

DNA *Barcoding* untuk Autentikasi Produk Ikan Tenggiri (*Scomberomorus sp*)

DNA Barcoding for Authentication of Mackerel (Scomberomorus sp) Products

Deden Yusman Maulid dan Mala Nurilmala

Departemen Teknologi Hasil Perairan-FPIK IPB
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga 16680 Bogor
E-mail korespondensi : dyusmanmaulid@yahoo.com

Abstrak

Kebutuhan produk perikanan terus meningkat seiring dengan pertumbuhan populasi manusia. Keterbatasan bahan baku menyebabkan meningkatnya biaya produksi dan berpotensi menimbulkan kecurangan perdagangan untuk meningkatkan keuntungan sepihak. Ikan Tenggiri (*Scomberomorus sp*) merupakan ikan perenang cepat dan sering digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan produk perikanan. Proses Pengolahan menyebabkan ikan ini sulit dikenali secara morfologi. Pendekatan molekuler melalui amplifikasi DNA menjadi jalan keluar untuk mengetahui keaslian produk yang telah mengalami perubahan bentuk. Sampel yang telah dikumpulkan terdiri dari baso (Sio), empek-empek (PLm), kerupuk pasar tradisional (KrPsa), dan kerupuk pasar modern (KrLM). dan. Produk tersebut berlabel ikan Tenggiri. Primer yang didesain adalah *Cytochrome b* dengan target 380bp, merupakan salah satu gene penyandi pada DNA mitokondria. Analisis kesejajaran digunakan untuk mengetahui kedekatan kekerabatan species. Berdasarkan hasil penelitian ini, tiga produk yaitu baso, kerupuk dari pasar modern (KrLM), dan empek-empek diketahui menggunakan bahan baku ikan tenggiri, akan tetapi kerupuk yang diperoleh dari pasar tradisional (KrPsa) tidak terlacak menggunakan bahan baku ikan tenggiri.

Kata kunci : Autentikasi, Primer, Tenggiri

Abstract

Demand of fish product has been increasing along with growing human population. Limitation of raw materials has impact to higher production costs. Thus, it has potentially fraudulent trade causing consumers disadvantages. Mackerel (*Scomberomorus sp*) is a fast swimmer fish and familiar as a raw material in the manufacturing of fishery products. Processing causes mackerel fish unrecognizable as morphology. Then, molecular approach through DNA amplification could be a way out to determine the authenticity of the products that have undergone changes in its shape. Samples have been collected which consisted of fish ball (Sio), empek-empek (PLm), cracker (kerupuk) obtained from traditional market (KrPsa), and cracker from modern market (KrLM).. Primers were used to amplify the target of 380bp from cytochrome b which is one of the gene encoding the mitochondrial DNA. Alignment analysis was used to determine the genetic relationship of fish species. This study showed that three sample of fishery products namely fish ball, cracker (kerupuk) form modern market ((KrLM)), and empek-empek contained fish mackerel as its raw materials, while cracker from traditional market (KrPsa) did not contain fish mackerel.

Keywords : Authentication, Primer, *Scomberomorus*

Pendahuluan

Ikan tenggiri (*Scomberomorus* sp) merupakan salah satu jenis ikan yang dimanfaatkan dalam berbagai jenis produk olahan dan tersebar di pasaran dalam jumlah banyak. Ikan ini merupakan bagian dari famili Scombridae yang terdiri dari 15 genus dan 51 spesies (Collete *et al.* 2003). Tenggiri dapat diolah menjadi bahan kerupuk, siomay, dan empek-empek.

Olahan ikan dalam kemasan memiliki daya tarik tersendiri bagi konsumen. Berbagai keuntungan dirasakan, seperti lebih awet dan instan. Namun demikian, kondisi ini memunculkan kemungkinan adanya pemalsuan produk oleh produsen dalam rangka meningkatkan keuntungan (Jacquet dan Pauly 2008). Bentuk pemalsuan dapat berupa penggunaan ikan substitusi, yaitu jenis ikan yang berbeda dari jenis ikan yang ada pada label atau mencampurnya (Mackie *et al.* 1999). Substitusi merupakan kamuflase paling mudah dilakukan pada ikan olahan karena sulitnya mengidentifikasi produk, sehingga peluang terjadinya *mislabelling* menjadi meningkat (Haye *et al.* 2012). Kondisi ini tentu tidak baik bagi masyarakat yang mengonsumsi karena menyebabkan kerugian biaya keluar (*cost*) yang lebih mahal karena ikan substitusi merupakan ikan dengan harga murah. Selain itu, juga dapat menyebabkan gangguan kesehatan (Van Leeuwen *et al.* 2009), seperti alergi pada jenis ikan tertentu, atau keracunan karena penggunaan ikan beracun/*puffer fish* (Huang *et al.* 2014). Adanya pemalsuan ini juga mengganggu hak konsumen dalam memperoleh "*enforcement of labelling regulation*" (Mackie *et al.* 1999).

