

DETEKSI IKAN TUNA DAN PRODUK OLAHANNYA BERBASIS PROTEIN DAN DNA BARCODING

Detection Tuna and Processed Products Based Protein and DNA Barcoding

Nuring Wulansari^{1*}, Mala Nurilmala², Nurjanah²

¹Direktorat Pengawasan Sumberdaya Perikanan Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Gedung Mina Bahari Gambir Jakarta

²Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor Jalan Lingkar Akademik Kampus IPB Bogor 16680
Telepon (0251) 8622915 Faks.(0251) 8622916

*Korespodensi: nuringwulan@gmail.com

Diterima 15 Juni 2015 / Disetujui 20 Agustus 2015

Abstrak

Ikan tuna merupakan komoditi perikanan terbesar kedua di Indonesia setelah udang. Permintaan ikan tuna yang tinggi dan semakin terbatasnya stok ikan tuna terutama bluefin tuna mengakibatkan maraknya pemalsuan. Autentikasi diperlukan untuk meyakinkan konsumen tentang keakuratan pelabelan serta menjaga kualitas dan keamanan pangan. Pada penelitian ini, autentikasi dilakukan berdasarkan protein dan DNA *barcoding*. DNA *barcoding* menggunakan *cytochrome b* (cyt b) dari DNA mitokondria sebagai gen target. Primer gen cyt b dirancang berdasarkan tuna spesies. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keaslian ikan tuna dan produk olahannya melalui protein metode SDS-PAGE dan teknik DNA *barcoding*. Tahapan penelitian ini yaitu elektroforesis protein melalui SDS-PAGE, ekstraksi DNA, PCR amplifikasi, elektroforesis, dan sekuensing. Sampel yang diuji berupa ikan segar (Tu1, Tu2, Tu3, Tu4, dan Tu5), dan olahan tuna (kaleng dan steak) berhasil diekstraksi. Hasil SDS-PAGE membuktikan kerusakan protein pada olahan ikan tuna, sehingga metode ini tidak tepat jika digunakan untuk mengidentifikasi keaslian ikan tuna. Hasil elektroforesis PCR menunjukkan bahwa sampel ikan tuna, tuna kaleng, dan steak tuna berhasil teramplifikasi pada rentang antara 500–750 bp, hal ini sesuai dengan DNA target yaitu sebesar 620 bp. Hasil sekuen diperoleh bahwa Tu2, Tu3, Tu4 dan Tu5 teridentifikasi sesuai hasil morfometrik yaitu *T. albacares*, sedangkan Tu1 teridentifikasi *T. obesus* dengan tingkat homologi sebesar 99%. Olahan steak tuna dan tuna kaleng teridentifikasi sebagai *T. albacares*, hal ini sesuai dengan yang tertera pada label yaitu tuna.

Kata kunci: autentikasi, cyt b, DNA *barcoding*, desain primer, SDS-PAGE.

Abstract

Tuna is the second largest fishery commodity in Indonesia after the shrimp. Since the high demand and the limited stock of tuna resulted in fraudulent chance. Authentication is required to measure consumers regarding the accuracy of its labeling and food safety. In this study, the authentication was based on protein and DNA barcoding using cytochrome-b gene (cyt-b) of the mitochondrial DNA as the target of gene. Primer of cyt b gene was designed based on the tuna species. This study aimed to identify the authenticity of tuna fresh and its processed products through protein using SDS-PAGE

and DNA barcoding techniques. The phases of this research were protein electrophoresis by SDS-PAGE, DNA extraction, PCR amplification, electrophoresis and sequencing. Samples of fresh fish (Tu1, Tu2, Tu3, Tu4, and Tu5) and processed tuna (canned and steak) were successfully extracted. Result showed that SDS-PAGE proved the damage of proteins in the processed tuna, so this method was not appropriate if it is used to identify the authenticity of tuna. PCR electrophoresis results showed that the samples of tuna, tuna steak, sushi, meat ball, abon, and caned tuna were successfully amplified in the range of 500-750 bp except Ka3, which was in line with the target of DNA (620 bp). Resulted sequences of Tu2, Tu3, Tu4 and Tu5 were identified according the results of morphometric namely *T. albacares*, while Tu1 was identified as *T. obesus* with homology level of 99%. Processed tunas (steak and canned tuna) were identified as *T. albacares*, as stated on the labels.

