

DNA *MINI-BARCODES* SEBAGAI PENANDA MOLEKULER UNTUK KETERTELUSSURAN LABEL PANGAN BERBAGAI PRODUK IKAN LAYUR

Asadatun Abdullah*, Mala Nurilmala, Kinanti Permata Sitaresmi

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

*Korespondensi: asabdullah@apps.ipb.ac.id

Diterima: 16 Juli 2018/ Disetujui: 26 Maret 2019

Cara sitasi: 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.

Abstrak

Ikan layur merupakan komoditas hasil perikanan penting dan memiliki nilai ekonomis tinggi sebagai komoditas ekspor. Autentikasi berbasis DNA *mini-barcodes* dapat digunakan untuk mengatasi *mislabeling* serta sebagai bagian dari pemantapan program *traceability* perikanan Indonesia. Tujuan penelitian ini menghasilkan primer-primer spesifik DNA *mini-barcodes* dan autentikasi berbagai produk olahan ikan layur asap (LA), panggang (LB), kaleng (LC), goreng (LD), dan bakar (LE). Analisis berbasis DNA mitokondria gen COI *full length* dan *mini-barcodes*. Primer *mini-barcodes* spesifik ikan layur (*Trichiurus lepturus*) dengan panjang gen target 212 bp telah berhasil mengamplifikasi DNA produk olahan ikan layur. Analisis BLAST menunjukkan sampel teridentifikasi sebagai *Trichiurus* sp. dan *T. lepturus* dengan tingkat homologi 91% sampai 100%. Analisis filogenetik menunjukkan sampel ikan layur (LC dan LD) membentuk kelompok dengan *T. lepturus*.

Kata kunci : autentikasi, desain primer, DNA *mini-barcodes*, ikan layur, *mislabeling*

DNA Mini-Barcodes as A Molecular Marker for Various Hairtail Fish Products Traceability

Abstract

Hairtail fishery is an important fishery commodity with high economic value as export commodity. Authentication based on DNA *mini-barcodes* can be applied to overcome seafood fraud and to support Indonesian *traceability* system. This study was aimed to design species-specific primers of DNA *mini-barcodes* and authentication of various processed hairtail fish products such as smoked, baked, fried, canned, and boiled. Analytical method applied PCR-based of cytochrome c oxidase 1 (COI) *full length* and *mini-barcodes*. Mini-barcode primer specific for hairtail (*Trichiurus lepturus*) successfully amplified DNA of processed hairtail fish. The BLAST analysis showed the samples were identified as *Trichiurus* sp. and *T. lepturus* with homology level of 91% to 100%. Phylogenetic analysis showed the processed sample (LC dan LD) were in the same group with *T. lepturus*.

Keywords: authentication, primer design, DNA *Mini-barcodes*, hairtail fish, *mislabelling*

PENDAHULUAN

Ikan layur merupakan komoditas hasil perikanan penting yang memiliki nilai ekonomis tinggi yaitu sebagai komoditi ekspor. Negara tujuan utama ekspor ikan layur di Indonesia adalah Vietnam, China, Korea, Malaysia dan Hongkong (UN Comtrade 2015). Produk olahan ikan layur yang digemari beberapa negara di antaranya adalah filet ikan layur dengan

label “Tachiu” di Jepang (Rasmussen dan Morrissey 2009), sup ikan layur di China, dan Galchi di Korea (Kwun *et al.* 2010).

Produk olahan ikan memiliki nilai tambah dan daya tarik yang lebih bagi konsumen, hal ini memunculkan kekhawatiran terkait kemungkinan adanya kecurangan yang dilakukan produsen, yaitu pemalsuan produk (Jacquet dan Pauly 2008). *Mislabeling* telah terdeteksi pada

50% produk ikan di Jerman (Kappel dan Schroder 2016), 24% seafood di Brazil Selatan (Carvalho *et al.* 2015), 22% seafood di India (Nagalakshmi *et al.* 2016) dan 82% fillet ikan komersial di Italia (Di Pinto *et al.* 2015). Identifikasi dan autentikasi produk dapat dilakukan untuk mengatasi permasalahan tersebut namun proses pengolahan dapat menyulitkan identifikasi berdasarkan karakteristik morfologi (Zhao *et al.* 2013).

