

JURNAL PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

(Dahulu Bernama Buletin Teknologi Hasil Perikanan)

Autentikasi Tuna <i>Steak</i> Komersial dengan Metode <i>PCR-Sequencing</i>	Asadatun Abdullah, Nurjanah, Nanang Kurnia	1-7
Pemanfaatan Limbah Cangkang Kerang Simping (<i>Amusium pleuronectes</i>) dalam Pembuatan <i>Cookies</i> Kaya Kalsium	Tri Winarni Agustini, A.Suhaeli Fahmi, Ita Widowati, Agus Sarwono	8-13
Tingkat Penggunaan Bahan Kimia Berbahaya pada Pengolahan Ikan Asin: Kasus di Muara Angke dan Cilincing, Jakarta	Ernik Yuliana, Deddy Ahmad Suhardi, Adhi Susilo	14-21
Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif pada Keong Ipong-ipong (<i>Fasciolaria salmo</i>)	Nurjanah, Asadatun Abdullah, Azwin Apriandi	22-29
Pemanfaatan Konsentrat Protein Ikan Patin (<i>Pangasius hypophthalmus</i>) untuk Pembuatan Makanan Jajanan	Dewita, Syahrul, Isnaini	30-34
Energi Listrik dari Sedimen Laut Teluk Jakarta melalui Teknologi <i>Microbial Fuel Cell</i>	Bambang Riyanto, Nisa Rachmania Mubarik, Fitriani Idham	35-42
Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Biji Teratai (<i>Nymphaea pubescens</i> Willd) Akibat Pemanasan	Yuspihana Fitriani	43-48
Peranan Inhibitor Katepsin dari Ikan Patin (<i>Pangasius hypophthalmus</i>) untuk Menghambat Kemunduran Mutu Ikan Bandeng (<i>Chanos chanos</i> Forskal)	Tati Nurhayati, Ella Salamah, Komariah Tampubolon, Ary Apriland	49-55
Sistem Penyediaan dan Pengendalian Kualitas Produk Ikan Segar di <i>Hypermarket</i>	Tri Wiji Nurani, Julia Eka Astarini, Marina Nareswari Astarini	56-62
Komposisi Kimia dan Kandungan Pigmen <i>Spirulina Fusiformis</i> pada Umur Panen yang Berbeda dalam Media Pupuk	Iriani Setyaningsih, Andika Tri Saputra, Uju	63-69



JURNAL PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA

Ketua Redaksi : Nurjanah (Ketua)

Jewan Redaksi : Nurjanah
Tati Nurhayati
Komari
Joko Santoso
Linawati Hardjito
Wini Trilaksani
Evy Damayanti
Hari Eko Irianto
Artati
Sukoso
Iwan Yusuf
Tri Winarni
Eddy Afrianto
Singgih Wibowo

Penyunting Pelaksana : Roni Nugraha

**Administrasi dan
Sekretariat** : Husnul Fitriah

Sirkulasi : Pipih Suptijah

Alamat Redaksi:

Departemen Teknologi Hasil Perairan, FPIK
1. Lingkar Akademik Kampus IPB
Dramaga Bogor 16680

Telp. (0251) 8622915 Fax. (0251) 8622916

E-mail: jurnalpengolahan@yahoo.com

Dipublikasikan oleh Masyarakat Pengolahan Hasil
Perikanan Indonesia (MPHPI)

Terbit 3 (tiga) kali dalam setahun

Tarifa (belum termasuk ongkos kirim)

Abonnement untuk satu tahun Rp. 150.000

Keanggotaan/eksemplar Rp. 50.000

Bank

Bank BNI Syariah Kantor Cabang Bogor
No Rek. 0200804594 a.n Nurjanah

Editorial

Menteri Pendidikan Nasional pada tanggal 6 Juni 2011 telah menetapkan Permendiknas No 22 Tahun 2011 tentang Terbitan Berkala Ilmiah. Peraturan ini menghapus Permendiknas No 67 Tahun 2009 dan mengubah komponen penilaian. Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia melakukan beberapa perubahan untuk menyesuaikan dengan permendiknas yang baru. Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia akan terbit 3 edisi untuk 1 volume dengan format dua kolom. Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia saat ini sedang dalam tahap pengajuan akreditasi dan diharapkan mampu melewati proses evaluasi dengan sukses.