Keywords: Authentication, cytb, DNA barcoding, design primer, SDS-PAGE

PENDAHULUAN

Ikan tuna di Indonesia merupakan komoditi perikanan terbesar kedua setelah udang. Tingginya permintaan akan ikan tuna dan semakin terbatasnya stok ikan tuna, mengakibatkan adanya pemalsuan, dimana spesies yang mirip diganti dengan spesies yang memiliki harga yang rendah, seperti pada label ikan tuna dari genus *Thunnus* yang bernilai tinggi diganti dengan ikan dari genus *Euthynnus* yang bernilai rendah (Rasmussen dan Morrissey 2011). Kesalahan dalam identifikasi juga mengakibatkan kesalahan pelabelan seperti pada spesies tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) dan tuna mata besar (*Thunnus obesus*) mempunyai kemiripan morfologi pada ukuran kurang dari 40 cm (Gerasmio 2012). Pemalsuan spesies yang digunakan sebagai bahan baku produk merupakan suatu kegiatan penipuan dan merugikan konsumen serta menurunkan tingkat kenyamanan konsumen.

Deteksi keaslian ikan diperlukan untuk meyakinkan konsumen tentang keakuratan pelabelan serta menjaga kualitas dan keamanan pangan (Klossa-Kilia *et al.* 2002). Deteksi keaslian ikan dapat dilakukan secara fisik (morfologi), protein seperti teknik

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), *Isoelectric Focusing* (IEF), *Isozyme Staining and Immunoreactivity* (ELISA) (Martinez *et al.* 2003), dan molekuler (DNA) (Lockley dan Bardsley 2000).

DNA *barcoding* merupakan suatu teknik molekuler untuk mengidentifikasi spesies menggunakan perbedaan urutan nukleotida dari daerah gen yang terstandar (Stoeckle dan Hebert 2008). DNA *barcoding* didasarkan pada fragmen mtDNA gen cytochrome oxidase I (COI) atau *cytochrome b* (cyt b) yang berfungsi sebagai 'barcode' untuk mengidentifikasi spesies (Roe dan Sperling 2007; Ward *et al.* 2005).

Penelitian ini menggunakan metode berbasis protein (SDS-PAGE) dan molekuler (DNA *barcoding*). Gen cyt b dari DNA mitokondria digunakan sebagai gen target. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keaslian ikan tuna dan produk olahannya melalui metode berbasis protein dan DNA.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu ikan tuna segar, tuna kaleng, steak tuna, *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen), *DNeasy Mericon*

Food Kit (Qiagen), proteinase K, etanol 96%, kloroform, *Kapa Taq Extra HotStart ReadyMix PCR Kit* (Kapa Biosystems), *primer forward* dan *reverse*, agarose (Vivantis), Etium Bromida, gel *loading buffer* (Invitrogen), *DNA ladder* (Invitrogen).

Alat yang digunakan antara lain pipet tips (Axygen Scientific, California-USA), mikro pipet (Thermo Scientific), tabung mikro, sentrifuse (PerfectSpin 24 plus, *Peqlab Biotechnologie GmbH*, Erlangen-Jerman), mesin PCR (Termocycler Biometra T1, Biometra GmbH, Gottingen-Jerman), inkubator (Digital Block Heater HX-1, *Peqlab Biotechnologie GmbH*, Erlangen-Jerman), elektroforesis (Merk Mupid-Exu, Tipe *Electrophoresis System*), timbangan digital (Merk Adam Tipe PW254, England), *spindown* (PerfectSpin mini, *Peqlab Biotechnologie GmbH*, Erlangen-Jerman), *vortex* (*peqTwist vortex mixer*, *Peqlab Biotechnologie GmbH*, Erlangen-Jerman) *microwave* (Panasonic NN-SM320M), *Freezer*, dan alat sinar UV *Extrazene Ultraviolet Viewer* (UV-1).

