi sekuen DNA sampel. Sampel S1, S3 dan CS merupakan produk

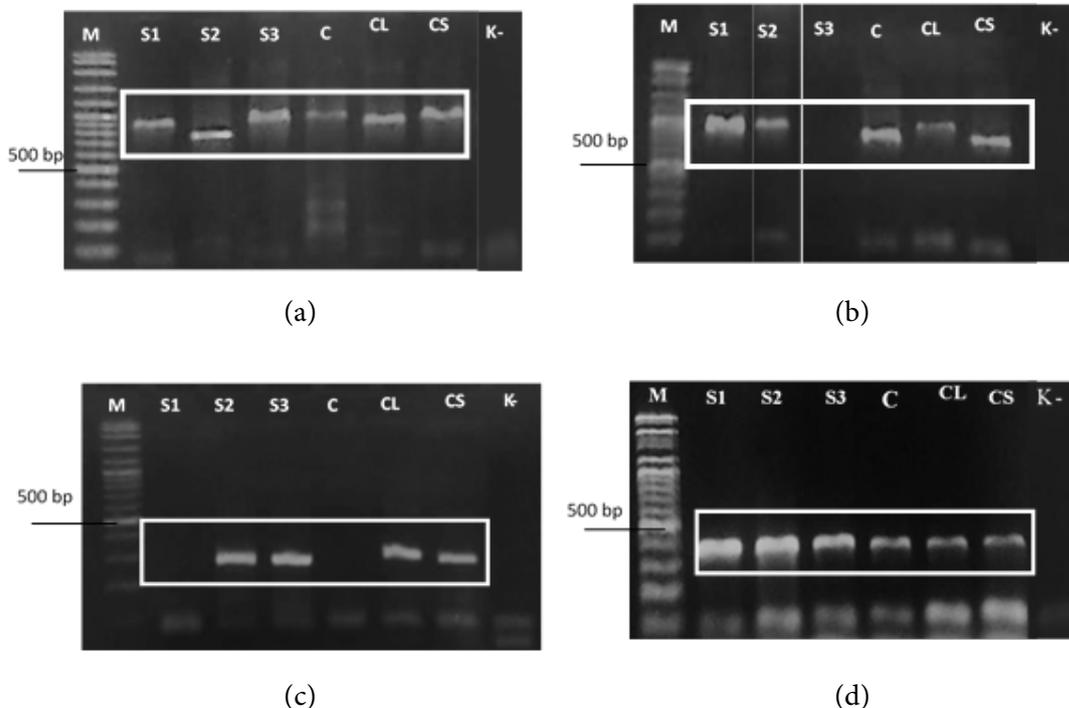


Figure 1 DNA mini-barcode amplification using different annealing temperatures: 57°C (a), 59°C (b), 60°C (c), 62°C (d)

Table 5 Species Identification results of surimi-based products

Sample codes	Identification results	Indonesian name	Homology	E-value	Accession numbers
NCBI BLAST					
S1	<i>Coryphaena hippurus</i>	Mahi-mahi	96.32%	0.0	MH194535.2
S2	<i>Nemipterus bathybius</i>	Kurisi	93.54%	0.0	KT375565.1
S3	<i>Nemipterus bathybius</i>	Kurisi	94.77%	0.0	KY371794.1
CS	<i>Evynnis cardinalis</i>	Kuro	97.80%	0.0	KJ012361.1
BOLD system					
S1	<i>Coryphaena hippurus</i>	Mahi-mahi	98.72%	-	
S2	<i>Nemipterus bathybius</i>	Kurisi	94.15%	-	
S3	<i>Nemipterus bathybius</i>	Kurisi	94.76%	-	-
CS	<i>Evynnis cardinalis</i>	Kuro	98.37%	-	

Information: S1= Fishball 1, S2 = Fishball 2, S3 = Fishball 3, CS = Crabstick

PCR yang diamplifikasi dengan primer DNA barcode *full-length*, sedangkan sampel S2 diamplifikasi menggunakan primer F2R2. Sampel produk surimi tersebut dianalisis menggunakan analisis sekuen dengan mengurutkan dan menyejajarkan urutan basa nukleotida yang diperoleh. Hasil identifikasi spesies pada produk surimi yang diperoleh dari GenBank berdasarkan analisis pada sekuen terdapat pada *Table 5*.