Berbagai upaya identifikasi dan autentikasi produk telah dikembangkan (Filonzi *et al.* 2010; Marko *et al.* 2004), mulai dari identifikasi klasik, pendekatan protein, hingga DNA. Identifikasi produk

segar dapat dilakukan dengan pendekatan karakteristik morfologi, seperti ukuran, warna, bentuk, tampilan, dan sebagainya. Namun, proses pengolahan seperti pemanasan, pembekuan, pengalengan, dan pengolahan lainnya menyulitkan identifikasi (Mackie *et al.* 1999; Jérôme *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2013). Identifikasi dengan pendekatan protein yang pernah berkembang juga belum mampu mengidentifikasi produk olahan dengan baik, karena pemanasan dapat merusak protein. Salah satu upaya yang dapat digunakan untuk autentikasi produk ini adalah dengan pendekatan DNA, yang dikenal dengan DNA *barcoding*. Meskipun DNA terdegradasi selama pengolahan, namun DNA masih bisa diidentifikasi, bahkan dalam jumlah sampel yang sedikit. Metode DNA juga memiliki keuntungan karena pengujian DNA dapat diprediksi dan tidak bergantung pada jenis spesies, DNA stabil dan spesifik.

Analisis DNA bisa menggunakan inti sel atau mitokondria, namun mitokondria DNA lebih disukai karena perkembangannya lebih cepat, ukurannya lebih kecil, sekuens dari beberapa organisme akuatik dengan pendekatan mitokondria tersedia lengkap, rentang *non-coding* tidak ada (Mackie *et al.* 1999), dan mitokondria DNA lebih sensitif terhadap mutasi. DNA *barcoding* merupakan cara mengkaraktirikan spesies dengan menggunakan arbitrase pendek sekuensing DNA. DNA *barcoding* merupakan metode favorit dalam forensik taksonomi karena efektif dalam mengidentifikasi dalam berbagai kondisi sampel uji dan tidak menghasilkan data yang ambigu (Wong 2011).

Pendekatan yang digunakan untuk analisis DNA adalah mengamplifikasi segmen DNA dari *cytochrome b* dan menentukan sekuensinya (Mackie *et al.* 1999). *Cytochrome b* bisa digunakan untuk menganalisis produk perikanan

(Espineira *et al.* 2009). Desain Primer spesifik memerlukan beberapa sekuens dari ikan yang berdekatan kekerabatannya dan diolah menggunakan software online (Oligoevaluator) dan software offline (bioedit). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kesesuaian bahan baku yang digunakan dengan label produk dan mendapatkan primer spesifik yang digunakan dalam proses amplifikasi PCR.

Bahan dan Metode

Koleksi Sampel

Sample Produk didapatkan dari pasar tradisional dan pasar modern di sekitar Bogor. Sampel yang dikoleksi terdiri dari produk yang berbeda yaitu kerupuk dari pasar tradisional (KrPsa), kerupuk dari pasar modern (KrLm), baso (Sio), dan empek-empek (PLm). Label tiap sampel menerangkan bahwa produk tersebut terbuat dari ikan tenggiri.

Desain Primer

Desain Primer memerlukan beberapa sekuens dari organisme yang kekerabatannya berdekatan. Sekuens individu yang berdekatan didapatkan dari *Gene Bank*. Sekuens tersebut disejajarkan menggunakan *software offline* yaitu bioedit dan dicari suhu leleh menggunakan *software online* yaitu oligoevaluator. Primer yang sudah jadi dipesan melalui perusahaan Qiagen.

Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA dilakukan dengan mengacu pada *manual book kit Qiagen*. Qiagen merupakan perusahaan multinasional dibidang alat dan bahan molekuler yang memiliki perwakilan cabang di Jakarta, Indonesia. komersial kit didapatkan dari qiagen digunakan untuk ekstraksi DNA dari produk. Sampel ditimbang 10-25 mg, dipotong kecil,

kemudian disimpan dalam tabung mikrosentrifuse 1,5 ml. Ditambahkan 180 ul Buffer ATL dan 20 ul proteinase k, dicampur dengan cara divortex, dan diinkubasi 56°C selama 1-2 jam sampai lisis. Selama inkubasi divortex setiap 15 menit. 200 ul Buffer AL ditambahkan dan divortex beberapa detik, kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam spin column 2ml, disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 8000 rpm. Cairan yang dibawah dibuang. Buffer AW1 500ul ditambahkan dan disentrifugasi sebesar 8000 rpm selama satu menit. Cairan pada lapisan bawah dibuang dan tube dimasukkan pada spin column yang baru, kemudian ditambahkan buffer AW2, lalu disentrifugasi pada 14000 rpm, selama 3 menit. DNA dielusi dengan menambahkan 200ul buffer AE pada bagian tengah membran pada spin column yang baru, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit (15-25C), kemudian disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit.

Amplifikasi DNA (Polychains reaction)

Sampel hasil ekstraksi DNA yang digunakan untuk PCR adalah 2 µL. Bahan yang digunakan untuk PCR adalah PCR kit komersial yang didapatkan dari qiagen. DNA template 1 µL ditambahkan pada 25 µL PCR 0,25 µL primer *forward* dan 0,25 µL primer *reverse*. Proses PCR terdiri dari predenaturasi, denaturasi, *annealing*, *ekstention*, dan *post ekstention*. Tahap denaturasi merupakan pemutusan untaian ganda menjadi untaian tunggal pada suhu 94 °C selama 1 menit. Primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA untaian tunggal pada suhu 58-60 °C selama 30 detik, yang kemudian dapat ditingkatkan menjadi 72 °C selama 60 detik ketika telah menempel untuk proses polimerasi. Proses polimerasi dilakukan pada suhu 72 °C selama 7 menit. Pengulangan dilakukan sebanyak 35 siklus untuk mendapatkan ribuan salinan

DNA. Setelah proses polimerasi, suhu diturunkan menjadi 4 °C. siklus untuk mendapatkan ribuan salinan DNA. Setelah proses polimerasi, suhu diturunkan menjadi 4 °C.

Elektroforesis DNA (Klugs and Cummings 1994)

Hasil PCR kemudian diidentifikasi menggunakan elektroforesis. Prinsip kerja elektroforesis ini adalah untuk memisahkan asam nukleat berdasarkan ukuran. Hasil amplifikasi PCR sebanyak 5 µL dimasukkan ke dalam agarosa 1%. Mesin Elektroforesis di-*setting* pada 100 V, 400 mA selama 30 menit Agarosa ditambahkan ethidium bromida untuk memendarkan pita DNA pada waktu penyinaran Ultra Violet. DNA bermuatan negatif, sehingga molekul DNA akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif. DNA yang bermuatan negatif akan ditarik oleh muatan listrik positif, sehingga molekul DNA akan terpisah sesuai dengan ukuran berat molekulnya (Howe 2007). Molekul DNA yang terpisah kemudian divisualisasi menggunakan sinar UV dan akan berpendar karena pewarna yang ditambahkan seperti ethidium bromida.

Hasil Elektroforesis yang positif (ada pita DNA) kemudian disiapkan untuk disekuensing di Amerika Serikat. Sekuensing adalah penerjemahan Rantai DNA yang didapatkan menjadi urutan

basa purin dan pirimidin yang membentuk polinukleotida. Hasil Sekuensing diedit dengan cara disejajarkan untuk identifikasi species maupun melihat kekerabatan

Hasil dan Pembahasan

Desain primer dilakukan berdasarkan sekuen Cyt B dari *Auxis rochei*; *Katsuwonus pelamis*; *Sarda sarda*; *Scomberomorus commersen*; *Thunnus obesus*; *Euthynnus alletteratus*; *Scomber japonicu* yang diperoleh dari data NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Daerah *conserve* diperoleh pada rentang daerah 432 bp untuk *forward* dan *reverse* pada daerah 813 bp diperoleh panjang fragmen sebesar 380 pb. Urutan basa dari primer yang sudah didesain untuk primer *forward* adalah 5'CGTCATTACCAACCTCCTTTC3' dengan suhu *annealing* 62.2°C, sedangkan primer *reverse* adalah 5GCGTATGCAAATAGGAAGTATCA C3' dengan suhu *annealing* 62.4°C. Kedua primer ini selanjutnya digunakan untuk amplifikasi DNA sampel mesin PCR.