Masyarakat Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia (MPHPI), bekerjasama dengan Departemen Teknologi Hasil Perairan – Institut Pertanian Bogor dan Kementerian Kelautan Perikanan (BBRP2B dan Ditjen P2HP) akan mengadakan Pertemuan Ilmiah Tahunan ke-3 dan Seminar Nasional Tahun 2011. Kegiatan ini akan dilaksanakan pada tanggal 6-7 Oktober 2011 di Bogor. Masyarakat Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia dan Departemen Teknologi Hasil Perairan memberikan kesempatan kepada peneliti, praktisi, mahasiswa, penentu kebijakan, dan organisasi non pemerintah untuk bertukar ilmu pengetahuan dan teknologi yang dimiliki pada seminar tersebut. Naskah yang dipresentasikan dan hasil diskusi akan dipublikasikan dalam prosiding dan jurnal.

KEPENGURUSAN MASYARAKAT PENGOLAHAN HASIL PERIKANAN INDONESIA (MPHPI) 2009-2013

Pelindung : Menteri Kelautan dan Perikanan Indonesia

Pembina : Dirjen P2HP, Es-I Mendiknas, Es-I Menperindag

Pengarah : Dir. Usaha & Investasi, Dir. PH, Ditjen P2HP

Sekretaris Pengarah: Prof. Hari Eko Irianto

Ketua Umum: Prof. Dr. Hari Eko Irianto

Ketua I: Prof. Dr. Sukoso

Ketua II: Ir. Adi Surya

Sekretaris: Dr. Joko Santoso

Sekretaris II: Drs. Made W. Arthajaya, MSi

Bendahara I: Dr. Ir. Nurjanah, MS

Bendahara II: Dewi Mufita

Departemen Industri: Dr. Bustami Ibrahim, Ir. Nur Retnowati, Ir. M. Najib

Dept. Pendidikan: Dr. Eddy Afrianto, Dr. Amir Husni, Dr. Tri Winarni

Agustini, Ir. Wini Trilaksani, MSc

Dept. Litbang: Dr. Singgih Wibowo, MS, Dr. Hartati Kartikaningsih, Fatur

Rohman, Dr. Aef Permadi

Ketua Dept. Pengemb. Bisnis: Dr. Linawati Hardjito, Dr. Welizar, Ir. Jamal

Basmal, MSc, Yudi, Ir. Iwan Sutanto

Sekretariat: Agus Triyanto, Nova Riana B, Dinardani Ratrisari, Reni Pratiwi,

Desniar, MSi, Dr. Agoes M. Jacob, Dwiwitno, Kartika Winta

Komisariat Sumatera: Rinto, SPi, MP

Kom Jawa Bag Barat (Jabar, DKI, Banten): Ir. Evi Liviaty, MS

Kom Jawa Bag Tengah (Jateng & DIY): Dr. Latif Sahubawa

Kom Jawa Bag Timur (Jatim & Bali): Dr. Hepy Nur Syam

Kom Kalimantan: Dr. Yusfiahana Fitriah

Kom Sulawesi: Dr. Metu Salach, MSc

Kom Maluku & Papua: Dr. Petrus Wennu

AUTENTIKASI TUNA STEAK KOMERSIAL DENGAN METODE PCR-SEQUENCING

Authentication Of Commercial Tuna Steak With PCR-Sequencing Based Methods

Asadatun Abdullah*, Nurjanah, Nanang Kurnia

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

*Korespondensi: Jalan Lingkar Akademik Kampus IPB Dermaga Kabupaten Bogor 16680 Telp (0251) 8622915
Fax (0251) 8622916 email: sasa_thp@yahoo.com

Abstract

Tuna is one of the fishery commodities which are susceptible to mislabeling and substituted with similar species, but lower price. Consumer as a purchaser will incur a loss (economical fraud) so it is needed a way to overcome these problems. This study aimed to optimized extraction of DNA obtained from the tuna and tuna exporter companies of modern markets, identification of DNA-based species-specific primers with a target gene *cyt b*, and characterization of DNA tuna authentication results. This study consisted of several steps beginning with the characterization of tuna, DNA extraction using CTAB method and Vivantis kit, amplification by PCR, electrophoresis, and nucleotide sequencing. The samples tested were successfully extracted and amplified with the appropriate size of 750 base pairs. PCR sequencing using *cyt b* gene targets resulted in the identification of tuna raw material. PCR sequencing of the nucleotide sequence of results which have been fitted to the NCBI data, which does not show any fraud in the form of substitution with other species. Species of yellow fin (*Thunnus albacore*), Albacore (*Thunnus alalunga*), big eye (*Thunnus obesus*) and blue fin (*Thunnus macoyyi*) has the highest homology i.e 99%, 99%, 99%, 100%, respectively.

