

EVALUASI PRIMER GEN COI SEBAGAI BIOMARKER KETERTELUSSURAN IKAN MENGUNAKAN BIOINFORMATIKA

Roni Nugraha, Puspita Sari Dewi, Mala Nurilmala

Departemen Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University,
Jalan Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680 Jawa Barat

Diterima: 1 Oktober 2021/Disetujui: 17 Maret 2022

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

Cara sitasi: Nugraha R, Dewi PS, Nurilmala M. 2022. Evaluasi primer gen COI sebagai biomarker ketertelusuran ikan menggunakan bioinformatika. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 25(1):67-79.

Abstrak

Gen *cytochrome oxidase I* (COI) merupakan bagian dari bahan genetik mitokondria yang sering digunakan sebagai penanda spesies pada sistem ketertelusuran produk perikanan. Gen COI ini diperbanyak dari jaringan ikan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer universal. Akan tetapi, ikan merupakan spesies yang memiliki keragaman yang tinggi, sehingga primer universal ini tidak sepenuhnya cocok dengan gen COI ikan. Oleh karena itu, penelitian yang bertujuan untuk mengevaluasi kecocokan primer universal di berbagai gen COI ikan perlu untuk dilakukan. Pada penelitian ini, primer universal dicocokkan dengan 33 sekuen spesies ikan dari GenBank NCBI. Sekuen dianalisis dengan membuat *Percent Identity Matrix* (PIM) dan pohon filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak semua primer memiliki kualitas yang baik. Primer CO1shark25 dan CO1shark315 sejajar dengan 31-32 sekuen, namun belum memenuhi parameter ideal sebuah primer. Oleh karena itu, didesain beberapa primer universal baru yang sesuai dengan kriteria primer ideal. Desain primer baru dibuat dan dievaluasi menggunakan program PerlPrimer dan OligoEvaluator. Primer *mini-barcode* universal ikan dari sekuen *Lagocephalus lagocephalus*, *Takifugu vermicularis*, *Arothron hispidus*, *Hypanus americanus*, *Isurus oxyrinchus*, dan *Katsuwonus pelamis* telah dirancang dan dievaluasi untuk alternatif biomarker.

Kata kunci: DNA *barcoding*, *in silico*, primer, *traceability*

Evaluation of COI Gene Primer as a Biomarker Traceability using Bioinformatics

Abstract

Traceability is carried out to provide information for tracking fish species, especially of high economic value and vulnerable to extinction. Bioinformatics can predict biomarker for fish traceability. This study was aimed to evaluate widely used primer sequences of COI gene for fish traceability and identify new universal primer sequences. Primers used in previous researches were evaluated and aligned with 33 fish species sequences from the NCBI GenBank. The relationship of those 33 fish species was evaluated using Percent Identity Matrix (PIM) and phylogenetic trees. The results showed not all primers have a good quality. CO1shark25 and CO1shark315 primer can be aligned to 31-32 fish sequences but did not fulfilled the ideal primer parameters. Therefore, several new universal primers were designed that fit the ideal criteria. The primer was designed and evaluated by using PerlPrimer and OligoEvaluator software. Fish universal mini-barcode primers from *Lagocephalus lagocephalus*, *Takifugu vermicularis*, *Arothron hispidus*, *Hypanus americanus*, *Isurus oxyrinchus* and *Katsuwonus pelamis* sequences successfully designed and evaluated for alternative biomarkers.

Key word: DNA *barcoding*, *in silico*, primer, *traceability*

PENDAHULUAN

Insiden *mislabeled* dan substitusi ilegal produk perikanan disebabkan karena motif ekonomi yang dapat dilakukan secara sengaja maupun tidak disengaja. Kasus ini marak terjadi pada beberapa tahun terakhir. Kasus substitusi produk ditemukan pada beberapa penelitian. Sultana *et al.* (2017) dalam penelitiannya menemukan substitusi surimi ikan label *Alaska pollock* dengan ikan nila dan lele. Spencer dan Bruno (2019) menemukan kasus *mislabeled* pada ikan kakap merah yang sebenarnya adalah ikan nila. Kesalahan label juga ditemukan pada produk ikan *seabass* (kakap) yang sebenarnya merupakan ikan patin (*Pangasionodon hypophthalmus*) pada penelitian Minoudi *et al.* (2020). Ajitama (2017) menemukan kerupuk udang yang tidak mengandung udang. Produk *roasted fillet* berlabel ikan cod berdasarkan hasil penelitian Wen *et al.* (2017) ternyata menggunakan ikan buntal yang beracun (*Lagocephalus spp.*). Kasus *mislabeled fillet* tongkol sebagai tuna sirip biru juga ditemukan pada penelitian Maralit *et al.* (2013). Jual beli dan konsumsi ikan hiu di Indonesia yang terdaftar dalam *red list International Union for Conservation of Nature* (IUCN) juga ditemukan dalam penelitian Muttaqin *et al.* (2019) dan Mopay *et al.* (2017). Penjaminan terhadap kualitas dan mutu serta sistem ketertelusuran terpadu terhadap produk perikanan telah menjadi suatu kewajiban yang harus dipenuhi oleh pihak produsen produk pangan di era globalisasi.

Beberapa metode identifikasi spesies berbasis morfologis dan protein telah dicoba untuk mendeteksi ikan namun metode tersebut dinilai kurang efektif. Identifikasi spesies ikan yang dilakukan secara tradisional tergantung pada karakteristik morfologis seperti bentuk tubuh, jumlah sisik atau sirip, dan pola warna. Karakteristik tersebut tidak cukup untuk identifikasi oleh para non-spesialis atau pada kasus sampel yang tidak lengkap dan spesies yang samar (Panprommin *et al.* 2019). Sampai saat ini telah banyak metode identifikasi spesies ikan yang berbasis protein biomarker, misalnya metode elektroforesis (Ataman

et al. 2006), teknik imunologi (Fernández *et al.* 2002), dan pendekatan kromatografi (Horstkotte dan Rehbein 2003), tetapi metode-metode tersebut tidak cocok untuk ikan komersial karena degradasi protein yang disebabkan oleh panas (Chin *et al.* 2016).