Autentikasi produk makanan dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode, yaitu berbasis analisis protein atau DNA. Metode pendekatan DNA atau yang dikenal dengan DNA *barcoding* memberikan hasil identifikasi spesies yang akurat, stabil dan spesifik. Analisis DNA dengan mitokondria paling disukai karena genom bersifat haploid, memiliki jumlah salinan yang tinggi (*high copy numbers*) dan tingkat mutasinya lebih besar dibandingkan inti sel (Cline 2012).

Fragmen 650 bp dari ujung gen mitokondria *cytochrome oxidase* subunit I (COI) telah dianjurkan untuk pengembangan metode identifikasi spesies hewan yang memiliki kekerabatan yang dekat (Hebert *et al.* 2003; Nurilmala *et al.* 2016; Abdullah dan Rehbein 2016), namun pada proses autentikasi produk ikan olahan dan awetan DNA barcode *full length* sering tidak dapat memberikan hasil yang memuaskan (Armani *et al.* 2015; Shokralla *et al.* 2015; Sultana *et al.* 2018). Hal tersebut disebabkan oleh terjadinya degradasi DNA dan kandungan beberapa zat aditif, pengawet, dan perasa yang dapat memengaruhi kuantitas dan kualitas DNA. Identifikasi dengan DNA *full length* memiliki tingkat keberhasilan 20,5% (9 produk), sedangkan dengan DNA *mini-barcodes* yaitu 93,2% (41 produk) dari 44 produk olahan ikan (Shokralla *et al.* 2015). Produk olahan mengalami perubahan morfologi dan mengandung zat-zat tambahan yang dapat memengaruhi DNA yang dihasilkan. Oleh karena itu, pada penelitian ini autentikasi ikan layur dan olahannya dilakukan dengan DNA *mini-barcoding* dengan fragmen DNA yang lebih pendek yaitu 100-200 bp dalam *full length barcode* sebagai alternatif autentikasi produk olahan yang telah mengalami perubahan kualitas dan kuantitas DNA.

Penelitian ini menggunakan metode secara molekuler (DNA *barcoding*) dengan gen COI sebagai target. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan primer-primer spesifik DNA *mini-barcodes* dan autentikasi berbagai produk olahan ikan layur secara akurat dan cepat.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan layur (*Trichiurus* sp.). Bahan-bahan lainnya adalah kit isolasi DNA (QIAGEN DNeasy Food Mericon, dan TIANamp Genomic DNA Kit), PCR kit *commercial* KAPA Taq Extra HotStart ReadyMix Kit (Kapa biosystems), dH₂O, primer spesifik ikan layur, primer FishF1R1, marker (VC 100 pb plus DNA ladder, VIVANTIS), *Sybrgreen*, agarosa (Lonza), buffer TBE (10X TBE Buffer, Lonza).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *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), mini mikrosentrifugasi (Corning, New York, 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), *power supply* (Peqlab, Erlangen Germany).

Metode Penelitian

Preparasi sampel

Sampel terdiri dari ikan layur segar dan olahan. Ikan layur segar diperoleh dari Pelabuhanratu, Sukabumi-Jawa Barat, sedangkan produk olahan ikan layur diperoleh dengan proses pengolahan yang dilakukan di Laboratorium Preservasi dan Pengolahan Hasil Perairan, Institut Pertanian Bogor. Proses pengolahan terdiri dari pengasapan, pemanggangan, pembakaran, pengalengan, dan penggorengan. Ikan layur segar dan olahannya yang diperoleh diambil bagian dagingnya, dimasukkan ke dalam tabung mikro

1,5 mL dan disimpan di dalam *freezer* pada suhu -20°C . Kode sampel L1-L5 merupakan sampel ikan layur segar dan LA-LE produk olahan ikan layur yaitu pengasapan (LA), pemanggangan (LB), pengalengan (LC), penggorengan (LD), dan pembakaran (LE).

Prosedur Analisis Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA menggunakan standar protokol TIANamp *Genomic DNA Kit* (Tiangen) untuk sampel ikan layur segar dan *The Dneasy Mericon Food Kit* (Qiagen) untuk produk olahan ikan layur. Uji kualitas DNA hasil ekstraksi dilakukan menggunakan elektroforesis (kuat arus 90 A dan tegangan 60 volt selama 23 menit) pada gel agarosa 1,25%. Visualisasi DNA total dilihat pada UV-Transilluminator (Westermeier 2004).

