

AUTENTIKASI PRODUK OLAHAN IKAN HIU KOMERSIAL MENGGUNAKAN TEKNIK SPECIES-SPECIFIC DNA *Mini-barcodes*

Asadatun Abdullah^{1*}, Ari Elisa Ratih¹, Shabrina Aulia¹, Puji Rianti², Tati Nurhayati¹,
Agoes Mardiono Jacob¹

¹Departemen Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University, Gedung
FPIK Lantai 3, Jalan Lingkar Kampus IPB Dramaga Kabupaten Bogor Jawa Barat Indonesia 16680

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University

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

Diterima: 20 Juli 2020/ Disetujui: 31 Agustus 2020

Cara sitasi: Abdullah A, Ratih AE, Aulia S, Rianti P, Nurhayati T, Jacob AM. 2020. Autentikasi produk olahan ikan hiu komersial menggunakan teknik *species-specific* DNA *Mini-barcodes*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 23(2): 383-391.

ABSTRAK

Pemanfaatan ikan hiu sebagai bahan baku produk olahan perikanan dapat menyebabkan berkurangnya populasi ikan hiu yang juga rentan akan kepunahan. Ikan hiu pada umumnya diperdagangkan dalam bentuk sirip, daging ikan yang diasinkan dan direbus, minyak ikan serta sebagai bahan substitusi pada pakan hewan sehingga proses identifikasi menggunakan metode berbasis morfologi dan meristik sulit dilakukan. Sebagai alternatif proses autentikasi bahan baku produk olahan ikan hiu adalah menggunakan teknik DNA *mini barcodes*. Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan mengaplikasikan primer DNA *mini barcodes* yang spesifik terhadap tiga species hiu terancam punah yang masuk dalam daftar CITES (*Sphyrna lewini*, *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis*) serta mengaplikasikan pada berbagai produk olahan ikan hiu. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi koleksi sampel produk olahan perikanan, perancangan primer spesifik, isolasi DNA, pengujian kualitas dan kuantitas DNA, amplifikasi DNA, dan sekuensing. Berbagai produk olahan komersial berhasil diamplifikasi oleh primer spesifik yaitu pada target 300 pb (*S. lewini*), 285 pb (*A. pelagicus*) dan 352 pb (*C. falciformes*). Hasil sekuensing DNA sampel menunjukkan bahwa spesies teridentifikasi adalah *S. lewini*, *A. pelagicus*, *C. falciformes* dan *Hemigaleus microstoma* dengan kemiripan 99-100%. Hal tersebut menunjukkan bahwa masih terdapatnya pemanfaatan ikan hiu yang dilindungi secara ilegal, sehingga perlu penerapan regulasi yang lebih ketat untuk melestarikan spesies-spesies hiu yang terancam kepunahannya.

Kata kunci: *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis*, CITES, DNA *mini-barcodes*, *Sphyrna lewini*

Authentication of Commercially Shark Products Using Species-Specific DNA Mini-barcodes Techniques

ABSTRACT

The use of shark for processed fishery products raw material may threat the vulnerable shark population to extinction. Sharks generally traded in the form of: fins, salted and boiled fish meat, fish oil and for animal feed, therefore, the identification process using morphology and meristic based methods are challenging. An alternative to the process of seafood labelling authentication, the DNA mini barcodes technique could be applied. This study was aimed to design and apply species-specific DNA mini barcodes primers of three endangered shark species that are included in the CITES list (*Sphyrna lewini*, *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis*) as well as applying it into various commercial processed shark products. The research methods were started with collection of processed fishery product samples, designing species-specific primers, DNA isolation, testing the quality and quantity of DNA, DNA amplification, and sequencing. Various commercial products were successfully amplified by species-specific primers, namely the target of 300 bp (*S. lewini*), 285 bp (*A. pelagicus*) and 352 bp (*C. falciformes*). The sequencing results demonstrated the identified species as *S. lewini*, *A. pelagicus*, *C. falciformes* and *Hemigaleus microstoma* with homology of 99-100%. The results showed that the illegal application of sharks, thus it is necessary to apply more stringent regulations to conserve shark species that have been threatened with extinction.

Keywords: *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis*, CITES, DNA *mini-barcodes*, *Sphyrna lewini*

Pendahuluan

Produk olahan perikanan pada umumnya dapat diperoleh di pasar komersial dalam bentuk fillet yang dibekukan, pangan siap saji, suplemen maupun aksesoris kerajinan. Ikan hiu dan pari merupakan salah satu bahan baku yang cukup banyak digunakan di Indonesia sebagai sumber protein maupun sebagai hiasan. Salah satu produk perikanan bernilai komersial sangat tinggi adalah sup sirip ikan hiu. Sup dari sirip ikan hiu ini menjadi salah satu makanan *seafood* khas Asia Timur yang paling mahal (Wallace *et al.* 2012). Selain sebagai bahan baku sup sirip, ikan hiu juga dikomersialkan menjadi suplemen minyak ikan yang berasal dari organ hatinya yang memiliki kandungan vitamin A dan vitamin D (Hardiningsih *et al.* 2017). Banyaknya hasil produk olahan ikan hiu dapat menyebabkan ikan hiu menjadi satwa yang rentan akan kepunahan.

