



## PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

### **AUTENTIKASI ANEKA PRODUK TERIPANG DENGAN TEKNIK *FORENSICALLY IDENTIFIED NUCLEOTIDE SEQUENCING (FINS)***

#### **BIDANG KEGIATAN: PKM ARTIKEL ILMIAH (PKM-AI)**

Diusulkan oleh:

Fathu Rahman Hadi	C34051668	(2005)
Fitriany Podungge	C34070033	(2007)
Fadillah	C34070063	(2007)

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2011**

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



## BIODATA KETUA SERTA ANGGOTA

### 1. Ketua pelaksana kegiatan

### 2. Anggota pelaksana kegiatan

### 3. Anggota pelaksana kegiatan



## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Kegiatan : Autentikasi Aneka Produk Teripang dengan Teknik *Forensically Identified Nucleotide Sequencing* (FINS)
2. Bidang Kegiatan : (√) PK-AI ( ) PK-GT  
(Pilih salah satu)
3. Bidang Ilmu : Pertanian
4. Ketua Pelaksana Kegiatan

5. Anggota Pelaksana : 2 orang
6. Dosen Pendamping

Bogor, 7 Maret 2011

Menyetujui  
Ketua Departemen  
Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB

Ketua Pelaksana Kegiatan

(Dr. Ir. Ruddy Suwandi, MS. M. Phil)  
NIP. 19580511 198503 1 002

(Fathu Rahman Hadi)  
NRP. C34051668

Wakil Rektor  
Bidang Akademik dan Kemahasiswaan

Dosen Pendamping

(Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, MS.)  
NIP. 19581228 198503 1 003

(Asadatun Abdullah, S.Pi., M.Si.)  
)  
NIP. 19830405 200501 2 001



## SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Fathu Rahman Hadi  
NRP : C34051668  
Departemen : Teknologi Hasil Perairan  
Fakultas : Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas : Institut Pertanian Bogor

menyatakan bahwa karya ilmiah yang berjudul “Autentikasi Aneka Produk Teripang dengan Teknik *Forensically Identified Nucleotide Sequencing* (FINS)” yang diikuti dalam kegiatan PKM Artikel Ilmiah mengacu pada hasil PKMP tahun 2009/ 2010 yang telah diselesaikan dalam waktu empat bulan.

Bogor, 7 Maret 2011

Menyetujui  
Ketua Departemen  
Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB

Ketua Pelaksana Kegiatan

(Dr. Ir. Ruddy Suwandi, MS. M. Phil)  
NIP. 19580511 198503 1 002

(Fathu Rahman Hadi)  
NRP. C34051668

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



## AUTENTIKASI ANEKA PRODUK TERIPANG DENGAN TEKNIK FORENSICALLY IDENTIFIED NUCLEOTIDE SEQUENCING (FINS)

Fathu Rahman Hadi, Fitriany Podumgge, Fadillah  
Departemen Teknologi Hasil Perairan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

### ABSTRAK

*Sea cucumbers are a seafood product, which have high commercial value, can be targeted trade practice is increasingly widespread fraud occurred at this time. Identification DNA-based method with Forensically Identified nucleotide sequencing (FINS) techniques can be a solution for authenticating the species used in products of sea cucumbers. The research aims to develop FINS techniques for authenticating sea cucumber products is done in three stages: extraction of DNA, DNA amplification (PCR) and phylogenetic analysis. The concentration of the extracted DNA is low, amounting to 8-28 µg/ml to amplify DNA fragments sized 570 bp from samples of black teat fish with primary partner and 16Sbr 16Sar. Samples of amplified identified as Holothuria nobilis with the level of similarity reaches 91%. The phylogenetic analysis showed that the sample was 0.05760 intraspecific distance and has the closest kinship with Holothuria nobilis derived from the database. Bootstrap value of 91% is owned by the sample indicates the strong presence of these samples on an existing phylogenetic tree so that it can be said to have distinctive characteristics and different from other species.*

*Keywords: sea cucumber product, economic fraud, identification technique, 16S rRNA gene, PCR-FINS*