Desain primer

Desain primer dilakukan dengan cara menyebarkan sampel yang diperoleh dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Sekuen didesain menggunakan program MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) dan dipilih urutan nukleotida yang lestari (*conserved*) pada seluruh sampel. Primer yang telah terpilih selanjutnya dievaluasi menggunakan *software online* OligoEvaluator™ dan *Primer BLAST*.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi ruas gen COI dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer FishF1R1 dan primer TL4 (spesifik ikan layur) serta PCR mix. Tahapan PCR meliputi: pradenaturasi ($T=94^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit, denaturasi ($T=94^{\circ}\text{C}$ selama 1 menit), *annealing* ($T=55^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik untuk primer FISHF1R1 dan $T=59^{\circ}\text{C}$ selama 35 detik untuk primer spesifik ikan layur), *extension* ($T=72^{\circ}\text{C}$ selama 1 menit 15 detik), *post extension* ($T=72^{\circ}\text{C}$ selama 7 menit) dan *preservation* ($T=8^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit) (Ward *et al.* 2005; Wulansari *et al.* 2015).

Bahan yang digunakan untuk PCR terdiri dari campuran 13 μL ddH₂O, primer *forward* dan *reverse* (FishF1R1 dan spesifik ikan layur) masing-masing sebanyak 3 μL , DNA template

6 μL , dan 25 μL *Kapa Taq Extra HotStat Ready Mix PCR Kit* (Kapa Biosystems) sehingga diperoleh bahan PCR mix sebanyak 50 mL. Suhu, waktu, dan siklus diatur sesuai prosedur sebelum PCR *mix* dimasukkan ke dalam *thermocycler*. Produk PCR atau amplicon divisualisasikan menggunakan sinar UV.

Sekuensing

Produk PCR yang memiliki kualitas baik dilanjutkan ke tahap sekuensing yaitu penerjemahan untai DNA menjadi basa nukleotida (ACGT). Sekuensing dilakukan menggunakan metode Sanger *et al.* (1977) dengan mengirimkan produk PCR tersebut ke perusahaan jasa pelayanan sekuensing. Perunutan DNA dilakukan dari dua arah, yaitu *forward* dan *reverse*.

Analisis bioinformatika

Hasil sekuensing disejajarkan (*alignment*) menggunakan program MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*). *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) digunakan untuk mencari kemiripan spesies berdasarkan homologi urutan basa nukleotida yang dihasilkan. Urutan basa nukleotida sampel dibandingkan dengan database yang tersedia pada GenBank. Hubungan kekerabatan antar isolat dikonstruksi dengan menggunakan perangkat lunak *molecular evolutionary genetic analysis versi 6.06* (MEGA6) dengan *bootstrap* 1.000 kali ulangan. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbour Joining Tree* (NJT) dengan nilai *bootstrap* 1.000 dan model Kimura dua parameter.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil Primer COI Spesifik Ikan Layur

Desain primer merupakan tahap kritis dalam seluruh jenis metode PCR untuk mempertahankan amplifikasi yang spesifik dan efisien pada sekuen target (Kalendar *et al.* 2009). Panjang gen target mini barcode COI *T. lepturus* yang ditetapkan sesuai hasil rancangan adalah 212 bp. Hasil evaluasi primer gen COI ikan layur (*T. lepturus*) menggunakan *software* OligoEvaluator™ dapat dilihat pada *Table 1*.

Panjang primer *forward* gen COI *T. lepturus* yaitu 20 bp dan primer *reverse*

Table 1 Primer evaluation of COI genes with OligoEvaluator™ (*T. lepturus*)

Primer	Forward	Reverse
Sequence	TGAAACCTGCGGCCATTACT	TGGGTGGCCGAAGAATCAAA
Length (bp)	20	20
Tm (°C)	50.0	50.0
Secondary structures	-	-
Primer dimer	-	-

20 bp. Primer untuk proses amplifikasi PCR diharapkan memiliki panjang optimum 18-22 bp dan kisaran suhu *annealing* 52-58°C. Ukuran tersebut dapat mengikat DNA *template* dengan mudah pada suhu *annealing* (Borah 2011). Suhu leleh primer *forward* hasil rancangan adalah 59,96°C dan *reverse* adalah 59,89°C. Produk PCR yang dihasilkan akan rendah apabila suhu leleh terlalu tinggi dan apabila suhu leleh terlalu rendah dapat menimbulkan kemungkinan produk yang tidak spesifik akibat peningkatan jumlah pasangan basa yang tidak sesuai.