Keywords: authentication, *cyt b*, mt-DNA, PCR, tuna's steaks

Abstrak

Ikan tuna merupakan salah satu komoditas perikanan yang rawan pemalsuan berupa substitusi dengan daging ikan dari spesies yang mirip namun memiliki harga yang lebih rendah. Autentikasi produk dengan metode berbasis DNA dapat menjadi salah satu cara mengatasi permasalahan pemalsuan bahan baku daging ikan tuna. Penelitian ini bertujuan untuk ekstraksi DNA ikan tuna yang diperoleh dari perusahaan eksportir tuna dan pasar modern, identifikasi spesies berbasis DNA dengan primer spesifik dengan gen target *cyt b*, dan karakterisasi DNA ikan tuna hasil autentikasi. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yang diawali dengan karakterisasi ikan tuna, ekstraksi DNA menggunakan metode CTAB dan kit vivantis, proses amplifikasi dengan PCR, elektroforesis, dan penentuan urutan nukleotida. Sampel yang diuji berhasil diekstraksi dan teramplifikasi dengan ukuran yang sesuai yaitu 750 pasang basa. Hasil PCR sequencing menggunakan gen target *cyt b* berhasil mengidentifikasi bahan baku ikan tuna. Urutan nukleotida hasil PCR sequencing yang telah dicocokkan ke bank data menunjukkan tidak ada pemalsuan berupa substitusi dengan spesies lain. Tingkat homologi merupakan persentase kesamaan spesies yang diuji dengan data yang tersedia di bank data. Spesies *yellow fin* (*Thunnus albacores*), *albacore* (*Thunnus alalunga*), *big eye* (*Thunnus obesus*), dan *blue fin* (*Thunnus macoyyi*) memiliki tingkat homologi berturut-turut adalah 99%, 99%, 99%, 100%.

Kata Kunci: autentikasi, *cyt b*, mt-DNA, PCR, steak ikan tuna

PENDAHULUAN

Produk perikanan mengalami permintaan yang cukup tinggi dari dalam dan luar negeri baik dalam bentuk segar maupun olahan. Seiring dengan laju pertumbuhan penduduk dan meningkatnya taraf pendapatan serta pendidikan, masyarakat semakin

peduli kesehatan dan selektif terhadap makanan, untuk itu diperlukan adanya suatu sistem jaminan keamanan pangan.

Salah satu masalah dalam jaminan keamanan pangan adalah adanya pemalsuan. Produk perikanan yang dikemas rawan mengalami

pemalsuan berupa substitusi dengan daging ikan dari spesies yang mirip namun memiliki harga yang lebih rendah. Konsumen sebagai pembeli akan mengalami kerugian (*economical fraud*) dari pemalsuan sehingga diperlukan suatu cara untuk mengatasi masalah tersebut. Salah satu produk yang menjadi primadona baik untuk konsumsi maupun ekspor adalah ikan tuna.

Tuna, ikan yang termasuk dalam keluarga *Scombridae* ini merupakan salah satu sumber utama devisa perikanan Indonesia. Tuna sebagai komoditas ekspor menduduki peringkat terbesar kedua setelah udang (Trilaksana *et al.* 2010). Permintaan ekspor tuna dari tahun ke tahun terus mengalami peningkatan. Menurut data Ditjen Perikanan dalam Badan Riset Kelautan dan Perikanan (BRKP) 2009 volume ekspor mulai tahun 2005 sampai 2009 terus mengalami peningkatan yaitu pada tahun 2005 sebesar 121.136 ton pada tahun 2009 menjadi 134.673 ton.