Teripang yang merupakan produk seafood yang bernilai komersial tinggi dapat menjadi sasaran praktek penipuan perdagangan yang semakin marak terjadi saat ini. Metode identifikasi berbasis DNA dengan teknik Forensically Identified Nucleotide Sequencing (FINS) dapat menjadi solusi untuk mengautentikasi spesies yang digunakan pada produk teripang. Penelitian yang bertujuan untuk mengembangkan teknik FINS untuk mengautentikasi produk teripang ini dilakukan dalam tiga tahapan, yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi DNA (PCR) dan analisis filogenetik. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi yang rendah, yaitu sebesar 8-28 µg/ml dapat mengamplifikasi potongan DNA berukuran 570 bp dari sampel teripang susu kering dengan pasangan primer 16Sar dan 16Sbr. Sampel yang teramplifikasi teridentifikasi sebagai *Holothuria nobilis* dengan tingkat kesamaan mencapai 91%. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa jarak intraspesifik sampel adalah 0,05760 dan memiliki kekerabatan terdekat dengan *Holothuria nobilis* yang berasal dari database. Nilai bootstrap sebesar 91% yang dimiliki oleh sampel menandakan kuatnya keberadaan sampel tersebut pada pohon filogenetik yang ada sehingga dapat dikatakan memiliki karakteristik yang khas dan berbeda dengan spesies lainnya.

*Kata kunci: produk teripang, penipuan perdagangan, teknik identifikasi, gen 16S rRNA, PCR-FINS*



## PENDAHULUAN

Mentimun laut atau dikenal juga dengan nama 'beche-de-mer' atau teripang adalah salah satu produk seafood yang umum dikonsumsi di Asia. Teripang bermanfaat sebagai obat tradisional, *delicacies* dan *aphrodisiacs*, karena memiliki kandungan gizi yang tinggi sebagai makanan berprotein tinggi, rendah lemak, *asam amino profile* dan kaya akan *trace element* (mikro nutrien). Indonesia telah mengekspor teripang pada tahun 1999 dengan jumlah produksi sebanyak 2,617 ton. Produksi teripang terus meningkat setiap tahunnya dan pada tahun 2007 telah mencapai 4,273 ton [1].

Nilai komersial teripang diklasifikasikan menjadi 3, yaitu tinggi, sedang dan rendah. Nilai tersebut ditentukan berdasarkan tipe spesies, kelimpahan, penampilan, aroma, warna, ketebalan kulit/dinding tubuh dan yang utama adalah permintaan pasar. Teripang kering diperoleh dengan harga yang berbeda sesuai dengan nilai komersialnya [2].

Kasus penipuan perdagangan semakin banyak terjadi saat ini terutama dalam pelabelan produk. Penipuan ini dilakukan dengan cara mengganti spesies yang digunakan dalam produk dengan spesies lain yang mirip dengan harga yang lebih murah atau menggunakan produk imitasinya [3]. Oleh karena itu, perlu dikembangkan metode autentikasi spesies dalam menelusuri dan mendeteksi penipuan perdagangan secara cepat.

Autentikasi suatu spesies pada awalnya hanya berdasarkan pada ciri fisik yang terlihat secara kasat mata saja. Akan tetapi sulit untuk membedakan produk teripang yang telah mengalami proses pengolahan setelah ditangkap karena karakteristik fisik teripang telah berubah. Metode identifikasi suatu spesies kemudian berkembang berdasarkan kandungan bahan kimia yang dimiliki setiap spesies, seperti protein, dan nukleotida (DNA) [4]. Metode identifikasi berbasis DNA merupakan teknik yang paling baik untuk mengetahui informasi suatu spesies [5] serta lebih cepat dan handal [6].

Autentikasi spesies dapat dilakukan setelah DNA yang diinginkan diamplifikasi melalui proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*). DNA yang telah melalui proses PCR dapat digunakan dalam identifikasi spesies dengan teknik RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphisms*), FINS (*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*), *real time* PCR dan RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) [7,8].

FINS (*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*) merupakan metode autentikasi yang memanfaatkan DNA dengan teknik PCR yang diikuti dengan analisis filogenetik. Teknik FINS merupakan alat yang sangat berguna untuk autentikasi dan identifikasi spesies. Selain itu, teknik ini juga berguna untuk mengetahui spesies dan menelusuri bahan baku aslinya untuk mencegah terjadinya penipuan perdagangan serta melindungi spesies yang dilindungi [9]. Pengembangan teknik FINS dalam perdagangan teripang perlu dilakukan untuk pendeteksian cepat terjadinya penipuan. Penggunaan teknik FINS diharapkan dapat mencegah terjadinya penipuan dalam perdagangan teripang secara cepat dan akurat dengan biaya yang relatif murah dibandingkan dengan teknik berbasis DNA lainnya dan teknik identifikasi berbasis protein.

Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan optimasi teknik FINS dalam autentikasi aneka produk teripang, serta mengetahui keaslian produk dari sampel yang digunakan.