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel

Sampel terdiri dari ikan tuna segar dan produk olahan ikan tuna. Ikan tuna segar diperoleh dari Muara Baru, dan produk olahan tuna berupa tuna kaleng dan steak tuna diperoleh dari supermarket di daerah Bogor. Ikan tuna segar yang diperoleh,

diambil bagian dagingnya dan dimasukkan kedalam tabung mikro 1,5 mL dan diberi larutan etanol 96% pa sampai sampel terendam, kemudian disimpan ke dalam *freezer* suhu -70°C. Produk steak tuna disimpan pada suhu -70°C, sedangkan tuna kaleng disimpan pada suhu ruang. Koleksi sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

Analisis Berbasis Protein

SDS-PAGE merupakan teknik untuk memisahkan protein berdasarkan arus listrik, yang merupakan fungsi dari panjang rantai polipeptida atau berat molekulnya, hal ini dilakukan dengan cara menambahkan deterjen SDS dan pemanasan untuk merusak struktur tiga dimensi pada protein dengan terpecahnya ikatan disulfide yang selanjutnya direduksi menjadi gugus sulfidhidril.

Sampel diekstrak proteinnya dengan cara 1 gr sampel ditambahkan 3 mL buffer phoshat dikocok-kocok kemudian di sentrifuse dengan kecepatan 5.000 rpm, suhu 4°C selama 30 menit dan diambil supernatannya. Hasil ekstraksi kemudian didenaturasi pada suhu 65°C selama 3 menit.

Sampel yang telah didenaturasi dan marker masing-masing dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 5 µL. Chamber elektroforesis dihubungkan dengan arus listrik dan *running sampel* pada arus 20 A dan voltase 220 V selama 75 menit. *Running buffer* dipisahkan dan gel diambil

Tabel 1 Koleksi sampel

Kode sampel	Label	Lokasi	Tanggal Sampling
Tu1	Ikan segar	Muara Baru	20 Nopember 2014
Tu2	Ikan segar	Muara Baru	20 Nopember 2014
Tu3	Ikan segar	Muara Baru	24 Februari 2015
Tu4	Ikan segar	Muara Baru	24 Februari 2015
Tu5	Ikan segar	Muara Baru	24 Februari 2015
Ka	Tuna Kaleng (<i>Chunks Tuna</i>)	Bogor	27 Nopember 2014
St	Tuna Fillet <i>Thunnus albacares</i>	Bogor	27 Nopember 2014

dari plate pembentuk gel. Gel yang telah diambil dari plate direndam dalam 25 mL larutan *staining* selama kurang lebih 2 jam, kemudian dibilas dengan air dan direndam dalam 50 mL larutan *destaining* over night atau sampai pita protein terlihat jelas, dalam tahap ini larutan *staining* digunakan untuk mewarnai protein dan larutan *destaining* untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk. Gel (*staining gel*) diwarnai dengan larutan *staining* yang mengandung *Coomassive Brilliant Blue R-250*, 0,01% yang dilarutkan dalam metanol asam asetat dan air dengan perbandingan tertentu. Gel direndam dalam pewarna, kemudian dibilas dengan asam asetat jenuh. Protein menjadi berwarna biru karena mengikat *Coomassie Brilliant Blue*. Mobilitas relatif protein digunakan untuk menentukan berat molekulnya.

Analisis Berbasis Molekuler (DNA Barcoding)

Analisis molekuler meliputi ekstraksi DNA, desain primer, PCR amplifikasi, sekuensing dan identifikasi spesies.

Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA menggunakan standar protokol *The Dneasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen) untuk ikan segar dan produk olahan menggunakan standar protokol *Dneasy Mericon Food Kit* (Qiagen). Proses ekstraksi DNA terdiri dari tiga tahap yaitu, perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan lain, dan permurnian DNA.