Metode berbasis DNA dapat menjadi solusi alternatif bagi permasalahan tersebut. Metode tersebut dipilih untuk identifikasi spesies karena memiliki beberapa keunggulan jika dibandingkan dengan teknik berbasis protein, yaitu keberadaan DNA yang mudah ditemukan pada setiap jenis sel, stabilitas molekul DNA yang tinggi, dan spesifisitas yang tinggi. Metode berbasis protein memiliki keterbatasan pada produk olahan, misalnya kemungkinan denaturasi protein dan modifikasi epitop spesifik yang terkait dengan proses pengolahan. Metode PCR merupakan metode berbasis DNA yang paling umum untuk digunakan karena kesederhanaan, ketahanan, spesifisitas dan kepekaannya (Costa *et al.* 2016).

Metode *DNA barcoding* yang berdasar pada urutan nukleotida parsial dari gen mitokondria sitokrom oksidase I (COI) dapat berfungsi sebagai inti dari sistem bioidentifikasi global untuk hewan (Hebert *et al.* 2003a). Metode *DNA barcoding* saat ini dikenal sebagai teknik untuk mengidentifikasi dan menentukan suatu jenis atau spesies. Metode ini tergantung pada urutan nukleotida pendek atau sekuen yang didapatkan dari GenBank, misalnya NCBI, BOLD dan INSDC (Govender *et al.* 2019). Jenis gen yang umum digunakan dalam *DNA barcoding* kelompok hewan yaitu gen mitokondria *cytochrome oxidase 1* (COI) (Wallace *et al.* 2012). Saat ini, telah banyak primer universal yang dibuat untuk mengampifikasi gen COI. Primer-primer tersebut diambil dari bagian yang lestari. Namun, mayoritas spesies-spesies yang digunakan untuk analisis kelestarian primer tersebut berasal dari daerah subtropis dan merupakan ikan bertulang sejati. Oleh karena itu, penelitian bertujuan untuk menentukan kelestarian primer-primer tersebut di ikan-ikan daerah tropis dan juga ikan-ikan *Elasmobranchii*.

METODE

Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan perangkat lunak MEGA X versi 10.0.5 (Kumar *et al.* 2018), PerlPrimer, situs ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>) (Li *et al.* 2015), situs OligoEvaluator™ (<https://www.oligoevaluator.com/LoginServlet/>) (Mehta *et al.* 2015) dan situs *heatmap* (<https://www.heatmapper.ca/>). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 33 sekuen DNA ikan gen COI parsial yang diunduh dari *database National Center for Biotechnology* (NCBI) (<https://www.ncbi.nih.gov/>) dan delapan pasang primer ikan dengan gen pengkode COI yang diambil dari penelitian Ward *et al.* (2005), Mikkelsen *et al.* (2006), Baldwin *et al.* (2009), Sultana *et al.* (2017), Govender *et al.* (2019), Fotedar *et al.* (2019), Jennings *et al.* (2019), dan Abdullah *et al.* (2019).

Identifikasi dan evaluasi primer dari pustaka

Primer-primer yang berasal dari penelitian sebelumnya dikumpulkan dan dievaluasi. Primer yang dikumpulkan adalah primer dengan gen COI, baik *universal* ikan maupun spesifik ikan. Panjang produk primer yang dikumpulkan beragam, mulai dari DNA *mini barcode* sampai *full length*. Terdapat delapan pasang primer yang berhasil dikumpulkan. Primer-primer tersebut dievaluasi spesifisitasnya dengan menggunakan situs BLAST-NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) kemudian dievaluasi spesifikasinya menggunakan situs OligoEvaluator™ (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet/>). Hasil analisis spesifisitas dianalisis lebih lanjut untuk dibuat data *heatmap*. Data evaluasi spesifikasi atau kriteria primer yang didapatkan kemudian disajikan dalam bentuk tabel.

Pengumpulan sekuen

Sekuen dikumpulkan dari situs GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nih.gov/>) untuk diunduh dalam bentuk *fasta* dan digunakan dalam penelitian ini. Terdapat 33 total sekuen ikan dengan gen COI parsial. Sekuen-sekuen yang diunduh adalah sekuen ikan yang terancam punah, ikan dengan nilai ekonomi

tinggi dan ikan buntal yang beracun. Sekuen-sekuen tersebut diunduh untuk dilakukan analisis lebih lanjut seperti *Percent Identity Matrix* (PIM), pembuatan pohon filogenetik, pembuatan primer, dan analisis keragaman primer. Profil sekuen-sekuen yang digunakan disajikan dalam bentuk tabel.

Pembuatan pohon filogenetik (Tamura *et al.* 2004)

Pohon filogenetik dibuat dengan melakukan tiga tahapan utama. Tahap pertama yaitu memperoleh sekuen. Sekuen yang tidak dipilih dengan baik maka akan menghasilkan pohon yang tidak valid. Sejumlah 33 sekuen digunakan dalam pembuatan pohon filogenetik ini. Tahap kedua yaitu penjajaran (*alignment*) sekuen. Tahap ini juga dilakukan untuk mengedit nama-nama sekuen yang terlalu panjang menjadi lebih singkat yaitu nama spesies dan kode akses. Setelah penjajaran selesai dilakukan, data disimpan dalam bentuk *fasta*. Tahap ketiga yaitu membuat pohon filogenetik. Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk memperkirakan pohon yaitu *Neighbor Joining*, *UPGMA Maximum Parsimony*, *Inferensi Bayesian*, dan *Maximum Likelihood* (ML). Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Neighbor Joining*. Metode *Neighbor Joining* dipilih pada menu "*Analysis preferences*", kemudian "*statistical method*". Tahap selanjutnya yaitu penentuan jumlah *bootstrap* 1000 pada menu "*no. of bootstrap replication*", kemudian pada menu "*substitution model*" dipilih Kimura 2-parameter model. Pilihan menu yang lainnya disesuaikan dengan *default*.