Autentikasi atau pengujian keaslian produk dengan metode berbasis DNA dapat menjadi salah satu cara mengatasi masalah pemalsuan bahan baku daging ikan tuna. Ikan tuna yang diautentikasi merupakan ikan tuna yang memiliki nilai ekspor tinggi. Metode berbasis DNA memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode berbasis protein diantaranya dapat mendeteksi keaslian suatu produk walaupun telah mengalami proses pengolahan berupa panas (Less 2003). Proses pengujian keaslian juga bisa digunakan untuk menilai bahan baku yang belum mengalami proses pengolahan yaitu bahan baku dalam bentuk segar yang akan dikemas sebagai produk olahan (Civera 2003).

Metode berbasis DNA dapat digunakan untuk mengetahui keaslian suatu produk sehingga pemalsuan yang merugikan konsumen dapat dihindari (Rasmussen dan Morrisey 2008). Metode autentikasi label dengan identifikasi berbasis DNA merupakan metode alternatif dari metode identifikasi spesies berbasis protein. Hal tersebut disebabkan karena metode berbasis DNA merupakan metode spesifik, sensitif dan hasil yang akurat baik pada sampel segar, beku maupun pada pengolahan suhu tinggi (Civera 2003).

Berdasarkan kelebihan metode berbasis DNA, maka dapat dikembangkan beberapa metode untuk identifikasi spesies produk perikanan. Salah satu metode autentikasi berbasis DNA adalah menggunakan alat *Polymerase chain reaction* atau PCR (Mafra *et al.* 2007). Autentikasi ikan tuna dengan metode PCR-*sequencing*. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh ekstrak DNA ikan tuna yang diperoleh dari perusahaan eksportir tuna dan pasar modern, mengidentifikasi spesies berbasis DNA dengan gen target *cyt b*, dan karakterisasi produk PCR gen *cyt b* hasil autentikasi.

MATERIAL DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada preparasi bahan baku antara lain nitrogen cair sedangkan alat yang digunakan adalah talenan, plastik, aluminium foil, kertas label lalu tempat penyimpanan dingin (*freezer*). Alat yang digunakan pada ekstraksi DNA menggunakan metode CTAB antara lain mortar dan penggerus steril, wadah es batu, *ice maker*, *microtube* 1,5 ml, *water bath*, pipet mikro, *pipette tips*, sentrifuse, dan vortex. Bahan yang digunakan pada ekstraksi DNA menggunakan metode CTAB adalah ikan tuna (*Thunnus* sp), es batu, nitrogen cair, larutan Buffer TE, larutan lisis, kloroform, larutan presipitasi, larutan NaCl 1,2 M, etanol dingin, dan Aquabidestilata. Bahan baku berupa *steak* tuna (*Thunnus obesus*, *T. alalunga*, *T. macoyyi*, *T. albacores*) berasal dari PT. Samudra Besar Bali dan PT. Lautan Bahari Sejahtera Muara Baru serta berasal pasar swalayan Bogor dalam bentuk *steak*. *Steak* tuna beku merupakan produk olahan hasil perikanan dengan bahan baku tuna segar atau beku yang mengalami perlakuan sebagai berikut: penerimaan bahan baku, pencucian, penyiangan, pembuatan loin, pengulitan dan perapihan, sortasi mutu, pembungkusan, pembekuan, pembentukan *steak*, penggelasan, penimbangan, pengepakan, pengemasan dan penyimpanan. *Steak* yang berasal dari pasar swalayan Bogor dalam keadaan beku Bahan yang digunakan pada ekstraksi DNA menggunakan metode kit (Vivantis) antara lain ikan tuna (*Thunnus* sp), buffer STL, OB protease, buffer BL, buffer *equilibration*, buffer HB, DNA

wash buffer, dan *buffer elution* sedangkan alat yang digunakan antara lain mikrotube 1,5 ml, vortek, *water bath*, sentrifuse, *colum*, dan *collection tube*.

Alat yang digunakan pada proses PCR antara lain pipet mikro, wadah es batu, *ice maker*, *pipette tips*, *marker pen*, tabung PCR 50 µl sedangkan Bahan yang digunakan adalah es batu, aquabidestilata (ddH₂O), primer *forward* dan primer *reverse*, DNA hasil ekstraksi, dan larutan *mix* (PCR kit commercial).