Ikan hiu memiliki ciri pertumbuhan kematangan reproduksi yang lambat, dengan periode kehamilan yang relatif lama (9–10 bulan) serta memiliki fekunditas yang rendah. Hal tersebut membuat populasinya rentan pada penangkapan ikan yang berlebihan (*overfishing*). Ancaman akan punahnya beberapa spesies hiu saat ini sudah mulai terjadi dan akan mengakibatkan populasinya menurun dalam habitatnya. Data hiu dan pari yang didaratkan secara global pada tahun 2003 menurun sebanyak 20%, hal tersebut disebabkan karena adanya penurunan populasinya. Sebanyak 1038 spesies hiu dan pari yang termasuk termasuk dalam daftar *International Union Conservation of Nature (IUCN) red list*, terdapat 20 spesies yang dikategorikan sebagai *Critically Endangered (CR)*, 45 spesies dikategorikan *Endangered (EN)*, dan 116 spesies dikategorikan *Vulnerable (VU)*, 127 spesies dikategorikan *Near Threatened (NT)* dan sisanya sebanyak 258 spesies berkategori *Least Concern (LC)* dan 472 spesies dikategorikan *Data Deficient (DD)* (Bräutigam *et al.* 2015). Pada saat ini terdapat delapan spesies ikan hiu yang masuk pada list data Apendiks II CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species*). Delapan spesies ikan hiu yang terancam punah tersebut yaitu hiu paus (*Rhincodon*

typus), hiu basking (*Cetorhinus maximus*), hiu putih (*Carcharodon carcharias*), hiu koboi (*Carcharhinus longimanus*), hiu martil (*Sphyrna lewini*), hiu martil halus (*Sphyrna zygaena*), hiu martil besar (*Sphyrna mokarran*) dan hiu porbeagle (*Lamna nasus*) (Fields *et al.* 2015). Peraturan izin ekspor perlu ditegakkan agar dapat teridentifikasi produk perikanan yang menggunakan spesies hiu dilindungi yang diperdagangkan secara global (Hellberg *et al.* 2019). Spesies hiu yang termasuk ke dalam data Apendiks II CITES saat dilakukan perdagangan internasional, perlu mengikuti peraturan yang ditetapkan oleh CITES, yaitu mengenai keberlanjutan (*sustainability*), keterlacakan (*traceability*) dan legalitas (KKP 2015). Ikan hiu perlu dibedakan lebih rinci agar dapat dibedakan antar spesiesnya. Hal tersebut dapat diketahui dengan cara mengidentifikasi jenis hiu yang digunakan dalam suatu produk.

Identifikasi jenis spesies hiu dapat dilakukan secara taksonomi oleh pakar taksonomi menggunakan indikator morfologi jika tampilan produk masih seperti seluruh tubuhnya. Kekurangan pengujian dari hal tersebut perlu pelatihan ekstensif dan adanya kemiripan tampilan spesies yang memiliki resiko kesalahan dalam penentuan spesies (Marshall dan Barone 2016). Masalah tersebut dapat diatasi dengan mengidentifikasi spesies ikan hiu menggunakan autentikasi berbasis biomolekuler menggunakan basa nukleotida atau *Deoxyribonucleic Acid (DNA)* yaitu DNA *barcodes*. Metode ini didasarkan pada penggunaan alat *Polymerase Chain Reaction (PCR)* untuk mengamplifikasi DNA universal atau spesifik pada suatu spesies (Hellberg *et al.* 2019). Metode analisis DNA *barcodes* merupakan metode untuk mengidentifikasi spesies dengan penggunaan urutan nukleotida sekuensingnya yang menunjukkan tingkat variasi yang cukup untuk membedakan antar spesies (Hartvig *et al.* 2015). Teknik ini memiliki kekurangan karena DNA *full length* dapat terdegradasi dan terfragmentasi pada proses olahan ekstensif (Shokralla *et al.* 2015). Sebagai metode alternatif untuk deteksi DNA spesies dalam produk yang sudah mengalami proses pengolahan dan berpotensi terdegradasi

DNA-nya yaitu dengan teknik DNA *mini barcodes*.