Persentase GC menunjukkan jumlah guanin dan sitosin dalam total basa pada primer dan hasil desain primer gen menghasilkan persentase GC sebesar 50%. Nilai tersebut sesuai dengan kisaran persentase GC optimum 45-65% (Kalendar *et al.* 2009). Primer gen COI spesifik *T. lepturus* tidak memiliki struktur sekunder dan primer dimer. Struktur sekunder menghambat PCR dan menurunkan

hasil produk PCR (Ozturk dan Can 2017). Molekul primer yang berhibridisasi dengan molekul primer lainnya dan bertindak sebagai *template* menghasilkan primer dimer (Chen *et al.* 2002).

Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Prinsip perhitungan konsentrasi DNA yaitu berdasarkan penyerapan spektrofotometrik sinar ultraviolet. Konsentrasi DNA yang tinggi menunjukkan bahwa semakin banyak sinar UV yang terabsorpsi. Rasio absorpsi pada 260 nm dan 280 nm menunjukkan nilai kemurnian DNA dan RNA (Siswanto *et al.* 2016). Konsentrasi dan kemurnian DNA pada penelitian ini diukur dengan *nanodrop spectrophotometer*. Hasil pengukuran tersebut dapat dilihat pada *Table 2*.

Konsentrasi DNA tertinggi terdapat pada sampel L1 yaitu 172 ng/μL dan terendah yaitu LC dengan konsentrasi sebesar 13,05 ng/μL. Kisaran konsentrasi ikan layur segar

Table 2 DNA concentration of hairtail fish

Sample	DNA concentration (ng/μL)	DNA purity (A_{260}/A_{280})
L1	172	2.17
L2	79.6	2.22
L3	22.4	3.30
L4	102.7	2.20
L5	83.4	2.30
LA	138.8	1.91
LB	39.9	1.83
LC	13.05	1.62
LD	53.75	1.87
LE	28.4	1.77

(L1-L5) yaitu 22,4-172 ng/ μ L dan ikan layur olahan (LA-LE) yaitu 13,05-138,8 ng/ μ L. Perbedaan konsentrasi pada ikan layur segar dan olahan disebabkan oleh perbedaan jenis sampel, ikan layur segar tidak mengalami proses pengolahan dan tidak ditambahkan bahan campuran pangan. Penambahan campuran pangan dalam proses pengolahan dapat menyebabkan isolat DNA tercampur dengan kontaminan seperti oligopeptida, polisakarida, protein, dan bahan organik lainnya (Nuraini 2004). DNA yang murni memiliki A_{260}/A_{280} yang berkisar antara 1,8-2,0 (Siswanto *et al.* 2016). Sampel hasil penelitian yang memiliki DNA tergolong murni di antaranya adalah LA, LB dan LD.

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA menggunakan 2 primer, yaitu primer FishF1R1 dan primer spesifik ikan layur. Visualisasi produk PCR dilakukan dengan menggunakan UV-Transilluminator. Elektroforegram PCR

(*Figure 1a*) menunjukkan bahwa sampel ikan layur segar dan olahan teramplifikasi dengan baik yang ditandai dengan munculnya pita target. Primer FishF1R1 tidak dapat mengamplifikasi DNA seluruh sampel olahan layur (*Figure 1b*), sedangkan primer spesifik dapat mengamplifikasi seluruh DNA sampel sesuai dengan target (*Figure 1c*). DNA target primer COI FishF1R1 dan spesifik ikan layur (*T. lepturus*) berturut-turut adalah 650 bp dan 212 bp. Keberhasilan amplifikasi daerah target sangat ditentukan oleh kondisi primer, yaitu penempelan primer pada DNA genom sampel yang digunakan (Zein dan Prawiradilaga 2014). Kemampuan amplifikasi primer spesifik ikan layur yang termasuk *mini barcodes* lebih baik dibandingkan dengan primer COI *full length* atau FishF1R1. Hal tersebut disebabkan oleh panjang fragmen primer spesifik yang lebih pendek sehingga dapat mengamplifikasi DNA produk olahan yang telah mengalami perubahan kualitas dan kuantitas DNA akibat proses pengolahan dan bahan tambahan.