Sampel yang dikoleksi terdiri dari kerupuk (KrPsa), kerupuk (KrLm), baso (Sio), empek-empek (PLm). Hasil Ekstraksi didapatkan sekitar 150-200 µL, kemudian di elektroforesis untuk mengetahui keberadaan pita DNA nya.

Hasil Elektroforesis setelah sampel diPCR bisa dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Sampel PCR
Figure 1. The result of electrophoresis of PCR products

Berdasarkan gambar di atas, sampel yang terdeteksi pita DNA adalah kerupuk (KrLm), empek-empek (P), dan bakso (Sio), sedangkan pada kerupuk (KrPsa) tidak terjadi amplifikasi DNA. Panjang pendeknya primer berpengaruh terhadap spesifikasi gen target. Suhu *annealing* juga berpengaruh terhadap keberhasilan perbanyakan DNA pada PCR. Denaturasi pada proses PCR bertujuan untuk membuka pilinan utas DNA, bila terlalu rendah maka utas DNA kemungkinan belum cukup terbuka. Suhu *annealing* yang tepat akan menempelkan primer pada utas DNA yang terbuka, suhu yang terlalu tinggi tidak dapat menempel bagi primer pada utas DNA. Gen target pada sampel sudah sesuai dengan gen target pada saat desain primer yaitu sekitar 380bp (250-500)bp.

Primer yang digunakan adalah dari gen penyandi *Cytochrome b* yang berada pada DNA mitokondria. *Cytochrome b* (*Cyt b*) merupakan salah satu gen penyandi dari 37 jenis gen penyandi yang ada di mitokondria. *Cyt b* biasa digunakan dalam DNA *barcoding* untuk mengidentifikasi species seperti yang dilaporkan Caine dkk pada tahun 2006, bahwa mereka berhasil mengidentifikasi species yang belum sudah hancur dan tidak dikenali dengan menggunakan primer dari gen penyandi *Cyt b*.

Hasil amplifikasi DNA dilanjutkan untuk dilakukan. Hasil sekuensing ketiga sampel setelah diedit menggunakan mega 5.2 adalah sebagai berikut (Tabel 1).

Tabel 1. Urutan Sekuen Tiap Sampel

Table 1. Sequences of sample

Sampel	Sekuen
Kerupuk (KrLm)	5' TCCTTTCCGCAGTCCCTTACGTAGGGACAATGCTCGTCAATGAATCT GAGGCGGCTTCTCAGTAGATAATGCTACCCTCACCCGATTCTTTGCTTT CCACTTCCTCTTCCCCTTCGTCATCCTAGCTATGACAATCCTTCATCTC CTTTTCCTACACGAAACCGGCTCAAATAACCCAATAGGTCTAAACTCT AACGCAGATAAAATTTTCATTCCACCCATACTTCTCCTACAAAGACCTC CTAGGCTTTGCAGTCCTACTAATTGCACTCGTCTCCCTAGCCCTCTTCT CCCCAACCTATTAGGCGACCCAGACAATTTACCCCCGCCAACCCAA TAGTTACCCCGCCCCACATCAAGCCTGAGTGATACTTCTCTATT- GCATACGCAAAAATAGGA 3'
Baso (Sio)	5'CCTTTCCGCAGTCCCTTACGTAGGGACAATGCTCGTCAATGAATCT GAGGCGGCTTCTCAGTAGATAATGCTACCCTCACCCGATTCTTTGCTTT CCAGTTCCTCTTCCCCTTCGTCATCCTAGCTATGACAATCCTTCATCTC CTTTTCCTACCCGAAACCGGCTCAAATAACCCAATAGGTCTAAACTCT AACGCAGATAAAATTTTCATTCCACCCATACTTCTCCTACAAAGACCTC CTAGGCTTTGCAGTCCTACTAATTGAACTCGTCTCCCTAGCCCTCTTCT CCCCAACCTATTAGGCGACCCAGACGATTTACCCCCGCCAACCCAA TAGTTACCCCGCCCCACATCAAGCCGGAGTGATACTTCC 3'
Empek-empek (PLm)	5' TCGTCATTACCAACCTCCTTTCCGCAGTCCCTTACGTAGGGACAATGCT CGTCAATGAATCTGAGGCGGCTTCTCAGTAGATAATGCTACCCTCAC CCGATTCTTTGCTTTCCACTTCCTCTTCCCCTTCGTCATCCTAGCTATGA CAATCCTTCATCTCCTTTTCCTACACGAAACCGGCTCAAATAACCCAA TAGGGCTAAACTCTAACGCAGATAAAATTTTCATTCCACCCATACTTCT CCTACAAAGACCTCCTAGGCTTTGCAGTCCTACTAATTGCACTCGTCTC CCTAGCCCTCTTCTCCCCAACCTATTAGGCGACCCAGACAATTTAC CCCCGCCAACCAATAGTTACCCCGCCCCACATCAAGCCTGAGTGATA CTTCTATTTGCATACGCA3'