Teknik DNA *mini barcodes* memfokuskan untuk menganalisis fragmen-fragmen DNA yang lebih pendek, yaitu pada 100-200 pb dalam DNA *full length* yang sama. Teknik ini terbukti efektif untuk memperoleh informasi mengenai urutan DNA dari spesimen produk olahan yang DNANYA telah terdegradasi. Informasi pengurutan gen fragmen yang memiliki *barcode* kecil (≥ 100 pb) dapat memberikan informasi bagi identifikasi spesies dan memiliki keberhasilan lebih dari 90% (Shokralla *et al.* 2015). Penelitian lain mengenai teknik DNA *mini barcodes* untuk ketelusuran label pangan berbagai produk olahan ikan sidat mendapatkan keberhasilan identifikasi kemiripan untuk spesies *Anguilla bicolor bicolor* sebesar 99–100% dan *Anguilla marmorata* sebesar 100% (Abdullah *et al.* 2018) serta untuk ketelusuran label pangan berbagai produk ikan layur berhasil teridentifikasi sebagai *Trichiurus* sp. dan *T. lepturus* dengan tingkat kemiripan 91–100% (Abdullah *et al.* 2018). Abdullah *et al.* (2020) juga menggunakan DNA *mini barcode* untuk mengidentifikasi hiu yang diperdagangkan di pasar lokal Indonesia dengan sebagian besar sampel teridentifikasi sebagai *Carcharhinus falciformis*.

Penelitian menggunakan teknik DNA *mini barcodes* serta merancang primer spesies spesifik pada tiga species terdaftar CITES yang paling banyak didaratkan di Indonesia belum banyak dilakukan. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian mengenai autentikasi pada beberapa produk olahan ikan hiu menggunakan teknik DNA *mini barcodes* agar dapat dirancang dan diaplikasikan primer spesifiknya. Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan mengaplikasikan primer DNA *mini barcodes* yang spesifik terhadap tiga species hiu terancam punah yang masuk dalam daftar CITES (*Sphyrna lewini*, *Alopias pelagicus*, *Carcharhinus falciformis*) serta mengaplikasikan pada berbagai produk olahan ikan hiu.

Bahan dan Metode

Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan adalah

berbagai produk olahan yang diduga mengandung bahan baku ikan hiu. Sampel tersebut yaitu dua filet cucut beku dari pasar modern dan tradisional di Bogor yang berbeda (Fa dan Fb), hiu asin (HA), hiu rebus (HR) dan gulai ikan hiu. Sampel lainnya merupakan hasil dari proses sampling di dua lokasi yaitu wilayah Aceh dan Nusa Tenggara Barat. Bahan lain yang digunakan meliputi KIT isolasi DNA (QIAGEN DNeasy Blood & Tissue dan DNeasy Food and Mericon), KIT PCR (KAPA Taq PCR KITS, KapaBiosystems, Wilmington, AS), ddH₂O, primer spesifik *Sphyrna lewini*, *Alopias pelagicus* dan *Carcharhinus falciformis*, primer universal DNA barcoding FishF1R1 (Ward *et al.* 2005), marker 100 pb *plus DNA ladder* (VIVANTIS, Selangor Darul Ehsan, Malaysia), *cybergeen*, agarosa (SeaKem®LE Agarose, Lonza, Rockland, ME USA), *buffer* TBE (AccuGENETM 10X TBE Buffer, Lonza, Rockland, ME AS), EDTA 0.05% dan Na₂CO₃ 0,2%.

Alat yang digunakan meliputi kantung dialisis (12 kDa), *microtubes* TUBE-150-C (*Extragen*, Taichung, Taiwan) dan *tube* PCR-02-C (Axygen, California, AS), pipet tips RC-10/20-L dan RC-250/20-C (Mettler Toledo, Bekasi, Indonesia), kantung *dialysis* 12 kDa, 4 *micropipette* 1-10 μ L, dan 20-200 μ L (*ThermoFisher Scientific*, Vantaa, Finlandia), *freezer*, *waterbath sonicator* (BANDELIN *electronic*, Berlin, Jerman), *vortex* (V1-Plus, Biosan, Warren, AS), *spin down* (Corning, New York, USA), mikrosentrifugasi (*Centurion Scientific* 2041, Libertyville, AS), *microwave* (Sharp, Osaka, Jepang), timbangan digital (PHW 254, ADAM®, Inggris), PCR (*Applied Biosystem GeneAmp PCR System 9700*, *ThermoFisher Scientific*, Vantaa, Finlandia), *UV-Transilluminator* (Uvitec, Cambridge, Inggris), elektroforesis horizontal (HU6, SCIE-PLAS, Cambridge, Inggris), *power supply* (Peqlab, Erlangen, Jerman), dan nanodrop (*Thermo Scientific*, Vantaa, Jerman).

Metode Penelitian

Penelitian terbagi menjadi beberapa tahapan. Tahapan tersebut yaitu preparasi sampel, desain primer spesifik ikan hiu *S. lewini*, *A. pelagicus*, *C. falciformis*, isolasi DNA untuk mendapatkan isolat DNA guna analisis

kemurnian dan konsentrasinya, amplifikasi DNA menggunakan PCR, elektroforesis serta dilakukan tahap sekuensing. Hasil sekuen yang telah didapat dari masing-masing sampel dianalisis datanya menggunakan analisis bioinformatika.