## METODOLOGI

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Februari sampai Mei 2010. Bertempat di Laboratorium Bahan Baku Hasil Perairan Departemen Teknologi Hasil Perairan dan Laboratorium Genetika Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu, serta Laboratorium Penyakit Hewan Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel produk teripang kering (teripang pasir, teripang susu, teripang cicak dan teripang gamat), jelly gamat dan kerupuk teripang. Sampel teripang kering dan jelly gamat diperoleh dari daerah pertokoan di Jakarta sedangkan sampel kerupuk teripang diperoleh dari pertokoan di daerah Surabaya. Bahan untuk proses ekstraksi DNA sampel adalah *Forensic DNA extraction kit* (Vivantis) yang terdiri dari buffer STL, OB protease, 1M Dithiothreitol (DTT), buffer BL, etanol absolut, isopropanol, equilibration buffer, HB buffer, DNA wash buffer dan elution buffer. Bahan-bahan lain yang digunakan untuk amplifikasi DNA target (PCR) adalah pasangan primer 16Sar: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' dan 16Sbr: 5'-CTCCGGTTTGA ACTCA GATCA-3' [10] dengan konsentrasi 0,1-1,0  $\mu$ M, *PCR master mix* yang terdiri dari 2X DreamTaq Green buffer™, dNTPs dan MgCl<sub>2</sub> (Fermentas) dan *nuclease free water*. Bahan untuk proses elektroforesis adalah buffer TBE 1X, gel agarosa (Fermentas), 100 bp *DNA ladder* (Vivantis), 6x loading dye dan ethidium bromida (Fermentas). Bahan yang digunakan untuk analisis FINS adalah bahan yang digunakan untuk proses sekuensi dengan metode Sanger [11], yaitu 10x *Genetic Analyzer Running Buffer*, EDTA dan akuades.

Alat-alat yang digunakan terdiri dari alat untuk preparasi sampel aneka produk teripang adalah gunting, *cutter*, pinset, *scalpel*, mortar, termos dan tabung eppendorf 1,5 ml. Alat yang digunakan dalam proses ekstraksi DNA sampel adalah *waterbath shaker*, sentrifuga dan pipet mikro. Proses amplifikasi DNA target (PCR) dilakukan dengan menggunakan *Applied Biosystem GeneAmp PCR System 9700* (96-well aluminum sample block module). Sedangkan untuk proses elektroforesis dilakukan dengan *Bio Rad Mini-Sub® Cell GT Cell* (elektroda platinum), *ECX Compact Transilluminators* (*Vielber Lourmart*) untuk visualisasi dan kamera digital untuk mendokumentasikan hasil yang diperoleh, pipet mikro, *microwave*, timbangan digital (sensitifitas hingga 1 mg) dan gelas ukur. Pengukuran konsentrasi DNA sampel menggunakan *GeneQuant analyzer* (Applied Biosystem). Analisis DNA barcoding dilakukan menggunakan *Applied Biosystem 3730xl Automatic Sequencer* (96-kapiler) dan piranti lunak *Clustal W2* dan *TreeView*

## Pelaksanaan Penelitian

Prosedur kerja yang dilakukan dalam penelitian ini hasil modifikasi [10] yang terdiri dari tiga tahap, yaitu (a) ekstraksi DNA, (b) amplifikasi DNA (PCR) dan (c) analisis FINS.

### *Ekstraksi DNA*

Sampel berbagai jenis produk olahan teripang diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologinya. Selanjutnya dipreparasi untuk proses ekstraksi DNA menggunakan *Forensic DNA extraction kit* (Vivantis). Proses ekstraksi dilakukan dengan mengikuti petunjuk penggunaan yang terdapat dalam kemasan kit tersebut. Sampel DNA yang diperoleh kemudian divisualisasi dengan elektroforesis dalam gel agarosa 1% yang mengandung 10 µg/ml ethidium bromida pada 200 V selama 30 menit untuk melihat kualitasnya, lalu diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer dan disimpan pada suhu -20 °C agar tidak rusak.