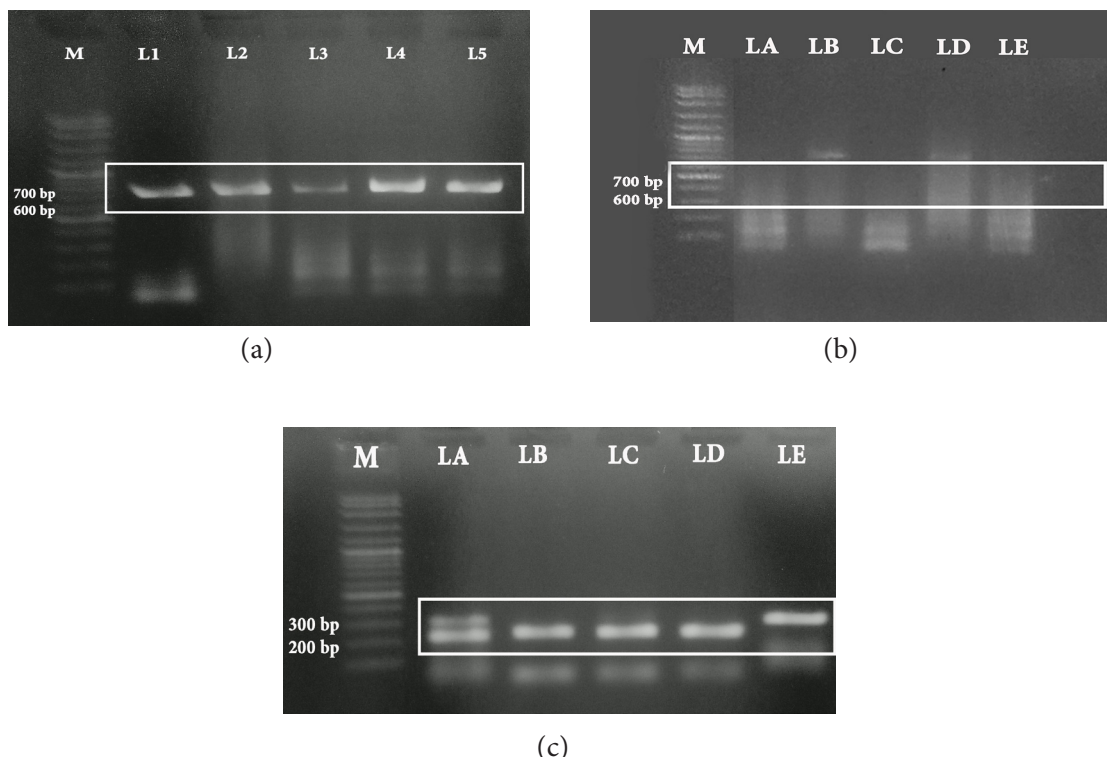


Figure 1 Electrophoregram of DNA amplification on agarose gel 1.25%, (a) sample of fresh hairtail fish L1-L5, (b) sample of processed hairtail products LA-LE when using full DNA barcode, (c) sample of processed hairtail products LA-LE using DNA mini barcode.

Identifikasi Spesies Ikan Layur Segar dan Olahan

Hasil identifikasi sampel ikan layur memiliki tingkat homologi yang berkisar antara 91-100% (Table 3). Persentase kemiripan sekuen yang dinyatakan dengan sekuen database apabila 97% sampai 100% dikatakan signifikan, 92% sampai 96% dikatakan cukup, lebih kecil dari 91% yaitu tidak signifikan bahwa sekuen yang dimiliki merupakan spesies dalam database GenBank (Bhattacharjee *et al.* 2012). Sampel L1, L2, L6,

L7 dan LC teridentifikasi sebagai *T. lepturus* dan LD teridentifikasi sebagai *Trichiurus* sp.