Isolasi DNA sampel olahan

Sampel hiu dilindungi diisolasi dengan mengikuti prosedur kit komersial sesuai dengan jenis sampel. Isolasi DNA sampel produk olahan komersial ikan hiu dilakukan dengan menggunakan kit komersial Qiagen Dneasy Food Mericon untuk sampel yang telah mengalami pengolahan dan TiaNamp Genomic DNA kit untuk sampel yang ikan segar atau beku. Isolasi dengan Qiagen Dneasy Food Mericon kit menggunakan sampel sebanyak 0,2 g yang telah dihaluskan, sedangkan untuk sampel segar sebanyak 0,025 g.

Amplifikasi DNA *barcoding*

Amplifikasi DNA pada ruas gen COI dilakukan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Komponen-komponen yang digunakan pada proses PCR antara lain templat DNA, sepasang primer, ddH₂O, *master mix* yang terdiri dari dNTP, buffer PCR, MgCl₂, dan enzim polimerase. Master mix PCR dibuat dengan volume total 25 µL yang terdiri dari 2 µL template DNA, 8.5 µL *nucleas free water*, 1 µL *primer forward*, 1 µL *primer reverse*, dan 12.5 µL Taq polymerase. Kondisi suhu PCR pada sampel isolat menggunakan primer universal FishF1R1 pada tahap *pre denaturation* yaitu pada suhu 95°C selama 3 menit, tahap *denaturation* 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 54°C selama 30 detik, *extension* pada 72°C selama 30 detik, dilanjutkan dengan *final extension* pada 72°C selama 5 menit (Ward *et al.* 2005). Primer-primer spesifik yang digunakan menggunakan kondisi PCR yang sama dengan primer FishF1R1 dengan perbedaan yaitu pada suhu *annealing* yang digunakan adalah 60°C.

Analisis Data

Analisis bioinformatika dilakukan untuk menginterpretasikan data yang diperoleh. Analisis bioinformatika dilakukan

menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.* 1990) agar mendapat kemiripan spesies berdasarkan kemiripan urutan basa-basa nukleotida. Perbandingan urutan basa-basa nukleotida dibandingkan dengan basis data *nucleotide references* yang berasal dari GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Penyejajaran sekuensing dilakukan untuk menentukan jarak genetik dan hubungan kekerabatan sampel yang dikonstruksi dengan pohon filogenetik menggunakan piranti lunak ClustalW yang terintegrasi pada *software* MEGA 5 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*). Jarak genetik dihitung menggunakan metode *pairwise distance* dan rancangan pohon filogenetik (1.000 kali ulangan) dan metode *neighbor-joining tree bootstrap* model *Kimura Two parameter* (Kimura 1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi dan Kemurnian Isolat DNA Sampel

Analisis secara kuantitatif pada isolat DNA sampel agar dapat ditentukan kualitasnya berdasarkan konsentrasi dan kemurniannya. Kemurnian isolat DNA sampel diketahui dengan mempertimbangkan rasio absorbansi $\lambda_{260} / \lambda_{280}$. Hasil analisis kuantitatif isolat DNA dapat dilihat pada *Table 1*.

Nilai konsentrasi isolat DNA tertinggi terdapat pada sampel hiu rebus (HR) yaitu 108.4 ng/µL dan konsentrasi terkecil terdapat pada sampel daging hiu *S. lewini* (SL) dengan nilai 8.9 ng/µL. Nilai konsentrasi DNA bergantung pada tahap proses isolasi DNA yaitu saat pemecahan sel untuk mengeluarkan DNA. Proses pengolahan produk berupa pemanasan dan penambahan bumbu-bumbu dapat memberi efek terjadinya degradasi DNA saat proses pengolahan. Konsentrasi dari sampel HA yang tidak terlalu tinggi dapat disebabkan adanya efek dari proses penggaraman dan pengeringan ikan yang bertujuan mengawetkan produk makanan. Konsentrasi dari sampel Fa, Fb dan SL yang rendah dapat disebabkan oleh jenis kit isolasi DNA yang digunakan maupun kesalahn teknis pada saat proses isolasi. Tagliavia *et al.* (2016) menambahkan bahwa analisis DNA

Table 1 DNA Concentration of Shark's seafood products

Samples	DNA Concentration (ng/ μ L)	DNA Purity (A260/A280)
F1	12.6	2.01
F2	21.6	1.96
HA	12.1	1.22
HR	108.4	1.69
SL	8.9	1.95
A	26.8	1.81
SL1	41.1	1.82
SL2	41.5	1.87
AP4	11.75	1.70
CF3	13.35	2.09
B	76.70	1.91

Note: F1= fillet A, F2= fillet B, HA= Salted fish, HR= Boiled fish,
SL= *S. Lewini*, CF = *Carcharinus falciformis*; B = *Fish Gulai*

dari produk olahan laut, dapat mengalami degradasi DNA dan adanya inhibitor akibat proses pengolahan produk makanan berupa senyawa fenol maupun polisakarida. Hasil isolat DNA dengan konsentrasi dan kemurnian yang rendah, dapat mempengaruhi proses selanjutnya yaitu amplifikasi dengan PCR.