Desain primer dan evaluasi primer (Davidovic *et al.* 2014)

Perancangan primer membutuhkan sekuen ikan gen COI yang diunduh dari pangkalan data NCBI. Primer dibuat menggunakan perangkat lunak PerlPrimer dan dievaluasi dengan BLAST-NCBI serta OligoEvaluator. Primer yang dibuat adalah primer universal ikan *mini-barcode* dengan gen COI. Primer tersebut dibuat dengan menggunakan perangkat lunak PerlPrimer

dengan cara memasukkan salah satu sekuen ikan. Karakteristik primer seperti panjang produk amplikon, suhu T_m , dan persen GC diatur sebelum memasukkan sekuen. Perangkat lunak PerlPrimer akan memberikan beberapa kandidat primer lengkap dengan karakteristik masing-masing primer seperti suhu lebur (T_m), panjang primer, %GC, dan panjang amplikon. Kandidat primer dievaluasi kembali satu persatu menggunakan *website* OligoEvaluator dan BLAST-NCBI untuk mengetahui primer yang terbaik. Primer yang baik dapat dinilai dari spesifikasi karakteristik primer dan analisis spesifisitas primer.

Penentuan kualitas spesifikasi primer

Calon primer yang didapatkan dari PerlPrimer dianalisis menggunakan *website* OligoEvaluator. Penentuan kualitas primer bertujuan untuk mengetahui spesifikasi primer berdasarkan karakteristik tertentu. Karakteristik primer yang harus diperhatikan yaitu persen GC, suhu lebur (T_m), perbedaan T_m primer *forward* dan *reverse*, *secondary structure*, dan *primer dimer*. Persen GC terbaik berkisar antara 40-60%, suhu T_m berkisar antara 50-62 °C dengan perbedaan T_m primer *forward* dan *reverse* tidak lebih dari 5 °C, tidak terbentuk struktur sekunder dan tidak terjadi primer dimer. Hasil evaluasi yang didapatkan disajikan dalam bentuk tabel.

Analisis spesifisitas primer

Analisis spesifisitas dilakukan untuk menentukan keunikan primer yang dibuat. Analisis spesifisitas primer dilakukan dengan *alignment* menggunakan BLAST-NCBI dengan melihat daftar nama spesies yang ditampilkan. Data hasil *alignment* BLAST berupa daftar spesies yang memiliki kecocokan dengan urutan basa (sekuen) primer yang diuji. Primer *universal* akan menampilkan daftar nama spesies ikan yang beragam, sedangkan primer yang bersifat spesies-spesifik akan menampilkan daftar nama ikan tertentu. Data yang didapatkan diolah menjadi bentuk tabel untuk dilakukan analisis keragaman primer yaitu dalam bentuk *heatmap*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi Primer yang Berasal dari Pustaka

Primer yang berasal dari pustaka, diidentifikasi untuk mengetahui jenis primer, apakah primer tersebut bersifat spesifik atau universal. Primer juga dievaluasi spesifikasinya berdasarkan kriteria ideal primer. Primer yang dipilih adalah primer ikan dengan gen pengkode COI. Evaluasi primer dilakukan dengan memperhatikan beberapa karakteristik seperti suhu lebur primer (T_m), konten GC, struktur sekunder, dan primer dimer. Hasil evaluasi primer dapat dilihat pada *Table 1*.

Hasil yang didapatkan berdasarkan *Table 1*, terdapat delapan pasang primer *forward* dan *reverse* yang berasal dari beberapa pustaka. Panjang sekuen atau urutan basa nukleotida berkisar antara 20-26 panjang basa (pb). Wu *et al.* (2004) menyatakan bahwa panjang suatu primer berkisar antara 16-28 pb, dengan perbedaan panjang antara primer *forward* dan *reverse* tidak lebih dari tiga nukleotida. Suhu lebur primer atau nilai T_m yang tertinggi diperoleh pada primer Fish F1 dan Fish R1 yaitu sebesar 71,0 dan 73,1°C, sedangkan nilai T_m terendah didapatkan pada primer COIF-ALT dengan nilai 44,1°C. Suhu lebur atau *melting temperature* (T_m) merupakan faktor kritis dalam keberhasilan proses PCR. Umumnya, primer memiliki nilai T_m berkisar antara 50–62°C. Perbedaan suhu T_m antara primer F dan primer R sebaiknya tidak lebih dari 5°C. (Chuang *et al.* 2013). Primer Mikkelsen *et al.* (2006) dan primer Baldwin *et al.* (2009) tidak sesuai dengan kriteria karena memiliki perbedaan suhu T_m lebih dari 5°C.

Komposisi GC pada primer adalah nilai persentase yang menunjukkan rasio nukleotida 'G' dan 'C' yang muncul pada sekuen primer. Persentase konten GC pada primer Mikkelsen *et al.* (2006), Baldwin *et al.* (2009), primer F Govender *et al.* (2019) dan Jennings *et al.* (2019) berkisar antara 25-34.6%. Hal ini tidak sesuai dengan pernyataan Chuang *et al.* (2013), yaitu proporsi GC yang tepat untuk primer pada umumnya adalah 40-