### *Amplifikasi DNA (PCR)*

Amplifikasi DNA berbasis PCR dilakukan dengan menjadikan gen 16S yang ada pada DNA mitokondria sebagai target. Primer yang digunakan adalah pasangan primer 16Sar: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' dan 16Sbr: 5'-CTCCGTTTGAAGCTCAGATCA-3' untuk menghasilkan fragmen dengan ukuran 570 bp [10]. Reaksi amplifikasi PCR dilakukan dalam volume total reaksi 25 µL dengan komposisi: 2 µL ekstrak DNA (10 pg–1 µg), 3 µL pasangan primer (primer 16Sar dan 16Sbr), 12,5 µL *PCR master mix* (Fermentas) dan 7,5 µL *nuclease free water*. PCR dilakukan dalam GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystem*) dengan kondisi amplifikasi sebagai berikut: denaturasi awal (*preheating*) pada suhu 95°C; 5 menit, diikuti sebanyak 40 siklus (denaturasi 95°C; 30 detik, *annealing* 60°C; 30 detik dan ekstensi 72°C; 30 detik) dan langkah ekstensi akhir 72°C; 10 menit. Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis dalam gel agarosa 1% yang mengandung 10 µg/ml ethidium bromida pada 200 V selama 30 menit, lalu divisualisasi menggunakan UV-vis. Panjang fragmen ditentukan dengan membandingkannya pada 100 bp *DNA ladder* (Vivantis).

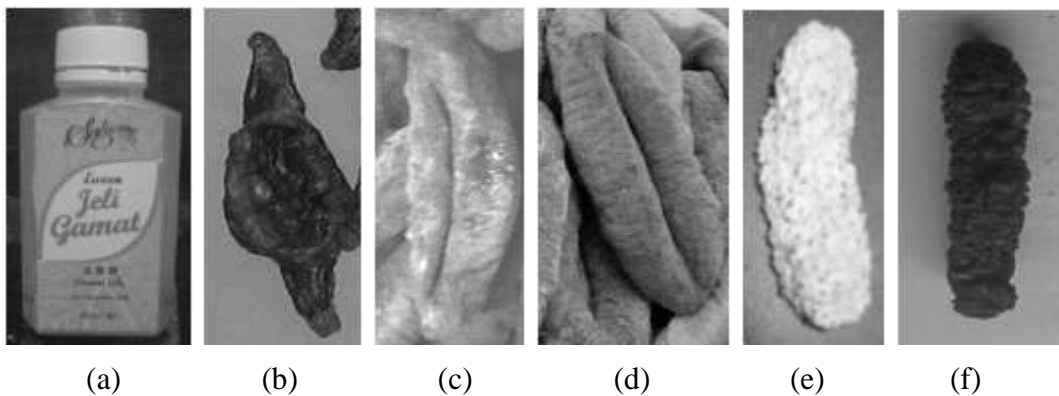
### *Analisis FINS*

Analisis FINS dilakukan dengan mengidentifikasi spesies dengan analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang diakses dari NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) dan dilanjutkan dengan analisis filogenetik. Analisis BLAST menunjukkan tingkat kesamaan hasil penjajaran nukleotida dari sampel dengan *database* di GeneBank, sedangkan analisis filogenetik menunjukkan tingkat kesamaan dan kedekatan sampel dengan spesies lain yang memiliki kekerabatan yang dekat. Pohon filogeni dibuat dengan menjajarkan terlebih dahulu urutan nukleotida menggunakan piranti lunak Clustal W2, lalu dihitung jarak genetik dari setiap sampel dan pembuatan pohon filogeni dengan metode pengkelasan *Neighbour-joining* (NJ) [12]. Analisis filogenetik kemudian ditampilkan menggunakan piranti lunak *TreeView*.



## HASIL DAN PEMBAHASAN

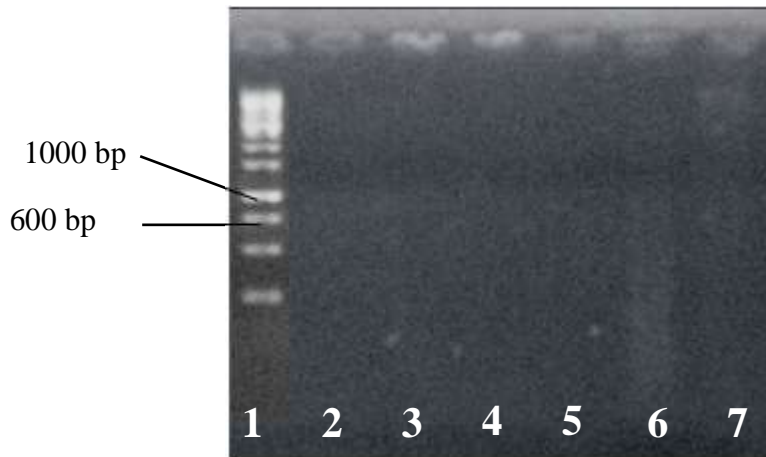
Karakteristik morfologi dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis spesies teripang yang digunakan dalam suatu produk. Pada sampel yang digunakan dalam penelitian ini, proses identifikasi spesies teripang kering masih dapat dilakukan dengan melihat ciri morfologinya. Akan tetapi, terdapat kesulitan dalam mengidentifikasi produk teripang kering karena memiliki morfologi yang mirip akibat proses pengolahan. Hal ini dikarenakan proses pengolahan yang mengubah karakteristik fisik teripang. Sedangkan proses identifikasi spesies secara morfologi pada produk jelly gamat tidak dapat dilakukan karena produk tersebut tidak berbentuk teripang utuh. Gambar aneka produk teripang yang dijadikan sampel dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Aneka produk teripang yang dijadikan sebagai sampel  
 Keterangan : (a) jelly gamat (b) kerupuk teripang (c) teripang pasir;  
 (d) teripang susu (e) teripang gamat (f) teripang cicak;