Hasil kemurnian DNA dari keseluruhan sampel menunjukkan kisaran dari 1,22 hingga 2,01. Sampel isolat DNA pada hiu asin (HA) dan hiu rebus (HR) memiliki kemurnian DNA berturut-turut 1,22 dan 1,69. Hasil tersebut menunjukkan adanya kontaminan pada isolat DNA berupa protein dan polisakarida sehingga relatif kurang murni. Proses kontaminasi dapat terjadi akibat teknik memipet yang kurang sempurna sehingga pengotor masih terbawa. Tagliavia *et al.* (2016) menambahkan bahwa pemurnian isolat DNA diperlukan karena beberapa bahan kimia yang digunakan pada langkah isolasi DNA dapat menghambat proses amplifikasi dan akan mempengaruhi ukuran ampikon.

Kemurnian DNA dinilai baik jika berada pada rentang 1.8 – 2.0 pada rasio absorbansi $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ (Sambrook dan Russel 2001). Nilai rasio absorbansi $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ yang berada <1.8 menandakan terdapatnya kontaminan berupa protein dan polisakarida. Nilai rasio absorbansi $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ yang berada >2.0 menandakan masih terdapatnya kontaminan berupa RNA (Khosravinia *et al.* 2007).

Amplikon DNA Produk Olahan Perikanan

Proses amplifikasi pada penelitian ini menggunakan dua jenis primer, yaitu primer universal dan primer spesifik terhadap tiga species ikan hiu terdaftar CITES. Hasil visualisasi dari produk PCR spesifik (amplifikasi sampel) dapat dilihat pada *Figure 1*.

Figure 1 (a) menunjukkan hanya sampel HR dan SL saja yang berhasil teramplifikasi, yaitu pada rentang 500 – 700 pb sedangkan sampel F1, F2 dan HA tidak berhasil teramplifikasi. *Figure 1*(b) elektroforegram sampel SL, HR dan HA telah sesuai dengan gen target pada primer spesifik *S. lewini* yaitu 279 pb yang berada dibawah 500 pb. Sampel lainnya yaitu F1 dan F2 pada gambar elektroforegram tidak teramplifikasi pada target yang ditentukan. Shokralla *et al.* (2015) menambahkan bahwa penyebab kegagalan penggunaan primer *full length barcode* ialah DNA sampel telah terdegradasi dari saat proses pengolahan yang menggunakan tahapan proses ekstensif dan berbagai macam tambahan bahan aditif sehingga mempersulit DNA untuk dilakukan isolasi. Shokralla *et al.* (2015) menambahkan bahwa DNA yang telah terdegradasi akan menghambat proses amplifikasi.

Penyebab kegagalan amplifikasi lainnya adalah keberadaan primer dimer yang merupakan proses penempelan primer menempel pada primer lainnya yang dianggap sebagai *template* saat proses amplifikasi (Sasmito *et al.* 2014). Popa *et al.* (2007) menambahkan bahwa hasil amplifikasi yang tidak spesifik akan menyebabkan terbentuknya primer dimer yang mendakan kurangnya keberhasilan dalam reaksi. Kurangnya keberhasilan dari amplifikasi ini karena masih terbawanya kontaminan berupa protein atau sel lain yang berasal dari isolat DNA.

Figure 1 (c) dan (d) menunjukkan panjang amplicon untuk sampel AP berada pada rentang 200-300 bp, sedangkan sampel CF berada pada rentang antara 300-400 bp. Hasil tersebut telah sesuai dengan panjang amplicon untuk primer spesifik *mini barcode* masing-masing hiu *A. pelagicus* dan *C. falciformis* yaitu 285 bp dan 352 bp. Hasil produk PCR dengan primer spesifik *mini*

barcode pada kontrol negatif AP dan CF tidak menunjukkan adanya pita DNA dengan panjang target yang diinginkan. Hal ini menunjukkan bahwa sepasang primer yang digunakan spesifik hanya mengamplifikasi jenis hiu *C. falciformis*. Hasil elektroferogram kontrol negatif primer untuk semua primer spesifik tidak menunjukkan adanya pita DNA target. Berdasarkan hasil yang didapatkan maka disimpulkan bahwa pita yang ditunjukkan elektrogram AP dan CF dengan panjang sesuai target tersebut menunjukkan pasangan primer yang digunakan spesifik dan menempel tepat pada posisi nukleotida yang diinginkan.