Desain Primer

Data sekuens *thunnus* gen parsial *cyt b* mitokondria diambil melalui *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) situs web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Pencarian homologi gen *cyt b* *thunnus* menggunakan program *Basic Local Alignment Search*

Tool (BLAST) dalam situs NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Hasil primer yang diperoleh kemudian diuji pada web <http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet#>.

Amplifikasi PCR

Sampel yang telah diekstraksi dilakukan amplifikasi dengan PCR. Tahapan PCR meliputi: pradenaturasi (94°C selama 5 menit), denaturasi (94°C selama 5 menit), annealing (T = 50-60°C selama 1 menit), *extension* (T = 72°C selama 1 menit), *post extension* (T = 72°C selama 7 menit) dan *preservation* (T = 8°C selama 5 menit).

Bahan yang digunakan untuk PCR terdiri dari campuran 21,5 µL ddH₂O, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 1,25 µL, DNA template sebanyak 1 µL, dan *Kapa Taq Extra HotStart Ready Mix PCR Kit* (Kapa Biosystems) sebanyak 25 µL sehingga diperoleh bahan PCR mix sebanyak 50 µL. PCR mix terdiri dari dNTP yang berfungsi agar pada proses PCR dapat membuat untai baru serta *taq* polimerase, dd H₂O berfungsi untuk melarutkan komponen PCR agar bercampur, dan primer baik *forward* maupun *reverse* berfungsi untuk proses penggandaan pada PCR.

PCR mix kemudian dimasukkan ke *thermocycler* yang sebelumnya diatur suhu dan siklus yang akan digunakan. Produk PCR kemudian dapat divisualisasikan pada 1% gel agarose yang telah diberi pewarna berupa larutan *ethidium bromide* untuk dielektroforesis, hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan di bawah gelombang pendek sinar UV.

Sekuensing

DNA yang telah teramplifikasi kemudian disiapkan untuk proses penentuan urutan nukleotida menggunakan DNA *sequencer*. Data hasil sekuensing kemudian diolah

menggunakan program MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) (Tamura *et al.* 2013). Hasil sekuensing yang telah dianalisis ditentukan indentifikasi spesiesnya menggunakan proses BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yaitu membandingkan dengan database sekuen DNA pada genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pohon Filogenetik

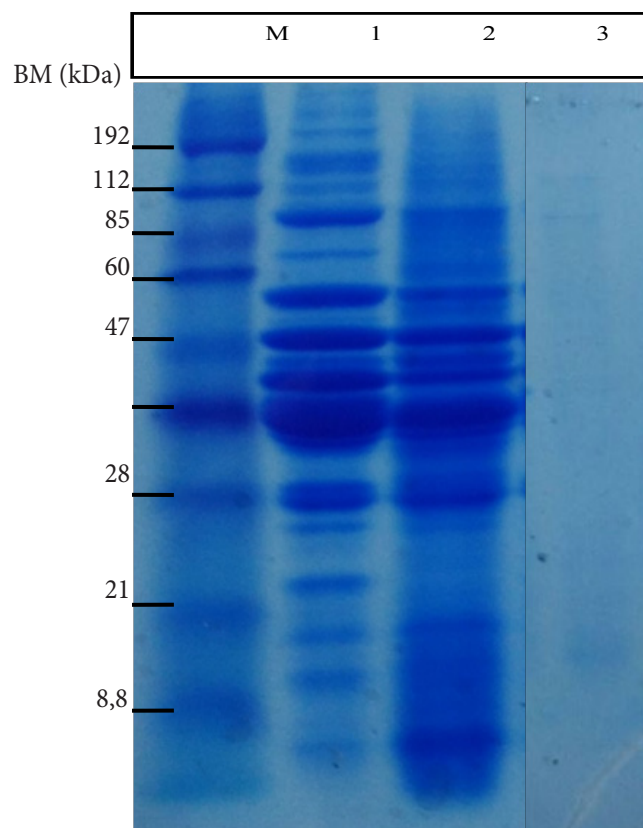
Hasil sekuensing kemudian di *alignment* (Clustal W) untuk menentukan apakah hasil sekuen homolog dengan lainnya. Pohon filogenetik dibuat menggunakan software MEGA 6, dengan metode *Neighbour-Joining Tree* model Kimura 2-Parameter (K2P) dan bootstrap 1.000 replikasi. Pohon filogenetik digunakan untuk melihat kekerabatan dan jarak genetik suatu spesies. Jarak genetik merupakan ukuran perbedaan genetik