### Isolasi DNA

Hasil proses isolasi DNA terhadap sampel produk teripang yang digunakan tidak memperlihatkan *smear* DNA yang jelas. *Smear* yang tipis hanya terlihat pada sampel teripang cicak kering dan teripang gamat kering. Pada sampel teripang cicak kering *smear* terlihat hampir di sepanjang jalur yang dilewatinya, sedangkan pada sampel teripang gamat kering *smear* yang cukup tebal terlihat pada ukuran lebih dari 1 kbp. *Smear* yang terlihat pada elektroforegram merupakan gambaran dari keberadaan DNA yang berhasil diekstraksi. Tidak terlihatnya *smear* pada sebagian besar sampel diduga disebabkan oleh rendahnya konsentrasi DNA hasil ekstraksi, karena jumlah DNA yang dapat tervisualisasi dengan pewarnaan ethidium bromida harus lebih dari 2 ng pada pita ukuran tertentu dengan lebar 0,5 cm [13]. Hasil ekstraksi DNA sampel produk teripang selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Elektroforegram DNA sampel hasil ekstraksi

Keterangan : 1 = Marker                      2 = Jelly Gamat                      3= Kerupuk Teripang  
 4 = T. Pasir Kering                      5 = T. Susu Kering                      6 = T. Cicak Kering  
 7 = T. Gamat Kering

Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian dengan spektrofotometer membuktikan bahwa konsentrasi DNA hasil ekstraksi yang diperoleh sangat kecil, yaitu berkisar antara 4-80 µg/ml dengan tingkat kemurnian berkisar antara 37-81%. Hasil spektrofotometri ekstrak DNA produk teripang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil spektrofotometri DNA genom produk teripang

Sampel	Abs. 260nm	Rasio	[DNA] (µg/ml)	Protein (mg/ml)	Kemurnian (%)
Jelly Gamat	0.017	0.668	4	0.0	37
Kerupuk Teripang	0.066	1.298	44	0.0	72
T. Pasir Kering	0.012	1.090	16	0.0	60
T. Susu Kering	0.024	1.046	8	0.0	58
T. Cicak Kering	0.058	1.403	80	0.0	77
T. Gamat Kering	0.036	1.473	28	0.0	81

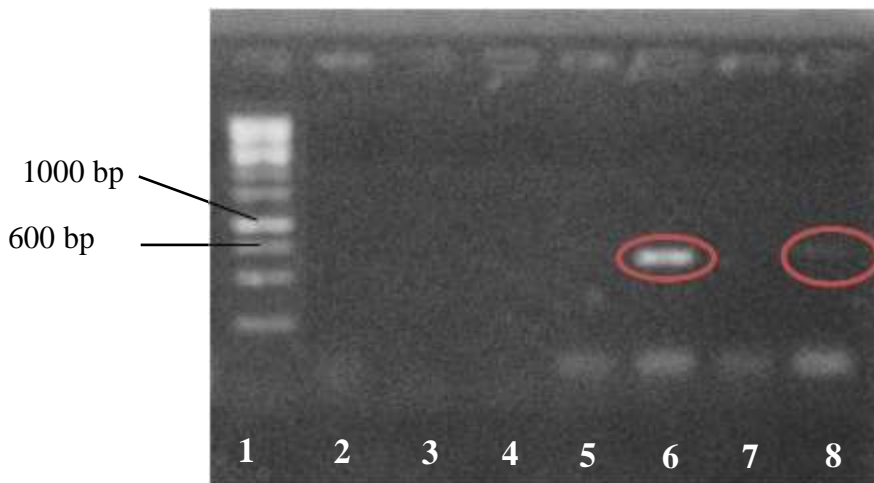
Hasil spektrofotometri DNA genom produk teripang pada Tabel 1 menunjukkan bahwa produk teripang kering dan kerupuk teripang memiliki nilai konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan produk jelly gamat. Hal ini disebabkan jumlah DNA yang terekstrak dari sampel teripang kering lebih banyak karena produk ini hanya mengalami sedikit proses pengolahan. Produk jelly gamat memiliki jumlah DNA yang sangat sedikit karena produk ini merupakan hasil ekstrak dari daging teripang dan telah mengalami berbagai proses pengolahan yang dapat merusak banyak DNA dalam tubuh teripang, serta diberi bahan-bahan tambahan lainnya. Banyaknya jumlah bahan tambahan yang digunakan pada produk jelly gamat dapat diketahui dari nilai kemurniannya yang rendah, yaitu 37%, sedangkan pada produk teripang kering dan kerupuk teripang memiliki kemurnian yang lebih tinggi, yaitu diatas 55%.