Keberhasilan proses PCR tergantung pada primer dan kondisi PCR yang digunakan. Keberhasilan proses PCR juga dipengaruhi oleh proses ekstraksi yang dilakukan. Damayanti (2014) menyebutkan bahwa kegagalan amplifikasi dapat disebabkan karena ketidakstabilan kualitas maupun kuantitas DNA template. Pemilihan dan

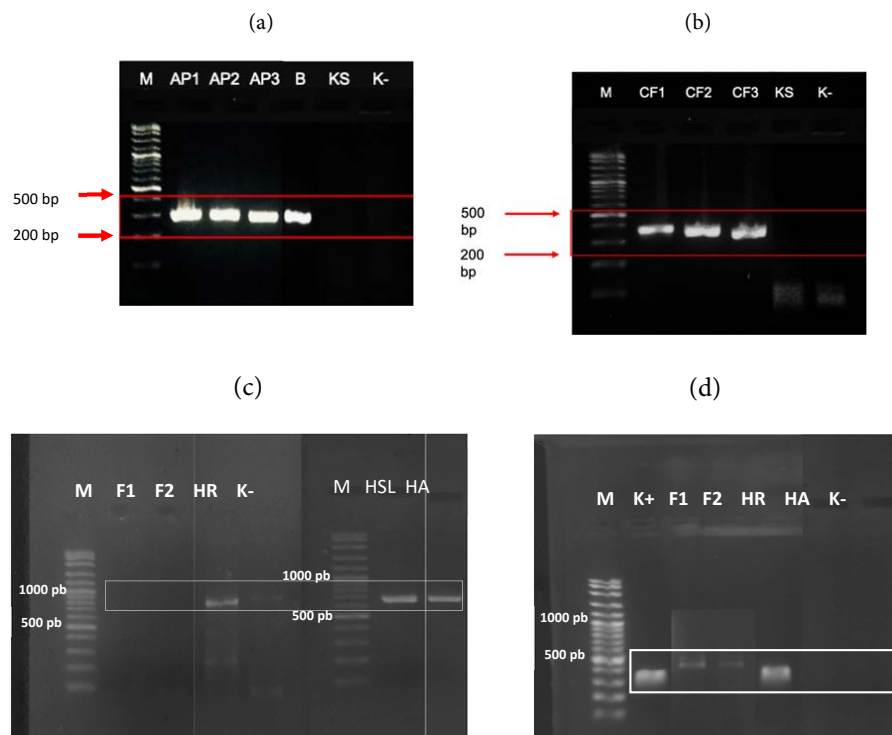


Figure 1 PCR products electropherogram: (a) universal DNA barcoding primer results, (b) *Sphyrna lewini*'s species specific primer, (c) *Alopias pelagicus*'s species specific primer, (d) *Carcharinus falciformis*'s species specific primer. Note: M=marker, F1: frozen fillet A, F2: frozen fillet B, HSL: *S. lewini*: HA: Salted fish, HR: Boiled fish meat, AP 1-3: *Alopias pelagicus* with triplicate replication, CF: *Carcharinus falciformis* with triplicate replication; K-: negative control. KS: H *Hemigaleus microstoma* as an outgroup.

Table 2 Species identification results by BLAST dan BOLD

Sample's Code	Species ID	Homology	E value	Access code
BLAST NCBI				
HR	<i>Sphyrna lewini</i>	99%	0.0	JX827259.1
SL	<i>Sphyrna lewini</i>	98%	0.0	JX827259.1
HA	<i>Hemigaleus microstoma</i>	99%	0.0	NC0229400.1
CF3	<i>Carcharhinus falciformis</i>	100%	5e-140	MT357187.1
AP4	<i>Alopias pelagicus</i>	100%	3e-106	KF020876.1
B	<i>Alopias pelagicus</i>	100%	8e-107	KF020876.1
BOLD Systems				
HR	<i>Sphyrna lewini</i>	100%	-	KP719756
SL	<i>Sphyrna lewini</i>	99.83%	-	KP719760
HA	<i>Hemigaleus microstoma</i>	99.62%	-	EU398811
CF3	<i>Carcharhinus falciformis</i>	100%	-	GBGC19796-19
AP4	<i>Alopias pelagicus</i>	100%	-	GBGC10637-13
B	<i>Alopias pelagicus</i>	100%	-	GBGC10637-13

komposisi primer yang tidak tepat juga dapat menyebabkan kegagalan amplifikasi sehingga terbentuk primer dimer atau struktur sekunder lain yang tidak diinginkan. Primer dimer ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA pada bagian dasar sumur sampel gel agarose (Lorenz *et al.* 2012). Primer dimer dapat disebabkan karena tingginya konsentrasi primer yang digunakan. Kondisi PCR terutama proses annealing menjadi salah satu tahap yang menentukan keberhasilan proses PCR, sehingga optimasi suhu *annealing* sangat diperlukan. Suhu *annealing* ditentukan berdasarkan nilai suhu leleh melalui proses optimasi. Nilai T_m antara sepasang primer dihitung berdasarkan rata-rata suhu leleh primer *reverse* dan primer *forward*.