Analisis BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*) dilakukan setelah didapatkan urutan basa nukleotida hasil

sekuensing. Hasil ini ditampilkan pada Tabel 2 berikut:

Tabel 2. Homologi Sampel Berdasar analisis BLAST
Table 2. Sample homology based on Based Analysis

Sampel	Kode	Spesies pada label	Hasil analisis	Homologi	Kode Akses
Kerupuk	KrPa	Tenggiri			
Kerupuk	KrLm	Tenggiri	<i>S.commerson</i>	99%	EF141176.1
Baso	Sio	Tenggiri	<i>S.commerson</i>	99%	EF141176.1
Empek-empek	PLm	Tenggiri	<i>S.commerson</i>	99%	EF141176.1

Berdasar tabel diatas, hasil analisis homologi memberikan nilai kemiripan 99% terhadap ikan Tenggiri Papan (*Scomberomorus commerson*).

Simpulan

Tiga sampel yaitu baso (Sio), kerupuk dari pasar modern (KrLM), dan empek-) empek (PLm menunjukkan homologi 99% terhadap ikan tenggiri papan (*Scomberomorus commersen*) akan tetapi satu sampel kerupuk (KrPsa) tidak teridentifikasi yaitu tidak mengandung ikan tenggiri. Primer *Cyt b* yang didesain memiliki panjang gen target 380pb.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DIKTI yang telah mendanai penelitian ini pada skema Hibah Kompetensi.

Daftar Pustaka

Caine L, Lima G. 2006. *Species identification by Cytochrome b gene: Casework samples*. International Congress series 1288 (2006)145-147.
Catanese G, Manchado M. 2010. A Multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in

processed fish products. *Food chemistry* 122 (2010) 319-326.
Collete BB. 2003. *Famili scombridae Rafinesque 1815: mackerels, tunas, and bonitos*. Annotated Checklist of Fishes 19: 1-28.
Españeira M, Gonzalez-Lavín N, Vieites JM, Santaclara FJ. 2009. Development of a method for the identification of scombroid and common substitute species in seafood products by FINS. *Food Chemistry* 117: 698-704.
Filonzi L, Stefania C, Marina V, Francesco NM. 2010. *Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy*. Food Research International.
Haye PA, Segovia NI, Vera R, Gallardo MA, Gallardo-Escárate C. 2012. Authentication of commercialized crab-meat in Chile using DNA Barcoding. *Food Control* 25:239-244.
Howe C. 2007. *Gen cloning and manipulation*. Second Edition. Cambridge University.
Huang YR, Yin MC, Hsieh YL, Yeh YH, Yang YC, Chung YL, Hsieh CHE. 2014. Authentication of consumer fraud in Taiwanese fish production by molecular trace evidence and forensically

- informative nuclear sequencing. *Food Research International* 55: 294-302.
- Jacquet JL, Pauly D. 2008. Trade secrets: renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy* 32(3): 309-318.
- Klug WS, Cummings MR. 1994. *Concept of Genetics. 4th ed.* Prentice hall, Englewood cliffs: xvi+779 hlm
- Mackie IM, Pryde SE, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Pérez-Martin R, Quinteiro J, ReyMendez M, Rehbein H. 1999. Challenges in the identification of species of vanned fish. *Trend and Food Science and Technology* 10: 9-14.
- Van Leeuwen SP, van Velzen MJ, Swart CP, van der Veen I, Traag WA, de Boer J. 2009. Halogenated contaminants in farmed salmon, trout, tilapia, pangasius, and shrimp. *Environmental Science and Technology*.
- Wong LL. 2011. *DNA barcoding and related molecular markers for fish species authentication.* Phylogenetic Assessment and Population Studies. Auburn University. Auburn. Alabama. 118 p.
- Zhao W, Zhao Y, Pan Y, Wang X, Wang Z, Xie J. 2013. Authentication and traceability of *Nibea albiflora* from surimi products by species-specific polymerase chainreaction. *Food Control* 31: 97-101.