Rendahnya konsentrasi dari ekstrak DNA juga dapat disebabkan ketidakkampuan kit ekstraksi yang digunakan untuk mengekstraksi DNA sampel

yang digunakan. Sampel teripang kering merupakan bahan baku yang banyak mengandung jaringan ikat serta memiliki tekstur yang padat dan keras yang diakibatkan oleh proses pengolahan yang dilakukan, seperti pengeringan dan perebusan. Hal tersebut dapat menghambat penetrasi larutan yang bertugas untuk melisis membran sel dan pada akhirnya akan mengurangi jumlah DNA yang diperoleh. Penambahan proses penghancuran jaringan dengan nitrogen cair dapat menjadi solusi untuk mengatasi masalah tersebut. Pada sampel kerupuk teripang, penyebab rendahnya konsentrasi DNA yang diperoleh diduga disebabkan oleh sedikitnya jumlah sel yang tidak rusak akibat proses pengolahan yang dilakukan, seperti pengeringan, penggaraman, dan penggorengan. Proses ekstraksi sangat menentukan keberhasilan proses berikutnya. Hal ini dikarenakan ekstrak DNA dengan kualitas yang baik akan meningkatkan tingkat keberhasilan amplifikasi PCR dan *subsequent DNA sequencing* [14].

### Amplifikasi DNA

DNA yang telah diekstraksi dari sampel kemudian diamplifikasi menggunakan teknik PCR untuk menghasilkan potongan DNA yang dijadikan target. Hasil amplifikasi DNA dengan pasangan primer 16S dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Elektroforegram hasil PCR DNA teripang  
 Keterangan : 1 = Marker                      2 = Kontrol negatif (-) 3= Kerupuk teripang  
 4 = T. Cicak Kering 5 = T. Gamat Kering      6 = T. Susu Kering  
 7 = T. Pasir Kering    8 = Jelly gamat

Hasil elektroforesis pada Gambar 2 memperlihatkan hanya 1 dari 6 sampel yang dapat teramplifikasi dengan baik menggunakan primer 16Sar dan 16Sbr, yaitu sampel teripang susu kering, serta terlihat pita tipis pada sampel jelly gamat dengan ukuran 570 bp. Ketebalan pita pada produk PCR dapat dijadikan sebagai penduga konsentrasi DNA yang teramplifikasi dan kesesuaian kondisi PCR. Pita DNA yang tebal dan terang dapat menunjukkan produk teripang tersebut memiliki konsentrasi DNA target yang lebih tinggi dibandingkan pita yang tipis dan redup. Tebalnya pita DNA hasil PCR pada sampel teripang susu kering menunjukkan



bahwa kondisi PCR yang optimal telah tercapai, sehingga proses PCR dapat berlangsung dengan baik.

Keberhasilan proses PCR dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi DNA sampel, kondisi amplifikasi, serta adanya inhibitor pada hasil ekstrak DNA. Rendahnya konsentrasi DNA yang diperoleh dan adanya inhibitor diduga menjadi penyebab hanya satu dari enam sampel, yaitu teripang susu kering, yang teramplifikasi dengan baik. Hal ini didasari oleh pengulangan proses PCR yang telah dilakukan dengan suhu yang berbeda tidak diperoleh adanya pita DNA. Inhibitor yang menghambat proses PCR dapat berupa polisakarida, *humic acid*, dan banyaknya partikel dari sampel yang tidak terbuang pada proses ekstraksi. Selain itu, molekul DNA yang terdegradasi dan pelarut organik (seperti *heksane*) dapat menjadi inhibitor proses PCR [15].