Bioinformatika Sekuen DNA Sampel

Pita DNA dari produk PCR yang berhasil dilihat visualisasinya menggunakan gel elektroforesis kemudian dibuktikan dengan proses sekuensing. Sampel yang dilakukan sekuensing yaitu sampel hiu rebus (HR) dan sampel hiu *S. lewini* (SL) dan sampel hiu asin (HA) yang pada tahap PCR didapat pita DNA yang baik dan tidak terdapat dimer atau smear. Hasil sekuens yang diterima dibandingkan dengan data spesies pada GenBank di NCBI

dengan menggunakan BLAST dan *Barcoding of Life Data* (BOLD) *System* kemudian diperoleh tingkat identitasnya. Hasil identifikasi spesies dapat dilihat pada *Table 2*.

Table 2 menunjukkan hasil analisis bioinformatika dengan menggunakan BLAST dan *Barcoding of Life Data* (BOLD) *System*. BOLD merupakan *database* terbesar untuk identifikasi spesies ikan dari gen COI. Korelasi persamaan antara BLAST dan BOLD yang memiliki GenBank *database* untuk gen fragment COI yaitu 99% hingga 100%. Hasil analisis sekuensing menunjukkan bahwa sampel hiu asin (HA) teridentifikasi sebagai *sicklefin weasel shark* yang memiliki nama ilmiah *Hemigaleus microstoma* dengan kemiripan sebesar 99% dari BLAST NCBI dan 99.62% dari BOLD *Systems*. Sampel hiu rebus (HR) dan sampel hiu *S. lewini* Lombok (SL), spesifik pada jenis ikan hiu martil dengan nama ilmiah *Sphyrna lewini*. Tingkat kemiripan dari sampel hiu rebus didapat sebesar 99% dari BLAST NCBI dan 100% dari BOLD *Systems*. Hasil autentikasi yang menunjukkan spesies hiu martil (*Sphyrna lewini*) termasuk dalam daftar IUCN *red list* yang terancam punah (*endangered*).

Sampel hiu *S. lewini* Lombok (SL) memiliki tingkat kemiripan sebesar 98% dari

BLAST NCBI dan 99,83% dari BOLD Systems. Sampel CF berdasarkan hasil analisis BLAST maupun BOLD sistem teridentifikasi sebagai *Carcharhinus falciformis* dengan tingkat kemiripan 100%, sedangkan sampel AP dan B teridentifikasi sebagai *Alopias pelagicus* dengan tingkat kemiripan 100%. Berdasarkan hasil tingkat kemiripan dari masing-masing sampel yang disequencing maka dapat disimpulkan bahwa semua sampel SL, AP, dan CF yang digunakan dalam penelitian merupakan spesies hiu *Sphyrna lewini*, *Alopias pelagicus*, dan *Carcharhinus falciformis*. Hasil sequensing juga menunjukkan bahwa primer *mini barcode* yang telah dirancang mampu mengamplifikasi sampel secara spesifik. Tingkat kemiripan merupakan persentase kesamaan suatu sekuen dengan data yang tersedia di bank data. Persentase tingkat kemiripan sekuen dengan repository apabila mencapai 97-100% dikatakan signifikan, 92% hingga 96% dikatakan cukup dan lebih kecil dari 91% dikatakan tidak signifikan (Bhattacharjee *et al.* 2012).

Nilai *Expect value* (E. value) pada seluruh sampel yang diidentifikasi yaitu sebesar 0. Drancourt *et al.* (2000) menyatakan bahwa tingkat kemiripan yang berada pada nilai lebih dari 99% menunjukkan kecocokan antar perbandingan antar spesies, tingkat kemiripan lebih dari 97 % menunjukkan kecocokan perbandingan antar genus dan tingkat kemiripan pada rentang 89–93% menunjukkan perbedaan kecocokan antar famili. Hasil *E-value* bernilai 0 memiliki perbandingan spesies identik. Claveire dan Notredame (2007) menyatakan bahwa nilai E.value merupakan ukuran nilai kecocokan yang terjadi antara sekuens dengan *database* pada GenBank.