Sekuen ikan layur disejajarkan dengan berbagai spesies ikan layur lainnya atau *in group* dan spesies *Portunus trituberculatus* dan *Holothuria leucospilota* sebagai *out group*. Nilai *bootstrap* COI diperoleh 61-100% dan cabang pohon filogenetik memiliki panjang cabang yang beragam. Sampel LC dan LD membentuk kelompok dengan *T. lepturus* (Figure 2). Ikan layur jenis *T. auriga*, *T. japonicus*, *T. lepturus*, *Trichiurus* sp., *Lepturacanthus savala* dan

Table 3 BLAST analysis results of hairtailfish based on COI sequences

Code	Result	Query cover	Homologi	E value	Access code
L1	<i>T. lepturus</i>	100%	100%	0.0	FR878074.1
L2	<i>T. lepturus</i>	100%	100%	0.0	KP267586.1
L6	<i>T. lepturus</i>	100%	91%	0.0	KY372292.1
L7	<i>T. lepturus</i>	99%	91%	0.0	KY372292.1
LC	<i>T. lepturus</i>	100%	100%	7e-98	KP112482.1
LD	<i>Trichiurus</i> sp.	100%	100%	7e-98	LC269197.1

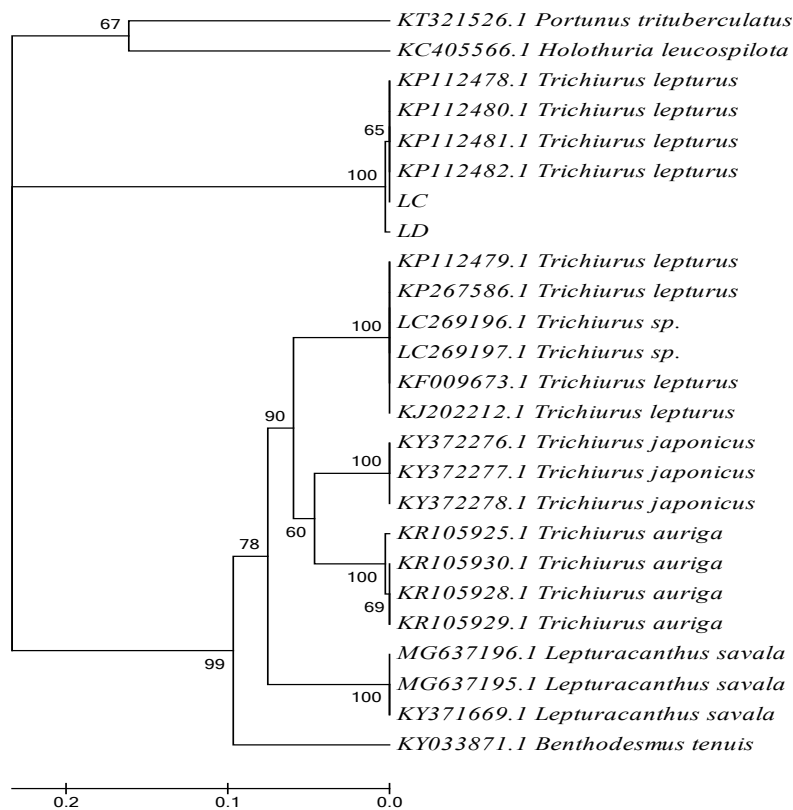


Figure 2 Phylogenetic trees construction based on COI sequences.

Benthodesmus tenuis berada dalam satu *clade*. Kelompok *outgroup* yaitu *Portunus trituberculatus* dan *Holothuria leucospilota* termasuk ke dalam *clade* yang berbeda dengan ikan layur. Analisis *bootstrap* dengan nilai 70% atau lebih mengindikasikan pengelompokan yang dapat dipercaya (Hillis dan Bull 1993).