antar populasi karena mutasi, seleksi, persilangan acak dan penghanyutan gen yang akan menyebabkan terjadinya evolusi. Data sekuen untuk spesies outgroup diperoleh dari Genbank NCBI.

**Hasil dan Pembahasan
SDS-PAGE**

Pola protein yang terbentuk pada sampel ikan tuna segar, steak tuna, dan tuna kaleng dapat dilihat pada Gambar 1. Pada gambar terlihat bahwa pola protein pada ikan segar dan steak terlihat lebih tebal dan jelas dibandingkan pola protein pada tuna kaleng, hal ini dikarenakan pada tuna yang dikalengkan telah terjadi proses pemanasan sehingga protein menjadi terdenaturasi dan mengakibatkan pola proteinnya tidak terlihat.

Identifikasi spesies berbasis protein tidak dapat digunakan untuk produk-produk yang telah mengalami pemanasan,



Gambar 1 Fraksi-fraksi protein ikan tuna dan olahan tuna
Keterangan: M=Marker; 1=Ikan tuna segar; 2=Steak tuna; 3=Tuna kaleng.

Tabel 2 Desain primer thunnus untuk gen cyt b

Primer	Sekuen	Panjang (bp)	Tm (C)	GC (%)	Primer Dimer	Struktur Sekunder
Tuna1-F	5'CTYCTATCCGCAGTC CCATATGTYGG3'	26	62,9	50,0	Tidak	tidak
Tuna1-R	5'GGAATAGGGAGAAGT AGAGGACG3'	23	63,0	52,2	Tidak	tidak

sehingga perlu dilakukan identifikasi lanjut berbasis DNA. Rasmussen dan Morrissey (2008) menyatakan bahwa metode berbasis protein umumnya dapat digunakan untuk ikan segar, namun kurang efektif untuk produk yang mengalami pemanasan karena protein telah terdegradasi.

Desain Primer

Desain primer mengambil sekuen *Thunnus* gen cyt b parsial mitokondria melalui NCBI. Sekuen *Thunnus* terdiri dari *Thunnus obesus*, *T. orientalis*, *T. albacares*, *T. alalunga*, *T. thynnus*, *T. maccoyii*, *T. Tonggol*, kemudian diolah dengan MEGA 6 dan diperoleh daerah *conserve* cyt b pada rentang daerah 445 bp untuk *foward* dan 1.064 pb untuk *reverse* sehingga diperoleh panjang fragmen sebesar 620 pb. Parameter yang digunakan dalam mendesain primer yaitu jumlah basa (18-22 basa), suhu *annealing* antara 50-70°C, presentase G atau C antara 40-65%, basa pada ujung arah hilir yaitu G atau C, meminimalkan terjadinya *loops* dan *self*