KESIMPULAN

Penggunaan primer spesifik *mini barcodes* memiliki hasil yang baik pada sampel produk olahan yang diduga merupakan daging ikan hiu. Hasil sequensing produk PCR dengan seluruh primer *mini barcode* yang telah dirancang mampu mengamplifikasi secara spesifik dan telah sesuai dengan rancangan *in silico*. Hasil identifikasi dari beberapa produk hiu menunjukkan spesies tersebut termasuk

dalam daftar IUCN *red list* yang terancam punah (*endangered*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian RISTEK-BRIN untuk pembiayaan penelitian ini melalui hibah Penelitian Terapan (PT) T.A 2020 dengan nomor kontrak 1/AMD/E1.KP.PTNBH/2020. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada tim WCS Indonesia yang sudah membantu menyediakan sampel produk olahan hiu.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah A, Nurilmala M, Muttaqin E, Yulianto I. 2020. DNA-based analysis of shark products sold on the Indonesian market toward seafood labelling accuracy program. *Biodiversitas*. 21(4): 1385-1390.
- Abdullah A, Nurilmala M, Sari AS, Jacoeb AM. 2018. *Mini-COI barcodes* sebagai penanda molekuler untuk ketertelusuran label pangan berbagai produk olahan ikan sidat. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(2): 377 – 384.
- Abdullah A, Nurilmala M, Sitaresmi KP. 2018. DNA *mini-barcodes* sebagai penanda molekuler untuk ketertelusuran label pangan berbagai produk ikan layur. *JPHPI*. 22(1): 33 – 40.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) “Basic local alignment search tool.” *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Bhattacharjee MJ, Laskar BA, Dhar B, Ghosh SK. 2012. Identification and re-evolution of freshwater catfishes through DNA barcoding. *Plos One*. 7: 1-7.
- Bräutigam A, Callow M, Campbell IR, Camhi MD, Cornish AS, Dulvy NK, Fordham SV, Fowler SL, Hood AR, McClennen C, Reuter EL, Sant G, Simpfendorfer CA, Welch DJ. 2015. *Global Priorities for Conserving Sharks and Rays: A 2015–2025 Strategy*. San Jose (CR): Copa.
- Claveire JM, Notredame C. 2007. *Bioinformatics for Dummies 2nd Edition*. Indianapolis (US): Wiley Publishing.
- Damayanti IAM, Junitha IK, Suaskara IBM. 2014. Variasi genetik soroh brahmana budha di Bali berdasarkan penanda DNA

- mikrosatelit kromosom-Y. *Jurnal Biologi*. 18(2): 46-51.
- Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 2000. 16s Ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolats. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(10): 3623-3630.
- Fields AT, Abercrombie DL, Eng R, Feldheim K, Chapman DD. 2015. A novel mini-dna barcoding assay to identify processed fins from internationally protected shark species. *Plos One*. 10(2): 1 – 10.
- Hardiningsih W, Purwadi H, Latifah E. 2017. Dampak ketiadaan pengaturan kuota ekspor hiu tikus (*Alopias* sp.) di Indonesia. *Padjajaran Journal of Law*. 4(3): 588 – 605.
- Hartvig I, Czako M, Kjær ED, Nielsen LR, Theilade I. 2015. The use of DNA barcoding in identification and conservation of rosewood (*Dalbergia* spp.). *Plos One*. 10(9): 1-24.
- Hellberg RS, Isaacs RB, Hernandez EL. 2019. Identification of shark species in commercial products using DNA barcoding. *Journal Fisheries Research*. 210(1): 81 – 88.
- Khosravinia H, Murthy HNN, Parasad DT, Pirany M. 2007. Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. *African Journal of Biotechnology*. 6(4): 481-486.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16(2):111- 120.
- [KKP] Kementrian Kelautan dan Perikanan. 2015. *Pedoman Identifikasi dan Pendataan Hiu Apendiks II CITES*. Jakarta: Kementrian Kelautan dan Perikanan.
- Lorenz TC. 2012. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 63(5): 1-15.
- Marshall LJ, Barone M. 2016. *SharkFin Guide: Identifying Sharks from Their Fins*. Roma (IT): FAO.
- Popa OP, Murariu D, Popa LO. 2007. Comparison of four DNA extraction methods from invasive freshwater bivalve species in Romanian Fauna. *Gigore Entipa*. 50(6): 527-539.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 3rd Edition. New York (USA): Cold Spring Harbor.
- Sasmito DEK, Kurniawan R, Muhimmah I. 2014. Karakteristik primer pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk sekuensing DNA: *mini review*. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)*. 5(1): 93-102.
- Shokralla S, Hellberg RS, Handy SR, King I, Hajibabei M. 2015. A DNA mini-bar coding system for authentication of processed fish products. *Science Reports*. 5(1): 1 – 11.
- Tagliavia M, Nicosia A, Salamone M, Biondo G, Bennici CD, Mazzola S, Cuttitta A. 2016. Development of a fast DNA extraction method for sea food and marine species identification. *Food Chemistry*. 203(3): 375–378.
- Wallace LJ, Boilard SMAL, Eagle SHC, Spall JL, Shokralla S, HAjibabei M. 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 PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*. 360(1): 1847-1857.