### Analisis FINS

DNA yang telah teramplifikasi dengan sempurna kemudian dilakukan penentuan urutan nukleotida untuk dapat mengetahui spesies pada DNA yang teramplifikasi dari sampel. Penentuan spesies dengan analisis BLAST menunjukkan bahwa DNA yang telah teramplifikasi dari sampel produk teripang susu kering berasal dari spesies *Holothuria nobilis* dengan tingkat kesamaan sebesar 91% untuk *database* dengan nomor akses EU822441.1. Spesies yang teridentifikasi merupakan spesies teripang susu sesuai dengan label yang dicantumkan. Spesies yang dikenal sebagai teripang susu berasal dari spesies *Holothuria nobilis* (teripang susu putih) dan *Holothuria fuscogilva* (teripang susu hitam).

Tingkat kesamaan yang relatif kecil tersebut dikarenakan *database* hasil penentuan urutan nukleotida dari gen 16S *rRNA* spesies teripang yang terdapat pada NCBI masih sangat sedikit, bahkan untuk spesies *Holothuria nobilis* hanya terdapat 1 *database*. Oleh karena itu, diperlukan banyak penelitian mengenai penentuan urutan nukleotida untuk menambah *database*, serta mengetahui tingkat keragaman genetik dari setiap spesies teripang.

Kemampuan teknik FINS untuk membedakan spesies dapat juga dilihat dengan analisis filogenetik yang dilakukan untuk menunjukkan kedekatan spesies sampel dengan spesies lainnya. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa jarak genetik antara urutan gen 16S *rRNA* yang diperoleh menunjukkan bahwa jarak intraspesifik sampel adalah 0,05760 dan masuk dalam kelompok genus *holothuria* dan memiliki kekerabatan terdekat dengan *Holothuria nobilis* yang berasal dari *database*. Selain itu, sampel juga memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Holothuria whitmaei* dan *Holothuria Fuscogilva*, kedua spesies tersebut memiliki nama umum yang serupa dengan *Holothuria nobilis*, yaitu *teatfish*.

Perhitungan nilai *bootstrap* pada pohon filogenetik yang lebih dari 80% menunjukkan tingkat kesamaan spesies yang tinggi dengan *database* yang ada. Nilai *bootstrap* sebesar 91% yang dimiliki oleh sampel menandakan kuatnya keberadaan sampel tersebut pada pohon filogenetik yang ada sehingga dapat dikatakan memiliki karakteristik yang khas dan berbeda dengan spesies lainnya. Hasil analisis filogenetik yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 4.



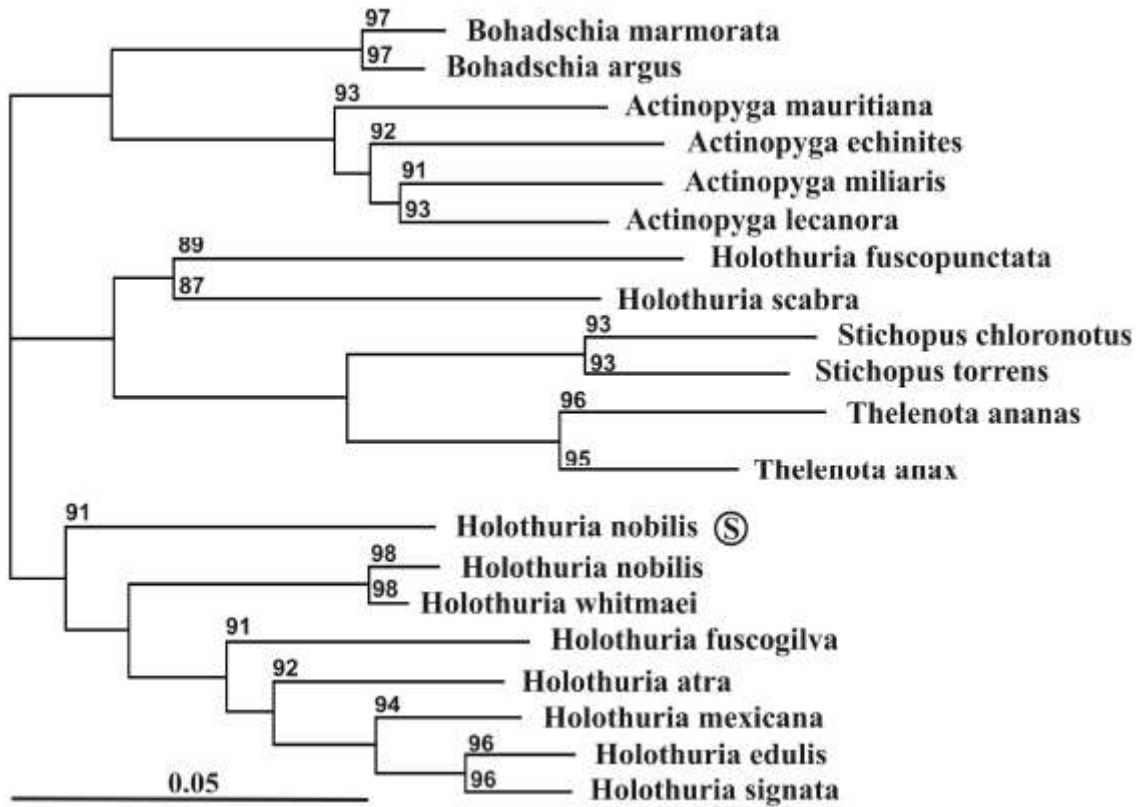
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:  
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.  
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University