Identifikasi jenis spesies pada bahan baku olahan surimi dilakukan menggunakan hasil dari produk PCR. Identifikasi dilakukan pada sampel S1,S2,S3 dan CS yang menggunakan dua jenis primer *fish universal* berbeda. Berdasarkan hasil analisis sekuen menggunakan BLAST spesies sampel yang terdeteksi yaitu *Coryphaena hippurus* atau ikan mahi-mahi pada sampel S1, *Nemipterus bathybius* atau ikan kurisi pada sampel S2 dan S3, serta *Evynnis cardinalis* atau ikan kuro pada sampel CS. Homologi sekuen dan perbandingan dengan GenBank menggunakan NCBI BLAST dan BOLD system menunjukkan angka persentase yang beragam. Identifikasi pada dua website berbeda bertujuan memperoleh hasil identifikasi yang lebih spesifik.

Persentase homologi sampel dengan data GenBank NCBI menunjukkan sampel S1 memiliki persentase homologi 96,32% dengan ikan mahi-mahi, sampel S2 dan S3 adalah 93,54% dan 94,77% dengan spesies ikan

kurisi, sedangkan sampel CS menunjukkan hasil homologi sebesar 97,80% dengan ikan kuro. Hasil identifikasi menggunakan BOLD system menunjukkan persentase homologi pada sampel S1 98,72% dengan ikan mahi-mahi, sampel S2 dan S3 94,15% dan 94,76% dengan ikan kurisi, sedangkan sampel CS 98,37% dengan ikan kuro. Drancourt *et al.* (2000) menjelaskan nilai homologi berada pada angka  $\geq 99\%$  sekuen tersebut merupakan spesies yang sama, sedangkan nilai  $\geq 97\%$  menunjukkan spesies yang memiliki kesamaan pada genus. Bhattacharjee *et al.* (2012) menjelaskan angka homologi pada rentang 98%-100% memiliki homologi jenis spesies, nilai 93%-97% memiliki homologi pada genus, dan  $\leq 91\%$  tidak signifikan apabila dibandingkan dengan data yang diperoleh dari GenBank. Data hasil sekuensing pada *Table 5* menunjukkan sampel S1, S2, S3, dan CS tidak menggunakan bahan baku ikan buntal berdasarkan hasil identifikasi data GenBank.

Data sekuen spesies hasil identifikasi dari produk surimi dapat dianalisis lebih lanjut melalui analisis kekerabatan dengan sekuen spesies sejenis yang terdapat pada GenBank. Kekerabatan antar spesies dilihat menggunakan topologi pohon filogenetik yang merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan pada suatu taksa atau sekuen (Hall 2013). Metode ini dilakukan menggunakan perbandingan antara data

sekuen yang diperoleh, dengan data homologi sekuen yang terdapat pada GenBank yang kemudian diolah menggunakan aplikasi MEGA.

Data yang digunakan terdiri dari dua jenis yaitu sekuen dengan kesamaan spesies serta sekuen dengan kesamaan genus terhadap data sampel hasil BLAST. Hasil BLAST pada *Table 5* menunjukkan persentase homologi yang tidak mencapai 99% pada masing-masing sampel, sehingga terdapat kemungkinan homologi sampel dengan data GenBank hanya menunjukkan kesamaan pada genus. Data spesies dengan keterkaitan yang erat penting dianalisis untuk mengetahui kekerabatan antara data sekuen sampel dengan GenBank (Kusken *et al.* 2006). Pohon filogenetik dapat dirancang dengan metode *Neighbour Joining Tree* atau NJT menggunakan analisis *bootstrap*. Metode NJT dapat mengkonstruksi pohon filogeni yang baik dan memilih sekuen yang memiliki estimasi terbaik dalam menunjukkan jarak yang nyata diantara sekuen yang digabungkan. Analisis *bootstrap* digunakan untuk menguji validitas data sekuen untuk penyusunan cabang pada pohon filogenetik (Dharmayanti 2011). Metode *bootstrap* memiliki nilai tertentu untuk menentukan jumlah pengulangan pada penyejajaran sekuen, sehingga dapat diketahui kemungkinan kekerabatan spesies pada pohon filogeni dengan data yang lebih akurat (Hills dan Bull 1993).