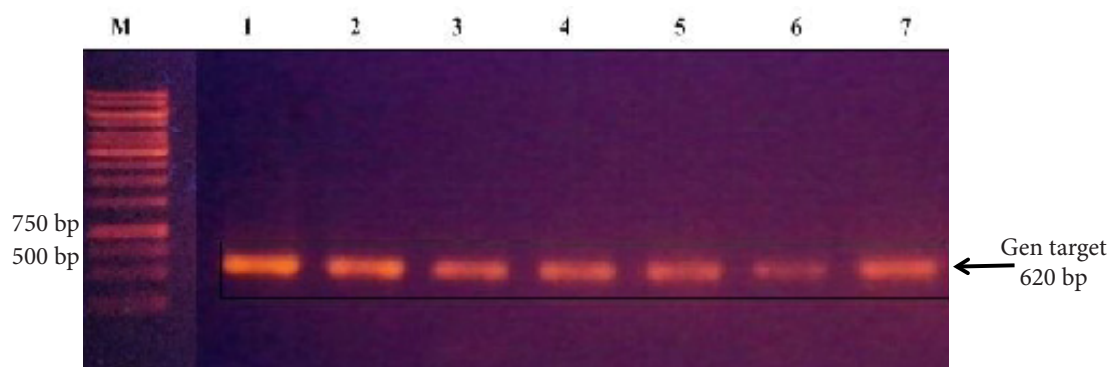
anealing (Sambrook *et al.* 2001).

Primer yang telah diperoleh diuji <http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet#>. Primer yang telah didesain dapat dilihat pada Tabel 2. Primer cyt b ikan tuna diberi label Tuna1-F dan Tuna1-R.

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA

Ikan tuna segar dan olahannya telah berhasil diekstraksi. Hasil ekstrak DNA ikan tuna dan olahan tuna kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR dengan primer Tuna1-F dan Tuna1-R cyt b, tahapan PCR terdiri dari predenaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *anealling* 58°C selama 1 menit, ekstensi 72°C selama 1 menit dengan 40 siklus, post ekstensi 72°C selama 7 menit dan penyimpanan 8°C selama 5 menit.

Elektroforegram PCR ikan tuna segar dan olahan tuna menunjukkan bahwa sampel teramplifikasi pada fragmen antara 500–750 bp, hal ini sesuai dengan DNA target yaitu sebesar 620 bp.



Gambar 2 Hasil Elektroforegram PCR

Keterangan: M=Marker; 1=Tuna1; 2=Tuna2; 3=Tuna3; 4=Tuna 4; 5=Tuna5; 6=Kaleng Tuna; 7=Fillet Tuna

Sekuensing

DNA yang berhasil teramplifikasi kemudian dilakukan penentuan urutan nukleotidanya dengan cara mengirimkan hasil PCR produk. Hasil urutan nukleotida yang diterima kemudian diolah dengan software MEGA 6. Hasil identifikasi spesies (Tabel 3) dilakukan dengan analisis BLAST yaitu membandingkan dengan database yang ada pada Genbank.

Tabel 3 terlihat bahwa ikan tuna segar Tu1 terjadi perbedaan dalam identifikasi, dimana identifikasi berdasarkan morfologi Tu1 teridentifikasi sebagai *T. albacares*, sedangkan secara molekuler teridentifikasi sebagai *T. obesus* dengan tingkat homologi sebesar 99%.

Identifikasi secara morfologi sering terjadi kesalahan, dari 48 sampel dengan *fork lenght* 13-31 cm, hasil analisis morfo-meristik sebanyak 12 sampel (25%) teridentifikasi *big eye*, sedangkan 36 sampel (75%) merupakan *yellow fin*, namun dengan analisis genetik hati menunjukkan bahwa hanya 5 sampel (10%) merupakan *big eye*, sedangkan 43 sampel (90%) merupakan *yellow fin* (Gerasmio 2012), sehingga metode berbasis DNA merupakan metode yang akurat untuk mengidentifikasi spesies, hal ini diperkuat oleh Nicole *et al.* (2012) bahwa metode berbasis DNA *barcoding*