Table 1 Chemical characteristics of snakehead murrel

Primer Code	Sequence	Product Length (bp)	T _m (°C)	GC%	Secondary structure	Primer dimer	Ref
Fish F1 (F)	TCAACCAACCACAA AGACATTGGCAC	655	73.1	46.2	Moderate	No	Ward <i>et al.</i> (2005)
Fish R1 (R)	TAGACTTCTGGGTGG CCAAAGAATCA	655	71.0	46.2	Weak	No	Ward <i>et al.</i> (2005)
COIF-ALT	ACAAATCAYAARGA YATYGG	657	44.1	25.0	None	No	Mikkelsen <i>et al.</i> (2006)
COIR-ALT	TTCAGGRTGNCCRAA RAAYCA	657	51.8	33.3	None	No	Mikkelsen <i>et al.</i> (2006)
FISH-BCL	TCAACYAATCAYAA AGATATYGGCAC	655	58.2	30.8	Very weak	No	Baldwin <i>et al.</i> (2009)
FISH-BCH	TAAACTTCAGGGTG ACCAAAAAATCA	655	66.9	34.6	Very weak	No	Baldwin <i>et al.</i> (2009)
Forward (F)	ATCACAAAGACATT GGCACCCCT	295	66.6	45.5	None	No	Sultana <i>et al.</i> (2017)
Reverse (R)	AATGAAGGGGGGAG GAGTCAGAA	295	69.8	52.2	Very weak	No	Sultana <i>et al.</i> (2017)
Lobster Minibar (F)	GGWGATGAYCAAAT TTAYAAGT	313-319	53.7	27.3	None	No	Govender <i>et al.</i> (2019)
Lobster Minibar (R)	CCWACTCCTCTTTCT ACTATTCC	313-319	56.2	43.5	None	No	Govender <i>et al.</i> (2019)
CO1shark25 (F)	AGCAGGTATAGTTG GAACAGCCC	248	66.2	52.2	None	No	Fotedar <i>et al.</i> (2019)
CO1shark315 (R)	GCTCCAGCTTCTACT CCAGC	248	63.2	60.0	Weak	No	Fotedar <i>et al.</i> (2019)
FISH-F6	ACYAAYCACAAAGA YATTGGCA	740	57.7	31.8	None	No	Jennings <i>et al.</i> (2019)
FISH-R7	TARACTTCTGGRTGD CCRAAGAAYCA	740	57.1	34.6	Weak	No	Jennings <i>et al.</i> (2019)
FCOI- <i>T. lepturus</i>	TGAAACCTGCGGCC ATTACT	212	66.5	50.0	None	No	Abdullah <i>et al.</i> (2019)
RCOI- <i>T. lepturus</i>	TGGGTGGCCGAAGA ATCAAA	212	69.7	50.0	None	No	Abdullah <i>et al.</i> (2019)

60% Analisis struktur sekunder menunjukkan hasil yang beragam yaitu *none*, *very weak*, *weak*, dan *moderate*. Struktur sekunder dapat terjadi dimungkinkan karena nilai Tm yang terlalu tinggi pada suatu primer (Borah 2011). Ozturk dan Can (2017) menyatakan bahwa struktur sekunder pada primer dapat menghambat proses PCR dan dapat menurunkan kualitas hasil PCR, sehingga harus dihindari. Karakteristik primer dimer berdasarkan *Table 2* menunjukkan tidak terjadi primer dimer pada seluruh primer. Vallone dan Butler (2004) mengemukakan bahwa penempelan dari kedua primer akan menghasilkan dimer. Terjadinya dimer dapat memberi efek negatif terhadap hasil PCR, sehingga hibridisasi kedua primer harus dihindari.

Kriteria primer selanjutnya adalah *repeats*. *Repeats* merupakan dinukleotida yang berulang dalam primer, adanya *repeats* dapat menyebabkan terjadinya penempelan primer di tempat yang tidak diinginkan (*mispriming*) (Borah *et al.* 2011). Pengulangan nukleotida tunggal atau *runs* dan *repeats* sebaiknya dihindari karena dapat menyebabkan tergelincir di sepanjang segmen DNA dan juga menyebabkan terbentuknya struktur *hairpin loop*. Jika tidak dapat menghindari *repeats* dan *runs* karena *template* DNA, maka batas maksimum yang disarankan adalah 4 basa nukleotida (Lorenz 2012). Primer FISH-BCH Baldwin *et al.* (2009) dan primer reverse Sultana *et al.* (2017) terindikasi adanya *runs*, yaitu pengulangan 'AAAAAA' dan 'GGGGGG'.

Evaluasi keragaman primer pada berbagai jenis ikan

Primer-primer yang didapatkan dari berbagai pustaka dievaluasi keragamannya pada 33 sekuen gen COI dari berbagai jenis ikan yang diunduh melalui *database* NCBI (*Table 2*). Sekuen-sekuen tersebut terdiri atas sepuluh ordo berbeda yaitu Myliobatiformes, Anguilliformes, Tetraodontiformes, Siluriformes, Rhinopristiformes, Lamniformes, Carcharhiniformes, Orectolobiformes, Pristiformes, dan Scombriformes.

Hasil yang didapatkan berdasarkan *Figure 1* menunjukkan adanya pengelompokan atau

clustering. Pengelompokan dan percabangan yang terbentuk didukung dengan nilai *bootstrap* yang tinggi yang menentukan kestabilan dari pembentukan kelompok. Pengelompokan dan kedekatan antar spesies tersebut didukung oleh nilai jarak genetik dan perbedaan nukleotida. Sebuah kelompok organisme yang anggota-anggotanya memiliki banyak kesamaan karakter atau ciri dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang; pola genetik yang sama akan memiliki kecenderungan menjalani jalur evolusi yang sama (Li dan Graur 1991). Pohon filogenetik selain menunjukkan kekerabatan antar spesies yang diperbandingkan, juga menggambarkan perubahan yang terjadi pada gen penanda untuk masing-masing spesies. Panjang cabang mewakili sejumlah besar perubahan evolusi yang terjadi pada suatu spesies. Semakin panjang cabang maka semakin banyak perubahan evolusi yang terjadi (Parks dan Goldman 2014).

Dua klaster besar yaitu pada bagian atas merupakan klaster ikan bertulang rawan (*Elasmobranchii*) dan pada bagian bawah merupakan klaster ikan bertulang sejati (*Teleostei*). Klaster bagian atas ditempati oleh anggota ordo Carcharhiniformes, Orectolobiformes, Lamniformes, Pristiformes, Rhinopristiformes dan Myliobatiformes dengan nilai *bootstrap* sebesar 29-100%. Klaster di bagian bawah pohon filogenetik ditempati oleh anggota ordo Siluriformes, Anguilliformes, Tetraodontiformes, dan Scombriformes dengan nilai *bootstrap* sebesar 44-100%. Pengelompokan dalam satu klaster untuk ordo yang sama menggambarkan kedekatan kekerabatannya. Semakin banyak sekuen DNA yang memiliki tingkat homologi yang tinggi maka posisinya di dalam percabangan pohon filogeni akan berdekatan.