Gambar 4. Hasil analisis filogenetik produk teripang hasil penjajaran nukleotida dengan primer 16S

Tingginya kemampuan untuk mengidentifikasi spesies dengan analisis filogenetik ini membuktikan bahwa teknik *DNA barcoding* sangat bermanfaat untuk digunakan dalam pencegahan penipuan dalam perdagangan teripang. Teknik FINS dapat dilakukan dalam waktu yang relatif cepat karena hanya membutuhkan waktu sekitar 2 hari kerja (9). Kemampuan metode ini untuk mengidentifikasi suatu spesies dengan cepat dan akurat menjadikan metode identifikasi ini sangat berharga dan penting untuk digunakan untuk autentikasi produk komersial secara rutin.

### KESIMPULAN

Autentikasi spesies yang digunakan dalam produk teripang dapat dilakukan dengan teknik FINS. Teknik ini dapat dilakukan dengan menggunakan pasangan primer 16Sar dan 16Sbr dengan kondisi amplifikasi berupa denaturasi awal (*preheating*) pada suhu 95°C; 5 menit, diikuti sebanyak 40 siklus (denaturasi 95°C; 30 detik, *annealing* 60°C; 30 detik dan ekstensi 72°C; 30 detik) dan langkah ekstensi akhir 72°C; 10 menit untuk menghasilkan DNA target berukuran 570 bp. Spesies yang teridentifikasi pada sampel teripang susu kering adalah *Holothuria nobilis* sesuai dengan yang dicantumkan pada label dengan tingkat kesamaan mencapai 91%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian (PKMP) tahun 2010.

## DAFTAR PUSTAKA

- (1) [DKP] Departemen Kelautan dan Perikanan. *Indonesian Fisheries Statistics Index 2009*. Jakarta: DKP; 2009.
- (2) Lo, TH. Valuation of sea cucumber attributes through laddering. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*. 2005;20:34–37.
- (3) Jacquet JL, Pauly D. Trade secrets: Renaming and mislabelling of seafood. *Mar. Policy*. 2008;32(3):309-318.
- (4) Schwagele F. Traceability from a European perspective. *Meat Sci*. 2005;71(1):164-173.
- (5) Lockley AK, Bardsley RG. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*. 2000;11(2):67-77
- (6) Comi G, Iacumin L, Rantsiou K, Cantoni C, Cocolin L. Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds. *Food Control* 2005;16(1):37-42.
- (7) Teletchea F, Maudet C, Hanni C. Food and forensic molecular identification : update and challenges. *Trends in Biotech*. 2005;23(7):359-366.
- (8) Martinez I, Yman IM. Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Research Int'l*, 1998;31(67):459-466.
- (9) Espineira M, N Gonzalez-Lavin , JM Vieites, FJ Santaclara. Development of a method for the identification of scombroid and common substitute species in seafood products by FINS. *Food Chemistry*. 2009;117(4):698-704.
- (10) Wen J, Hu C, Zhang L, Luo P, Zhao Z, Fan S, Su T. The application of PCR-RFLP and FINS for species identification used in sea cucumber (*Aspidochirotida: Stichopodidae*) products from the market. *Food Control* 2010;21(4):403–407
- (11) Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol*. 1975;94(3):441-446
- (12) Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol*. 1987;4(4):406–425
- (13) Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning : a Laboratory Manual -- 3rd ed*. New York : Cold Spring Harbor. 2,344 p
- (14) Sahajpal V, Goyal SP. Identification of a forensic case using microscopy and Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS) : A case study of small Indian civet (*Viverricula indica*). *Science and Justice* 2009;50:94-97
- (15) Pinto AD, Forte VT, Guastadisegni MC, Martino C, Schena FP, Tantillo G. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*. 2007;18(1):76–80