Alat yang digunakan pada pembuatan gel agarosa antara lain gelas ukur, labu ukur, timbangan digital, *microwave*, cetakan agar, *electrophoresis comb*, dan aluminium foil. Bahan yang digunakan adalah bubuk Agarosa dan larutan Buffer TBE 1x. Alat yang digunakan pada elektroforesis antara lain *casting tray*, pisau bedah, seperangkat alat katoda-anoda, alat sinar UV. Bahan yang digunakan adalah gel agarosa, larutan buffer TBE, *loading dye*, DNA marker, ethidium bromida, aquades.

Koleksi Sampel

Bahan yang digunakan pada penelitian ini menggunakan ikan tuna yang diperoleh dari perusahaan ekportir ikan tuna maupun dari pasar swalayan di daerah Bogor. Bahan yang digunakan dan asal bahan baku disajikan pada Tabel 1.

Metode Penelitian

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan menggunakan metode manual (CTAB). Ekstraksi DNA menggunakan CTAB diawali dengan melisis dinding sel menggunakan nitrogen cair yang selanjutnya dilakukan penambahan larutan CTAB 500 µl. Sampel yang digunakan sebanyak 0,1-0,5 gram. Kemudian ditambahkan 14 µL proteinase K dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama dua jam kemudian disentrifuse selama sepuluh menit pada 13000 rpm (putaran per menit). Sampel yang telah disentrifuse diberi 500 µL PCI dikocok sekitar lima menit agar larutan tercampur, kemudian disentrifuse selama lima menit pada 13000 rpm (putaran permenit). Kemudian larutan PCI dibuang dan ditambahkan 400 µL kloroform isoamilalkohol dan disentrifuse selama lima

Tabel 1 Jenis dan asal bahan baku ikan tuna

Bahan baku	Asal bahan baku
<i>Yellow fin</i>	PT Samudera Besar Bali dan PT Lautan Bahari Sejahtera
<i>Albacore</i>	PT Samudera Besar Bali
<i>Big eye</i>	PT Samudera Besar Bali dan PT Lautan Bahari Sejahtera
<i>Blue fin</i>	PT Samudera Besar Bali
Tuna <i>steak</i>	Pasar swalayan Bogor

menit pada 13000 rpm (putaran permenit). Bagian yang mengandung kloroform isoamilalkohol dibuang lalu ditambahkan 600 µL isopropanol dan dipresipitasi pada suhu 4 °C selama satu malam, disentrifus selama sepuluh menit pada 13000 rpm kemudian bagian yang mengandung isopropanol dibuang dan ditambahkan 500 µL etanol 70 % kemudian disentrifuse selama sepuluh menit pada 13000 rpm lalu bagian yang mengandung etanol dibuang dan selanjutnya dikeringkan kurang lebih selama satu jam kemudian ditambahkan 100 µL Tris EDTA dan disimpan pada suhu 4 °C.

Bahan baku yang telah diekstraksi menggunakan CTAB ditempatkan dalam tabung PCR lalu dilakukan proses amplifikasi dengan kondisi optimum serta melalui beberapa siklus antara 25-35 siklus. Produk hasil PCR selanjutnya dilakukan visualisasi dengan elektroforesis dan dilihat di bawah sinar UV, jika hasil elektroforesis berhasil maka ditandai dengan adanya pita DNA yang spesifik lalu dilakukan PCR *sequencing* untuk penentuan urutan nukleotida. Proses analisis produk PCR berupa *sequencing* dilakukan oleh lembaga yang berkompeten (Macrogen) yang hasilnya dicocokkan dengan bank data (www.ncbi.nlm.nih.gov). Hasil berupa urutan nukleotida akan dicocokkan dengan data yang tersedia sehingga akan diketahui spesies yang diuji.