Keragaman Primer Pustaka

Analisis keragaman primer pustaka dilakukan untuk mengetahui hasil penjarangan antara primer dengan 33 sekuen yang digunakan. Analisis keragaman primer dilakukan untuk mengetahui terjadinya kecocokan atau sebaliknya, primer dapat tidak

Table 2 Sequence of COI from fish species used for primer conservation analysis

Accession ID	Species	Common name	Length (bp)
JF493866.1	<i>Manta birostris</i>	Giant oceanic manta ray	652
MH235670.1	<i>Mobula japanica</i>	Spinetail mobula	658
MH235672.1	<i>Mobula tarapacana</i>	Chilean devil ray	658
HQ575830.1	<i>Hypanus americanus</i>	Southern stingray	652
KU692247.1	<i>Anguilla bicolor</i>	Indonesian shortfin eel	652
MK572031.1	<i>Anguilla bengalensis</i>	Mottled eel	655
KM610420.1	<i>Anguilla nebulosa</i>	Mottled eel	648
MG816649.1	<i>Arothron hispidus</i>	White-spotted puffer	655
JF730882.1	<i>Lagocephalus lagocephalus</i>	Oceanic puffer	655
JQ681820.1	<i>Takifugu pardalis</i>	Puffer fish	677
KY514079.1	<i>Takifugu vermicularis</i>	Purple puffer	682
KC959930.1	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Green spotted puffer	652
MG837968.1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Siamese shar	652
KY118584.1	<i>Pangasianodon gigas</i>	Mekong giant catfish	639
KM232630.1	<i>Pangasius pangasius</i>	Pangas catfish	655
MK422139.1	<i>Rhynchobatus australiae</i>	Whitespotted guitarfish	634
MG837943.1	<i>Isurus oxyrinchus</i>	Shortfin mako shark	652
KP193429.1	<i>Alopias pelagicus</i>	Pelagic thresher shark	652
MG837909.1	<i>Carcharhinus falciformis</i>	Silky shark	652
JQ365585.1	<i>Sphyrna lewini</i>	Scalloped hammerhead	652
FJ519544.1	<i>Sphyrna zygaena</i>	Smooth hammerhead	652
JN312505.1	<i>Prionace glauca</i>	Blue Shark	652
HQ171611.1	<i>Carcharhinus amblyrhynchos</i>	Grey reef shark	652
JN989316.1	<i>Sphyrna mokarran</i>	Great hammerhead	652
FJ519251.1	<i>Rhincodon typus</i>	Whale shark	652
MF977764.1	<i>Pristis pristis</i>	Large-tooth sawfish	567
KT307170.1	<i>Cetorhinus maximus</i>	Basking shark	635
EU398627.1	<i>Carcharhinus longimanus</i>	Oceanic whitetip shark	655
KT074158.1	<i>Thunnus thynnus</i>	Atlantic bluefin tuna	629
JN653476.1	<i>Katsuwonus pelamis</i>	Skipjack tuna	618
JN312307.1	<i>Thunnus albacares</i>	Yellow fin tuna	652
KP975847.1	<i>Thunnus alalunga</i>	Tuna albacore	651
KY372230.1	<i>Thunnus obesus</i>	Bigeye tuna	634

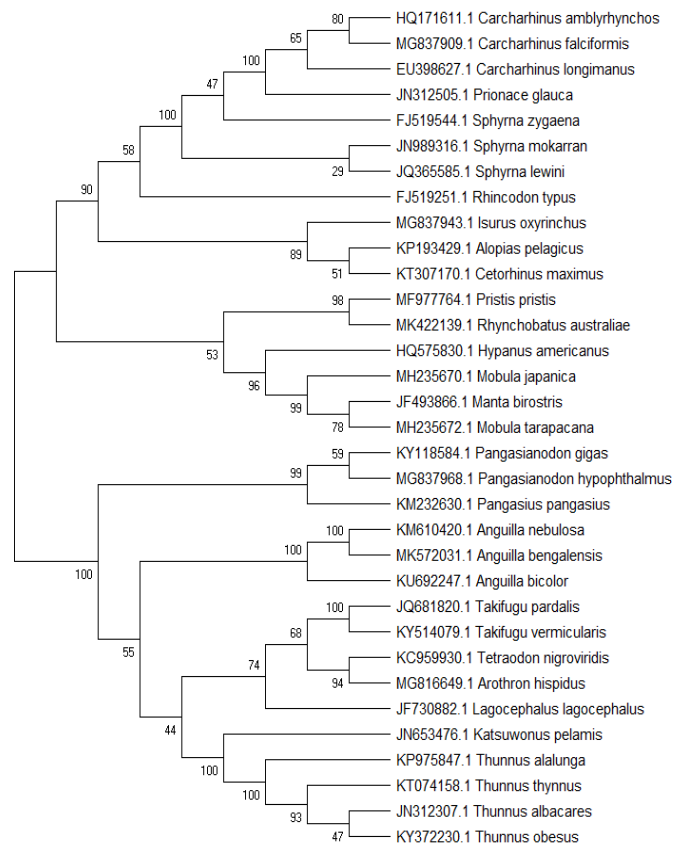


Figure 1 Phylogenetic tree of fish species used for primer conservation analysis

dapat disejajarkan dengan sekuen. Analisis keragaman primer dilakukan menggunakan situs BLAST-NCBI. Data hasil BLAST analisis keragaman primer diolah dalam bentuk .csv untuk dibuat visualisasi gambar berupa heatmap. Data heatmap dibuat menggunakan situs heatmapper.ca kemudian file bentuk .csv diunggah ke dalam situs tersebut, pengaturan disesuaikan dengan default sehingga didapatkan heatmap seperti pada *Figure 2*.