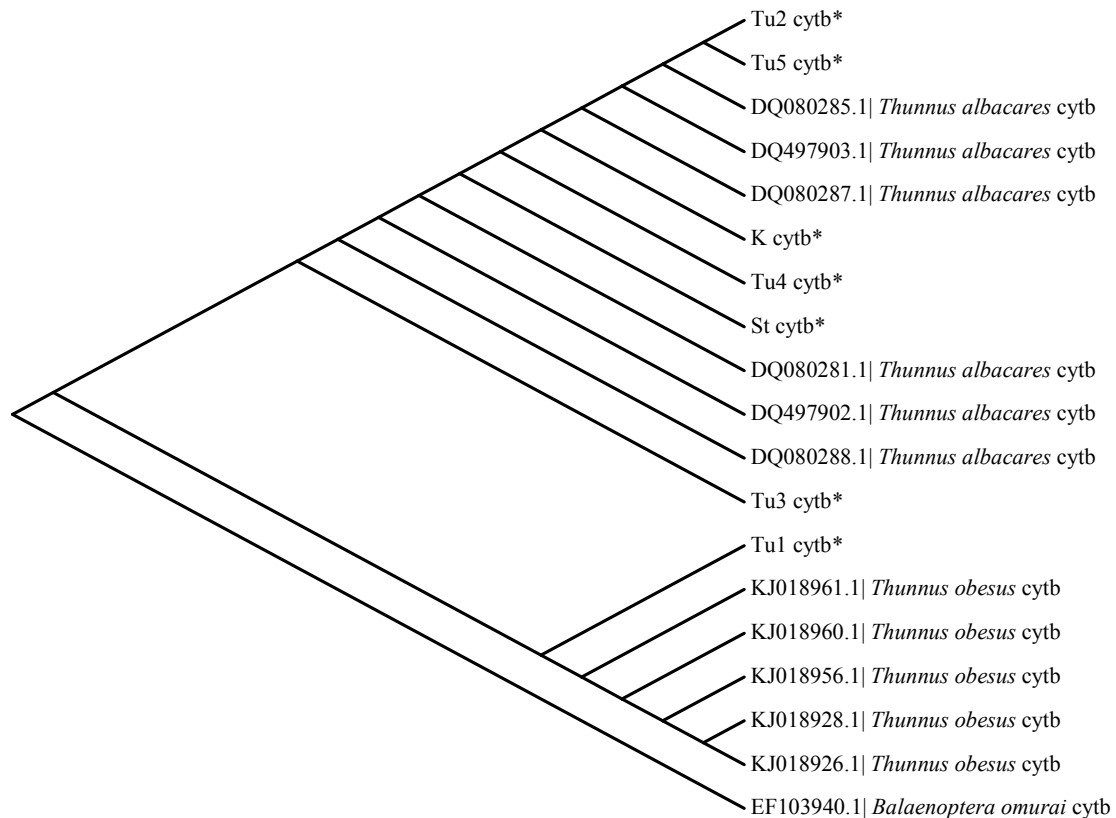
merupakan teknik yang cepat dan akurat yang digunakan untuk mengidentifikasi genetik krustasea, moluska dan ikan, juga untuk konservasi terutama untuk memantau spesies yang dilindungi dan terancam punah, perdagangan ilegal, selain itu DNA *barcoding* dapat digunakan autentikasi untuk mendeteksi kesalahan pelabelan produk olahan. Galimberti *et al.* (2013) menyatakan bahwa DNA *barcoding* merupakan metode berbasis molekuler yang dapat mengidentifikasi spesies, bahan mentah dan makanan olahan, serta keamanan pangan.

Pohon Filogenetik

Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbour Joining Tree* dengan K2P model, dan nilai bootstrap 1.000 replikasi. Spesies *Balaenoptera omurai* dijadikan sebagai outgroup karena mempunyai perbedaan nukleotida yang signifikan dengan sampel. Pada gambar terlihat bahwa sampel Tu2, Tu3, Tu4, Tu5, K dan St membentuk clade dengan *T. albacares*, sedangkan Tu1 membentuk *clade* dengan *T. obesus*. Penelitian Maralit *et al.* (2013) dengan *Neighbour Joining Tree* dan K2P model menunjukkan bahwa semua sampel *bluefin tuna* membentuk *clade* dengan *longtail tuna (Thunnus tonggol)* yang mengindikasikan telah terjadi *mislabelling*.