Metode PCR

Sampel yang telah diekstraksi dipersiapkan untuk PCR sebanyak 2 µL Bahan untuk PCR adalah air, DNA polimerase, primer, DNA, dan dNTP dicampur dalam tabung PCR. Air berfungsi untuk melarutkan komponen PCR

agar bercampur setelah itu primer baik *forward* maupun *reverse* masing-masing 1,5 µL yang berfungsi untuk proses penggandaan pada PCR, primer yang telah dimasukkan dalam tabung PCR kemudian ditambahkan DNA sebanyak 2 µL dan yang terakhir adalah *mix*, terdiri dari dNTP yang berfungsi agar pada proses PCR dapat membuat untai baru serta *Taq* polimerase. Komponen yang berada pada tabung PCR dimasukkan ke *thermocycle* yang sebelumnya harus diatur suhu dan siklus yang akan digunakan.

Proses PCR akan menghasilkan jutaan salinan DNA dan saat proses pengerjaan PCR dilakukan dengan memperhatikan kontaminasi. Volume yang digunakan dalam PCR yaitu 25 µL. Keberhasilan proses PCR dapat dilakukan dengan optimasi dan diperlukan suhu penempelan (*annealing*) yang tepat agar primer dapat menempel pada DNA untai tunggal yang sudah didenaturasi, tanpa adanya optimasi maka kemungkinan berhasil pun akan semakin kecil.

Analisis Produk PCR

Amplifikasi gen target menggunakan gen sitokrom b menghasilkan 750 pasang basa. Analisis produk PCR dilakukan penentuan urutan nukleotida dengan metode Sanger yang didasarkan pada pendekatan sintesis molekul DNA baru dan pemberhentian sintesis tersebut pada basa tertentu. Hasil amplifikasi yang telah berhasil kemudian dikirim ke lembaga yang berkompeten yaitu Macrogen untuk disekuensing. Hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin, dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel. Hasil sekuensing berupa urutan nukleotida dicocokkan ke bank data dengan metode BLAST-n.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produk *steak* tuna dikemas dengan plastik dalam keadaan vakum. Pengemasan dengan bahan pengemas yang cocok sangat bermanfaat untuk mencegah kemunduran mutu. Pengemasan digunakan untuk melindungi bahan dari proses pengeringan. Daya simpan maksimum produk perikanan dapat dicapai bila menggunakan bahan mentah yang benar-benar segar, menggunakan bahan pengemasan yang cocok dan benar-benar

melekat pada produk yang dibekukan. Selama pembekuan secara umum produk akan mengalami tiga jenis kerusakan (*loss*), yaitu kerusakan karena aspek mekanis, hal ini disebabkan oleh produk yang menempel atau terjatuh dari rak atau *conveyor*, kemunduran mutu, pengeringan (*dehydration*), yaitu berkurangnya kadar air selama produk dibekukan dan disimpan beku yang ditunjukkan oleh adanya lapisan es di atas produk beku atau memutihnya permukaan produk beku itu. Produk *steak* tuna yang berasal dari pasar swalayan Bogor dalam keadaan yang masih memiliki ciri-ciri produk segar yang ditandai dengan warna daging yang cerah serta setelah melalui proses *thawing* tekstur tuna *steak* masih padat dan elastis jika ditekan dengan jari.

Pembekuan pada tuna *steak* untuk menghambat kemunduran mutu pada produk yang disebabkan oleh mikroorganisme, proses kimiawi dan fisik, sehingga dapat memperpanjang daya simpan dan mempertahankan mutu produk. Karakteristik *steak* ikan tuna meliputi tekstur dan warna. Ikan tuna merupakan ikan yang berlemak tinggi sehingga perlu penanganan hati-hati agar diperoleh bahan baku yang segar (Suptijah 1996). Proses penanganan yang baik dan benar meliputi *quick, cold, clean, dan carefully* harus diterapkan dari awal ikan ditangkap hingga proses pengolahan. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan bahan baku yang masih memiliki kriteria ikan segar ketika ikan telah ditangkap maupun melalui proses pengolahan. Karakteristik *steak* tuna dengan sumber pembanding Standar Nasional Indonesia (SNI) disajikan pada Tabel 2.