Berdasarkan *Figure 2* dapat dilihat bahwa terdapat dua kluster utama yaitu kluster atas dan kluster bawah. Kluster atas terdiri dari primer-primer yang dapat mendeteksi (sejajar) dengan banyak sekuen yaitu 22-33 sekuen (universal ikan) sedangkan kluster bawah adalah primer yang dapat sejajar hanya pada sedikit sekuen yaitu 5-10 sekuen. Berdasarkan hasil *heatmap* dapat dikatakan bahwa diperlukan primer alternatif *mini-barcode* yang dapat mendeteksi seluruh sekuen dengan spesifikasi primer yang baik yang sesuai dengan kriteria primer yang ideal. Primer *forward* Baldwin *et al.*

(2009) dan Govender *et al.* (2019) berada pada kluster bawah (biru) yang dapat sejajar dengan sedikit spesies (6 dan 7 spesies), sedangkan primer *reverse* Baldwin *et al.* (2009) dan Govender *et al.* (2019) berada pada kluster atas (kuning) yang sejajar terhadap banyak spesies (27 dan 30 spesies). Perbedaan jumlah spesies yang sejajar terhadap primer dapat disebabkan karena pemilihan wilayah sekuen yang tidak lestari (*conserve*) pada primer *forward* Baldwin *et al.* (2009) dan Govender *et al.* (2019) sehingga primer tersebut hanya dapat mendeteksi sedikit spesies. Sunarno dan Novriani (2016) menemukan masalah pada pembuatan primer, yaitu tidak didapatkan daerah yang 100% lestari (*conserve*).

Hasil analisis keragaman primer menunjukkan adanya ketidaksesuaian klaim pada beberapa primer terhadap hasil penajajaran yang dilakukan dengan 33 sekuen ikan yang digunakan. Hal ini dapat disebabkan karena gen COI memiliki wilayah lestari yang luas, sehingga mampu mendeteksi

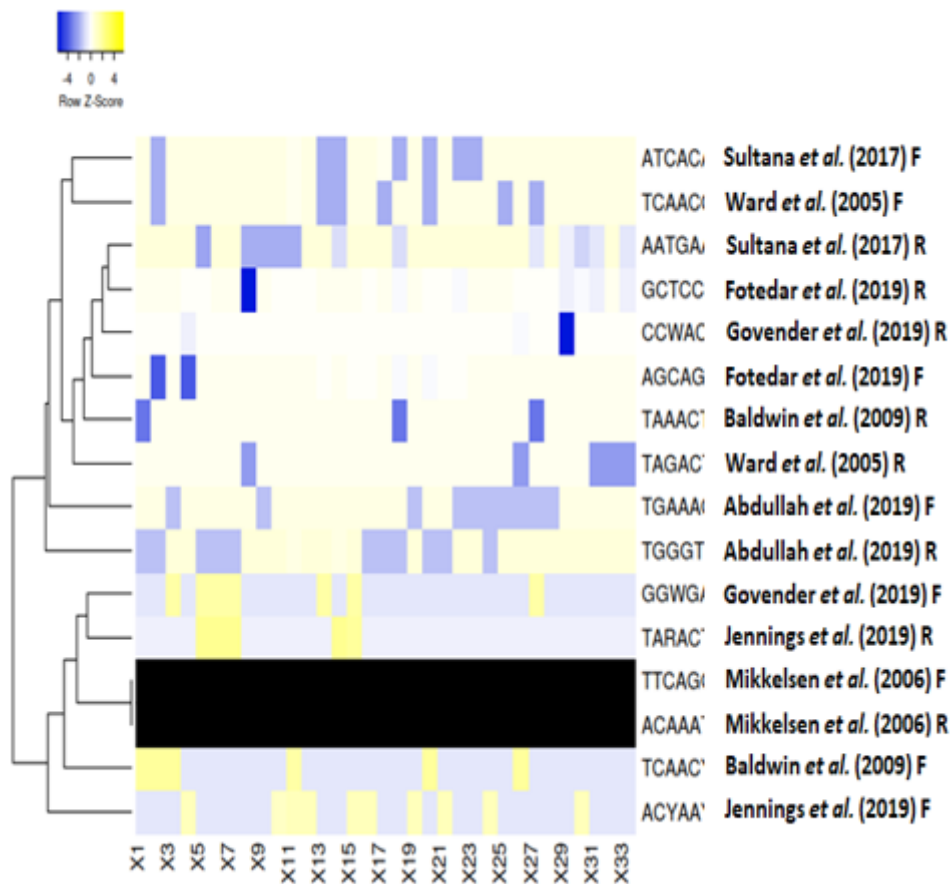


Figure 2 Analysis of primer conservation using heatmap

banyak sekuen ikan. Penyebab lainnya adalah homologi sekuen yang tinggi dan variasi sekuen yang tinggi intraspesies. Gen mitokondria COI memiliki tingkat konservasi yang tinggi dan memiliki tingkat variabilitas genetik yang sederhana di antara spesies yang berbeda-beda (Bingpeng *et al.* 2018). Hebert *et al.* (2003b) menyatakan, gen COI memiliki banyak bagian yang bersifat lestari sehingga dapat digunakan sebagai DNA *barcoding* pada sebagian besar spesies. Kelebihan dari gen ini yaitu hanya terjadi sedikit insersi atau delesi pada sekuennya.

Profil Rancangan Primer

Primer-primer yang terdapat pada *Table 2*, rata-rata memiliki tingkat spesifisitas yang kurang baik karena masih terdapat ketidaksesuaian klaim dengan hasil penjajaran dengan sekuen ikan. Hasil analisis spesifikasi atau kriteria primer dan spesifisitas primer berdasarkan *Table 1*, terdapat banyak primer yang memiliki kekurangan untuk dijadikan sebagai primer ketertelusuran ikan. Oleh

karena itu, diperlukan alternatif primer yang baik, yang sesuai dengan kriteria primer pada umumnya.