KESIMPULAN

Desain primer spesifik ikan telah layur telah berhasil dan dapat mengamplifikasi seluruh sampel ikan layur olahan. Primer DNA *mini-barcode* COI spesifik ikan layur dapat digunakan sebagai penanda molekuler berbagai produk olahan dengan target marka 295 bp dan 212 bp. Identifikasi spesies ikan layur secara molekuler menunjukkan sampel teridentifikasi sebagai *T. lepturus* (91% dan 100%) dan *Trichiurus* sp. (100%).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah A, Rehbein H. 2016. DNA barcoding for the species identification of commercially important fishery products in Indonesian markets. *International Journal of Food Science and Technology*. 52(1): 1-9.
- Armani A, Guardone L, Castigliero L, D'Amico P, Messina A, Malandra R, Gianfaldoni D, Guidi A. 2015. DNA and Mini-DNA barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market. *Food Control*. 50: 589-596.
- Bhattacharjee MJ, Laskar BA, Dhar B, Ghosh SK. 2012. Identification and re-evolution of freshwater catfishes through DNA barcoding. *Plos One*. 7: 1-7.
- Borah P. 2011. Primer designing for PCR. *Science Vision*. 11(3): 134-136.
- Carvalho DC, Palhares RM, Drummond MG, Frigo TB. 2015. DNA Barcoding identification of commercialized seafood in souregulatory forensic program. *Food control*. 50: 784-788.
- Chen BY, Janes HW, Chen S. 2002. PCR Cloning Protocols, 2nd Edition. Totowa (NJ): Humana Press Inc.
- Cline E. 2012. Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. *Food Research International*. 45: 388-393.
- Di Pinto A, Di Pinto P, Terio V, Bozzo G, Bonerba E, Ceci E, Tantillo G. 2013. DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food Chemistry*. 141: 1752-1762.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 270: 313-321.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analyses. *Systematic Biology*. 42(2): 182-192.
- Jacquet JL, Pauly D. 2008. Trade Secrets: renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy*. 32: 309-318.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH. 2009. FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes, and Genomics*. 3(1): 1-14.
- Kappel K, Schröder U. 2016. Substitution of high-priced fish with low-priced species: adulteration of common sole in German restaurants. *Food control*. 59: 478-486.
- Kwun BHJ, Ryu JH, Kim JK. 2010. First record of hairtail blenny *Xiphasia setifer* (Perciformes: Blenniidae) from Korea. *Korean Journal of Ichthyology*. 22(4): 289-292.
- Nagalakshmi K, Annam PK, Venkateshwarlu G, Pathakota GB, Lakra WS. 2016. Mislabeling in Indian seafood: an investigation using DNA barcoding. *Food control*. 59: 196-200.
- Nuraini H. 2004. Pengembangan sekuen *Procine Repetitive Element-1* (PRE-1) sebagai penanda molekuler untuk mendeteksi material babi pada produk daging olahan. [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nurilmala M, Ochiai Y. 2016. Molecular characterization of southern bluefin tuna myoglobin (*Thunnus maccoyii*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 42(5): 1407-1416.
- Ozturk AR, Can T. 2017. A multiplex primer design algorithm for target amplification of continuous genomic regions. *BMC*

- Bioinformatics*. 18(306): 1-9.
- Rasmussen SR, Morrissey MT. 2009. Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 8: 118-154.
- Sanger F, Micklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science 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 products. *Scientific Reports*. 1-11.
- Siswanto JE, Berlian T, Putricahya E, Panggalo LV, Yuniani L. 2016. Isolasi DNA pada sampel darah tepi dan swab buccal pada bayi penderita ROP: Perbandingan hasil uji konsentrasi dan indeks kemurnian. *Jurnal Sari Pediatri*. 18(4): 270-277.
- Sultana S, Ali ME, Hossain MM, Naquiah N, Zaidul ISM. 2018. Universal mini COI barcode for the identification of fish species in processed products. *Food Research International*. 105: 19-28.
- [UN Comtrade] United Nations Commodity Trade. 2015. United nations commodity trade statistics database [Internet]. [diunduh 2017 Okt 08]. Tersedia pada: <https://comtrade.un.org/>.
- Westmermeier. 2004. Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice. New Jersey (US): John Wiley & Sons Inc.
- Wulansari N, Nurilmala M, Nurjanah N. 2015. Detection tuna and processed products based protein and DNA barcoding. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*: 18(2): 119-127.
- Zhao W, Zhao Y, Pan Y, Wang X, Wang Z, Xie J. 2013. Authentication and traceability of *Nibeal albiflora* from surimi products by species specific. *Food Control*. 31: 97-101.
- Zein MSA, Prawiradilaga DM. 2014. *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Jakarta (ID): Kencana.