Tabel 3 Identifikasi spesies dengan analisis BLAST

Sampel	Kode	Spesies pada label	Hasil analisis	Homologi	Kode Akses
Tuna 1	Tu1	<i>T. albacares</i>	<i>T. obesus</i>	99%	KJ018961.1
Tuna 2	Tu2	<i>T. albacares</i>	<i>T. albacares</i>	99%	DQ080287.1
Tuna 3	Tu3	<i>T. albacares</i>	<i>T. albacares</i>	99%	DQ080285.1
Tuna 4	Tu4	<i>T. albacares</i>	<i>T. albacares</i>	99%	DQ080286.1
Tuna 5	Tu5	<i>T. albacares</i>	<i>T. albacares</i>	99%	DQ080281.1
Kaleng	K	Tuna	<i>T. albacares</i>	99%	DQ080281.1
Steak	St	<i>T. albacares</i>	<i>T. albacares</i>	99%	DQ080281.1



Gambar 4 Pohon filogenik sampel ikan tuna dan olahannya

Keterangan: *sampel yang digunakan

KESIMPULAN

Pengujian keaslian berbasis protein (SDS-PAGE) tidak dapat digunakan terutama untuk produk-produk perikanan yang telah mengalami proses pemanasan. Hasil elektroforesis PCR menunjukkan bahwa sampel berhasil teramplifikasi sesuai dengan gen target 620 bp. Hasil analisis dengan BLAST menunjukkan bahwa sampel ikan segar teridentifikasi sebagai *T. albacares* dan *T. obesus* dengan tingkat homologi 99%, sedangkan produk olahan kaleng dan *fillet* teridentifikasi *T. albacares* dengan tingkat homologi 99%.

DAFTAR PUSTAKA

Galimberti A, De Mattia F, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M, Martellos S, Labra M. 2013. DNA *Barcoding* as a new tool for food traceability. *Food Research International* 50:55-63.

Gerasmio IRP, Babaran RP, Santos MD.

2012. Discrimination of juvenile yellowfin (*Thunnus albacares*) and bigeye (*T. obesus*) tunas using mitochondrial DNA control region and liver morphology. *PLoS ONE* 7(4).

Klossa-Kilia E, Papatotiroopoulos V, Kiliass G, Alahiotis S. 2002. Authentication of Messolongi (Greece) fish roe using PCR RFLP analysis of 16s rRNA mtDNA segment. *Food Control* 13:169-172.

Lockley AK, Bardsley RG. 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology* 11(2):67-77.

Maralit BA, Aguila RD, Ventolero MFH, Perez SKL, Willette DA, Santos MD. 2013. Detection of mislabeled using DNA barcodes and its implications to food traceability and safety. *Food Control* 33:119-125.

Martinez I, Aursand M, Erikson U,

- Singstad TE, Veliyulin E, van der Zwaag C. 2003. Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology* 14(12):489-498.
- Nicole S, Negrisol E, Eccher G, Mantovani R, Patarnello T, Erickson DL, Kress WJ, Barcaccia G. 2012. DNA *Barcoding* as a reliable method for authentication of commercial seafood products. *Food Technol. Biotechnol* 50(4):387-398.
- Rasmussen RS, Morrissey MT. 2008. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7:280-295.
- Rasmussen RS, Morrissey MT. 2011. DNA-based detection of commercial fish species. Di dalam buku *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications*; Cesaretti Alasalvar, Fereidoon Shahidi, Kazuo Miyashita dan Udaya Wanasundara 2011 Blackwell Publishing Ltd. 576p.
- Roe AD, Sperling FAH. 2007. Patterns of evolution mitochondrial cytochrome c oxidase I and II and implications for DNA *barcoding*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44:325-345.
- Sambrook JR. 2001. *Molecular cloning :A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Herbert PDN. 2005. DNA *barcoding* Australia;s fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society Part B* 360:1847-1857.