Primer dirancang dengan menggunakan perangkat lunak PerlPrimer kemudian dievaluasi dengan situs OligoEvaluator. Hasil rancangan primer beserta analisis spesifikasi berdasarkan karakteristik suhu lebur, persentase GC, struktur sekunder, primer dimer dan analisis spesifisitas dapat dilihat pada *Table 3*. Sekuen yang digunakan dalam pembuatan primer adalah sekuen dengan gen penyandi COI. Gen ini mempunyai sifat-sifat yang memenuhi persyaratan untuk menentukan identitas spesies pada hampir semua binatang tingkat tinggi. Gen COI dipilih untuk mempelajari karakteristik genetik karena sedikit mengalami delesi dan insersi pada sekuennya, serta bersifat lestari pada bagian sekuennya (Hebert *et al.* 2003a). Kriteria primer ideal untuk primer adalah primer harus sesuai dengan gen dari semua organisme yang diketahui dalam kelompok yang diminati, dan harus dapat menargetkan

Table 3 Quality characteristic of the designed primer

Genbank ID	Primer Sequence	Length (bp)	Tm (°C)	GC%	Secondary structure	Primer dimer
JF730882.1	CTAGTATTTGGTGCCTGAG	213	57.0	47.3	None	No
<i>Lagocephalus lagocephalus</i>	CAGGTGCTCCGATTATTAG		57.1	47.3	None	No
KY514079.1	CAACATAAGCTTCTGACTGC	261	57.2	45.0	None	No
<i>Takifugu vermicularis</i>	CACGAATAGAGGTGTTTGGT		58	45.0	None	No
MG816649.1	CCTTTCTCCTTCTCCTAGC	219	58.4	52.6	None	No
<i>Arothron hispidus</i>	GTTTGGTACTGAGAGATGG		56.9	47.3	None	No
HQ575830.1	TTTAGTCTTTGGTGCATGAG	212	58.2	40.0	None	No
<i>Hypanus americanus</i>	GGGCACCAATTATTAAGGG		58.0	47.3	None	No
MG837943.1	ATCTCCCAATACCAAACAC	176	58.5	50.0	None	No
<i>Isurus oxyrinchus</i>	AGATGCTGGTAGAGGATAG		58.7	50.0	None	No
MG837943.1	CCTTCTTTCCTTCTACTCTTG	225	58.2	47.6	None	No
<i>Isurus oxyrinchus</i>	GTGTTTGGTATTGGGAGAT		57.6	50.0	None	No
JN653476.1	CTTCTCCATCTTTCCTTCTG	234	58.5	47.6	None	No
<i>Katsuwonus pelamis</i>	GAGGAGTTTGGTATTGGGAG		57.3	45	None	No

gen dari organisme yang tidak diketahui di tingkat sub-taksonomi, selanjutnya pasangan primer harus memiliki suhu leleh yang seimbang dan menghasilkan amplifikasi yang kuat (Green *et al.* 2015). Perancangan atau desain primer bertujuan untuk memperoleh primer yang tepat digunakan dalam amplifikasi DNA dengan metode PCR (Diss 2003). Primer dibuat dengan menggunakan enam jenis sekuen ikan yaitu *Lagocephalus lagocephalus*, *Takifugu vermicularis*, *Arothron hispidus*, *Hypanus americanus*, *Isurus oxyrinchus* dan *Katsuwonus pelamis*. Panjang produk (ukuran ampikon) yang diinginkan berkisar antara 165-261 bp atau *mini-barcodes*.

Hasil rancangan primer yang didapatkan memiliki suhu lebur (Tm), %GC, struktur sekunder, dan primer dimer yang baik. Suhu lebur primer berdasarkan Table 3 adalah sebesar 57-59°C. Chuang *et al.* (2013) dalam penelitiannya mengatakan bahwa

pada umumnya, primer memiliki nilai Tm berkisar antara 50-62°C. Persentase GC yang didapatkan yaitu sebesar 40-55%, hasil ini sesuai dengan pernyataan Chuang *et al.* (2013) yang menyebutkan bahwa komposisi GC pada urutan nukleotida primer berkisar antara 40-60%. Primer dengan persentase GC tinggi lebih stabil jika dibandingkan dengan primer GC rendah (Mammedov *et al.* 2008).

Primer dengan kandungan GC yang rendah diperkirakan tidak dapat menempel secara efektif pada target DNA. Chuang *et al.* (2013) menyebutkan bahwa saat primer bertempelan dengan dirinya sendiri akan membentuk struktur sekunder bernama *hairpin*. Hasil pada Table 3 menunjukkan tidak ada primer dimer. Primer dimer merupakan proses saling berikatannya primer yang teramplifikasi sehingga menghasilkan data *false-positive* (Vallone dan Butler 2004). Hasil rancangan primer telah sesuai dengan

kriteria primer dan dapat mendeteksi 30-33 sekuen, sehingga rancangan primer ini dapat dijadikan alternatif untuk biomarker ketertelusuran ikan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil evaluasi primer menunjukkan bahwa tidak semua primer memiliki spesifisitas dan spesifikasi yang baik. Hasil analisis keragaman primer menunjukkan, sekuen primer pustaka terbaik yang dapat digunakan untuk ketertelusuran ikan yaitu primer CO1shark25 dan CO1shark315 yang dapat mendeteksi 31-32 sekuen ikan, namun primer ini belum memenuhi kriteria primer yang ideal. Oleh karena itu, dibutuhkan primer universal ikan dengan spesifikasi dan spesifisitas primer yang baik. Primer *mini-barcode* universal ikan dari sekuen *Lagocephalus lagocephalus*, *Takifugu vermicularis*, *Arothron hispidus*, *Hypanus americanus*, *Isurus oxyrinchus* dan *Katsuwonus pelamis* telah berhasil dirancang dan dievaluasi untuk alternatif biomarker. Primer hasil rancangan telah sesuai dengan kriteria primer yang ideal dan dapat mendeteksi 30-33 sekuen ikan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami ucapkan terima kasih kepada Program Pelaksanaan Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) dengan Judul Pendeteksi Produk Perikanan dalam Rangka Pengembangan Metode Ketertelusuran (*Traceability*) pada nomor 1/E1/KP.PTNGH/2020 dan 2575/IT3.L1/PN2020.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- Ajitama Y. 2017. Autentikasi Kerupuk Udang Dengan Metode DNA Barcoding. [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Ataman C, Çelik U, Rehbein H. 2006. Identification of some Aegean fish species by native isoelectric focussing. *European Food Research and Technology*. 222(1-2):99-104.
- Baldwin CC, Mounts JH, Smith DG, Weigt LA. 2009. Genetic identification and color descriptions of early life-history stages of Belizean *Phaeoptyx* and *Astrapogon* (Teleostei: Apogonidae) with comments on identification of adult *Phaeoptyx*. *Zootaxa*. 1-22.
- Bingpeng X, Heshan L, Zhilan Z, Chunguang W, Yanguo W, Jianjun W. 2018. DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. *PLoS ONE*. 13(6): e0198109.
- Borah P. 2009. Primer designing for PCR. *Science Vision*. 11(3):134-136.
- Chin TC, Adibah A, Hariz ZD, Azizah MS. 2016. Detection of mislabelled seafood products in Malaysia by DNA barcoding: Improving transparency in food market. *Food Control*. 64:247-256.
- Chuang LY, Cheng YH, Yang CH. 2013. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*. 35(10):1-9.
- Costa H, Mafrá I, Oliveira MBPP, Amaral JS. 2016. Encyclopedia of food and health. *RMFS*. 177-183.
- Davidovic RS, Bozovic AM, Mandusic VL, Krajnovic MM. 2014. Methylation-specific PCR: four steps in primer design. *Central European Journal of Biology*. 9(12): 1127-1139.
- Diss T. 2003. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. United Kingdom (UK): John Willey and Sons.
- Fernández A, García T, Asensio L, Rodríguez MÁ, González I, Lobo E, Hernández PE, Martín R. 2002. Identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell), *Venerupis rhomboides* (yellow carpet shell) and *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell) by ELISA. *Food and Agricultural Immunology*. 14(1): 65-71.
- Fotadar S, Lukehurst S, Jackson G, Snow M. 2019. Molecular tools for identification of shark species involved in depredation incidents in Western Australian fisheries. *PLOS ONE* 14(1): e0210500.
- Govender A, Groeneveld J, Singh S, Willows-