Nilai *bootstrap* dapat menunjukkan kestabilan cabang pada pohon filogenetik yang diperoleh. Analisis menggunakan pohon filogenetik dilakukan pada sekuen produk PCR. Nilai *bootstrap* cabang yang semakin tinggi dapat menunjukkan percabangan yang semakin kuat pada pohon filogenetik spesies. Analisis menggunakan pohon filogeni sampel S1, S2, S3, dan CS dilakukan menggunakan nilai *bootstrap* 1000 kali, yang berarti dilakukan 1000 kali pengulangan penyejajaran data. Hasil yang diperoleh menunjukkan sampel S1 membentuk kelompok dengan spesies *Coryphaena hippurus* dengan nilai *bootstrap* 100%, sampel S2 dan S3 berkelompok dengan spesies *Nemipterus bathybius* dengan nilai *bootstrap* 85% dan 89%, sedangkan sampel CS berkelompok dengan spesies *Eynniss*

*cardinalis* dengan nilai *bootstrap* 100%. Pohon filogenetik produk olahan ikan berbasis surimi dapat dilihat pada *Figure 2*.

## KESIMPULAN

Primer spesifik spesies *Lagocephalus lunaris* sudah dirancang serta dievaluasi dan dapat diaplikasikan pada proses amplifikasi untuk menganalisis bahan baku ikan buntal pada produk olahan surimi. Amplifikasi menggunakan *full length DNA barcoding* dan *mini-barcode* menunjukkan terdeteksinya bahan baku ikan pada keenam sampel yang digunakan. Identitas label produk surimi menggunakan analisis bioinformatika sekuen menunjukkan sampel S1, S2, S3 dan CS menggunakan bahan baku ikan mahi-mahi, ikan kurisi, dan ikan kuro.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah A, Nurilmala M, Sitaresmi KP. 2019. DNA mini-barcodes sebagai penanda molekuler untuk ketertelusuran label pangan berbagai produk ikan layur. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 22(1):33-40.
- Ajitama Y. 2017. Autentikasi kerupuk udang dengan metode DNA barcoding. [skripsi]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Astuti RT, Darmanto YS, Wijayanti I. 2014. Pengaruh penambahan isolat protein kedelai terhadap karakteristik bakso dari surimi ikan swanggi (*Priacanthus tayenus*). *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*. 3(3):47-54.
- Astuti Y. 2018. Deteksi bahan baku ikan pada produk olahan melalui gen penanda COI. [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Barcaccia G, Lucchin M, Cassandro M. 2016. DNA barcoding as a molecular tool to track down mislabeling and food privacy. *Diversity*. 8(2):1-16.
- Bhattacharjee MJ, Laskar BA, Dhar B, Ghosh SK. 2015. Identification and re-evaluation of freshwater catfishes through DNA barcoding. *Plos One*. 7(11):1-7.
- Borah P. 2009. Primer designing for PCR. *Science Vision*. 11(3):134-136.
- Dharmayanti NLP. 2011. Filogenetika molekuler: metode taksonomi organisme