- Munro S. 2019. The design and testing of mini-barcode markers in marine lobsters. *PLOS ONE*. 14(1): e0210492.
- Green SJ, Venkatraman R, Naqib A. 2015. Deconstructing the polymerase chain reaction: understanding and correcting bias associated with primer degeneracies and primer-template mismatches. *PLOS ONE*. 10(5):e0128122.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. 2003a. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London*. 270: 96-99.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003b. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*. 270:313-321.
- Horstkotte B, Rehbein H. 2003. Fish species identification by means of restriction fragment length polymorphism and high-performance liquid chromatography. *Food Science*. 68(9):2658-2666.
- Jennings WB, Ruschi PA, Ferraro G, Quijada CC, Silva-Malanski ACG, Prosdicimi F, Buckup PA. 2019. Barcoding the Neotropical freshwater fish fauna using a new pair of universal COI primers with a discussion of primer dimers and M13 primer tails. *Genome*. 0:1-7.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6):1547-1549.
- Li WH, Graur D. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution Second Edition*. Dallas (USA): Sinauer.
- Lorenz TC. 2012. Polymerase Chain Reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 63(3998):1-15.
- Mammedov TG, Pienaar E, Whitney SE, TerMaat JR, Carvill G, Goliath R, Subramanian A, Viljoen HJ. 2008. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational Biology and Chemistry*. 32(6): 452-457.
- Maralit BA, Roselyn D, Aguila A, Minerva Fatimae H, Ventolero A, Sweedy Kay L, Perez A, Demian A, Willette B, Mudjekeewis D, Santos. 2013. Detection of mislabeled commercial fishery by-products in the Philippines using DNA barcodes and its implications to food traceability and safety. *Food Control*. 33:119-125
- Mikkelsen PM, Bieler R, Kappner I, Rawlings TA. 2006. Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 148:439-521.
- Minoudi S, Karaiskou N, Aygeris M, Gkagkavouzis K, Tarantili P, Triantafyllidou D. 2020. Seafood mislabeling in Greek market using DNA barcoding. *Food Control*. 113:107213.
- Mopay M, Wullur S, Kaligis E. 2017. Identifikasi molekuler sirip ikan hiu yang didapat dari pengumpul sirip di Minahasa. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. 1(2):1-7.
- 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 Conference Series: Earth and Environmental Science*. 278:1-11.
- Ozturk AR, Can T. 2017. A multiplex primer design algorithm for target amplification of continuous genomic regions. *BMC Bioinformatics*. 18(306):1-9.
- Panprommin D, Soontompravit K, Tuncharoen S, Pithakpol S, Keerelang J. 2019. DNA barcodes for the identification of species diversity in fish from Kwan Phayao, Thailand. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*. 12: 382-289.
- Parks SL, Goldman N. 2014. Maximum likelihood inference of small trees in the presence of long branches. *Systematic Biology*. 63(5):798-811.
- Spencer ET, Bruno JF. 2019. Fishy business: red snapper mislabeling along the coastline of the Southeastern United States. *Frontiers in Marine Science*. 6(513):1-7.
- Sultana S, Ali ME, Hossain MAM, Asing, Naquiah N, Zaidul ISM. 2017. Universal mini COI barcode for the identification of fish species in processed products. *Food*

- Research International*. 105:19-28.
- Sunarno, Novriani H. 2016. Desain primer PCR secara manual untuk amplifikasi gen *dtx* bakteri penyebab difteri dengan masalah homologi sekuens DNA. *The Biomedical and Basic Health Tecnology, Health Research and Development Centre*. 66(12): 544-550.
- Tamura K, Nei M, dan Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:11030-11035.
- Vallone PM, Butler JM. 2004. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*. 37(2):226-231.
- Wallace L, Boilard SMAL, Eagle SHC, Spall J. 2012. DNA Barcodes for everyday life: routine authentication of natural health products. *Food Research International*. 49(1):446-452.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 360(1462):1847-1857.
- Wen J, Zeng L, Chen Z, Zhou Y, Xu Y, Xhen D, Sun Y, Zhao J, Zhang W, Li H. 2017. Species identification of dried scallop adductor muscle (Yao Zhu) products sold on the market. *Food Control* 71:83-87.
- Wu JS, Lee C, Wu CC, Shiue YL. 2004. Primer design using genetic algorithm. *Bioinformatics*. 20(11):1710-1717.