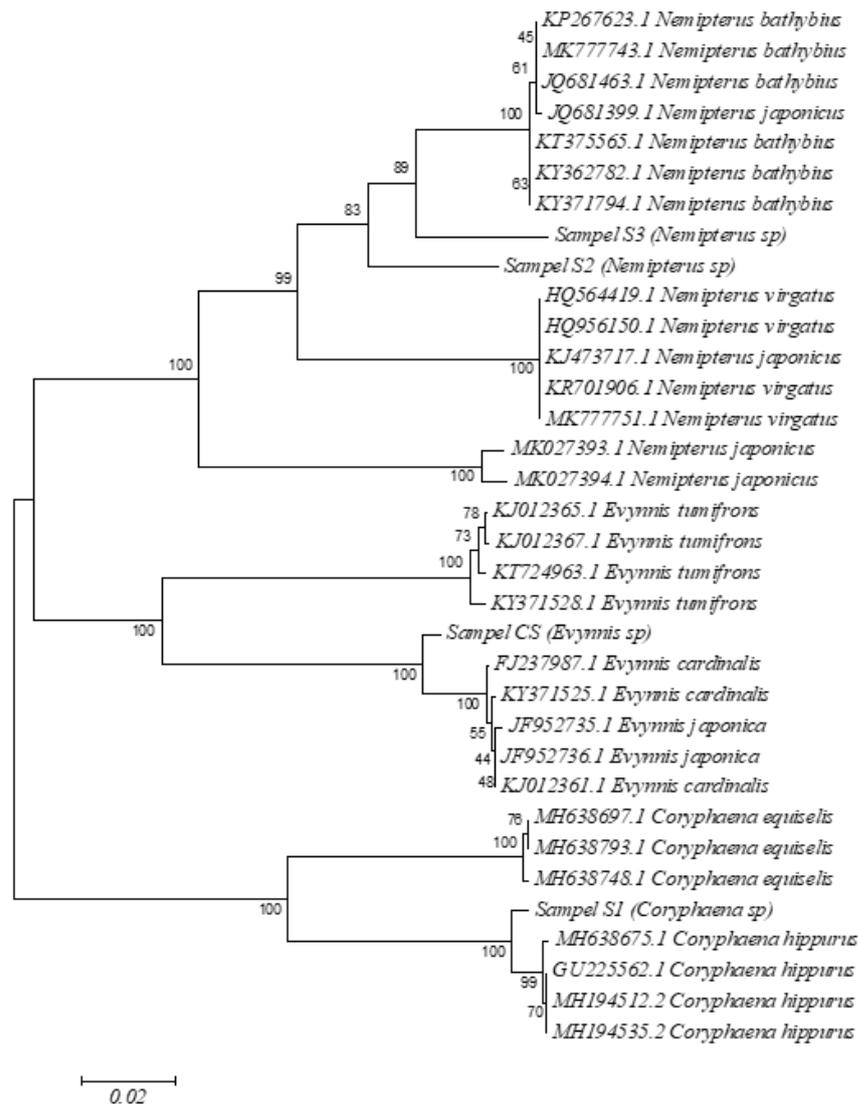


Figure 2. Phylogenetics analysis of seafood samples

- berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*. 21(1):1-10
- Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. 1993. *General Concept for PCR Primer Design*. New York (US) : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 2000. 16s Ribosomal dna sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(10): 3623-3630.
- Espineira M, Herrero B, Vieites JM, Santaclara FJ. 2010. Validation of end-point and real-time PCR methods for the rapid detection of soy allergen in processed products. *Food Additives and Contaminants*. 27(4):426-432.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. New York (US): Pham cu.
- Hall BG. 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*. 30 (5): 1229-1235.
- Haye PA, Segovia NI, VeraR, Gallardo MA, Escarate CG. 2012. Authentication of commercialized crab-meat in Chile using DNA barcoding. *Food Control*. 25: 239-244.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of

- bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*. 42(2):182-192.
- Hsieh CH, Chang WT, Chang CH, Hsieh HS, Chung YL, Hwang DF. 2010. Puffer fish-based commercial fraud identification in a segment of cytochrome b region by PCR-RFLP analysis. *Food Chemistry*. 121:1305-1311.
- Irene. 2013. Penggunaan gen sitokrom  $\beta$  (cyt  $\beta$ ) dalam identifikasi spesies anjing, kucing, dan harimau untuk menjamin keaslian produk pangan dan obat. [skripsi]. Institut Pertanian Bogor.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH. 2011. Java web tools for PCR in silico PCR, and oligonukleotide assembly and analysis. *Genomics*. 98:137-144.
- Keskin E, Atar HH. 2012. Molecular identification of fish species from surimi-based product labeled as Alaskan Pollock. *Journal of Applied Ichthyology*. (2012):1-4.
- Khallaf AG, Ardura A, Borrel YJ, Vazquez EG. 2016. Towards more sustainable surimi? PCR-cloning approach for DNA barcoding reveals the use of species of low trophic level and aquaculture in Asian surimi. *Food Control*. 61:62-80.
- Khosravinia H, Murthy HNN, Parasad DT, Pirany N. 2007. Optimizing factors influencing DNA extracting from fresh whole avian blood. *African Journal of Biotechnology*. 6(4):481-486.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7):1870-1874.
- Kuske CR, Barns SM, Grow CC, Merrill L, Dunbar J. 2006. Environmental survey for four pathogenic bacteria and closely related species using phylogenetic and functional genes. *Journal Forensic Science*. 51(3):548-558.
- Leal MC, Pimentel T, Ricardo F, Rosa R, Calado R. 2015. Seafood traceability: current needs, available tools, and biotechnological challenges for origin certification. *Trends in Biotechnology*. 30(10): 1-6.
- Maulid DY, Nurilmala M. 2015. DNA barcoding untuk autentikasi produk ikan tenggiri (*Scomberomorus* sp). *Jurnal Akuatika*. 6(2):154-160.
- Muhammad H, Iqbal Z, Iqbal MU, Younas T, Bashir Q. 2016. An efficient method for DNA Isolation from fish fin. *Pakistan Journal of Agricultural Science*. 53(4): 843-850.
- 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*. 1(2):1-16.
- Muttaqin E, Abdullah A, Nurilmala M, Ichsan M, Simeone BM, Yulianto I, Booth H. 2019. DNA-barcoding as molecular marker for seafood forensics: Species identification of locally consumed shark fish products in the world's largest shark fishery. *IOP Conf. Series:Earth and Environmental Science*. 278:1-10.
- Noguchi T, Arakawa O. 2008. Tetrodotoxin-distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Marine Drugs*. 6:220-242.
- Ozturk AR, Can T. 2017. A multiplex primer design algorithm for target amplification of continuous genomic regions. *BMC Bioinformatics*. 18(306):1-9.
- Park JW. 2005. *Surimi and Surimi Seafood* : Second Edition. Boca Raton [US] : Taylor and Francis Group.
- Rostini I. 2013. Pemanfaatan daging limbah filet ikan kakap merah sebagai bahan baku surimi untuk produk perikanan. *Jurnal Akuatika*. 4(2):141-148.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 3rd Edition. New York (USA): Cold Spring Harbor.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(12):5463-5467.
- Shokralla S, Hellberg RS, Handy SM, King I, Hajibabaei M. 2015. A DNA mini-barcoding system for authentication of processed fish product. *A Nature Research Journal*. 5(15894):1-11.

- Sultana S, Ali ME, Hossain MA, Asing, Naquiah N, Zaidul IS. 2017. Universal mini COI barcode for the identification of fish species in processed products. *Food Research International*. 105:19-28.
- Syafaruddin, Randriani E, Santoso TJ. 2011. Efektivitas dan efisiensi teknik isolasi dan purifikasi DNA pada jambu mete. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*. 2(2):151-160.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert DN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Science*. 360:1847-1857.
- Wawasto A, Santoso J, Nurilmala M. 2018. Karakteristik surimi basah dan kering dari ikan baronang (*Siganus* sp.). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(2):367-377.
- Westermeier R. 2004. *Protein Purification Protocols*. Germany (DE) : Humana Press