Ekstraksi DNA

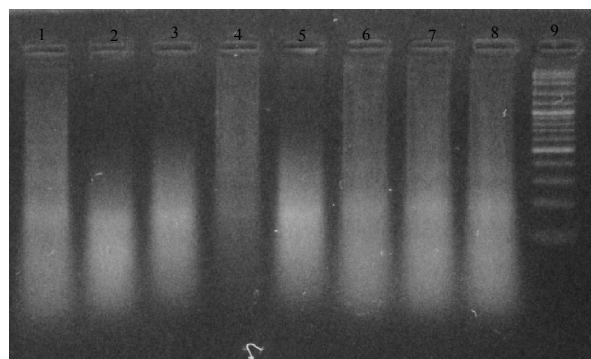
Ekstraksi DNA pada dasarnya untuk melisis jaringan dan mendapatkan DNA yang berkualitas, terpisah dengan komponen lain. Proses ekstraksi dilakukan untuk memperoleh DNA yang berkualitas yaitu DNA yang diekstraksi sudah terpisah dengan komponen lain sehingga jika divisualisasi menghasilkan pita yang jelas. Proses ekstraksi DNA terdiri atas tiga tahapan yaitu perusakan dinding sel (*lisis*), pemisahan DNA dari bahan lain, dan permurnian DNA (Ardiana 2009).

Proses ekstraksi DNA dapat menggunakan

Tabel 2. Karakteristik *steak* tuna yang digunakan pada penelitian

Sampel	Warna	Tekstur	SNI	Nilai organoleptik
<i>Yellow fin</i> (BL 1)	Daging berwarna merah muda pucat	Elastis, padat, kurang kompak,	7530.1-2009	7
<i>Albacore</i> (BL 2)	Daging berwarna putih dengan guratan merah muda	Elastis, kurang padat, dan kurang kompak	7530.1-2009	7
<i>Bige eye</i> (BL 3)	Daging berwarna merah muda pucat	Elastis, padat, kurang kompak	7530.1-2009	7
<i>Blue fin</i> (BL4)	Daging berwarna merah kehitaman	Elastis, padat, kurang kompak	7530.1-2009	7
<i>Bige eye</i> (MB 1)	Daging berwarna merah muda pucat	Elastis, padat dan kompak	7530.1-2009	9
<i>Yellow fin</i> (MB 5)	Daging berwarna merah muda pucat	Elastis, padat dan kompak	7530.1-2009	9
<i>Tuna steak</i> (G3)	Warna daging krem, cerah dan mengkilap	Tekstur kompak, padat dan elastis	01-4485.-2006	8
<i>Tuna steak</i> (E1)	Warna daging krem, sangat cerah dan sangat mengkilap	Tekstur kompak, padat dan elastis	01-4485.-2006	8

beberapa cara antara lain dengan CTAB ataupun menggunakan kit komersial. Bahan baku berupa tuna *steak* yang diekstraksi menggunakan CTAB dan kit Vivantis. Elektroforegram DNA genom disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram DNA genom. 1 = *Yellow fin*; 2 = *Albacore*; 3 = *Bige eye*; 4 = *Blue fin*; 5 = *Bige eye*; 6 = *Yellow fin*; 7 = *Steak* tuna pasar swalayan Bogor; 8 = *Steak* tuna pasar swalayan Bogor; 9 = Marker

Amplifikasi Gen Sitokrom b

Amplifikasi dilakukan menggunakan proses PCR yaitu suatu reaksi berantai Polimerase. Primer oligonukleotida sintetik berukuran pendek menempel pada daerah komplementer DNA dupleks dan secara langsung mensintesis jutaan kopi dari molekul DNA (Gil 2007).

Amplifikasi gen *cyt b* menggunakan pasangan primer dengan target 750 pasang basa. Hasil

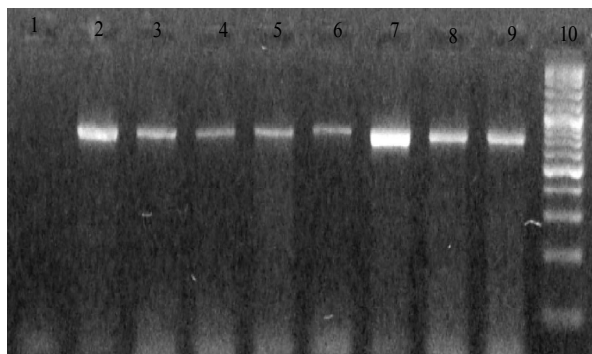
elektroforegram pada produk PCR di bawah sinar UV memiliki kecepatan yang berbeda-beda. Kecepatan migrasi DNA di dalam agarosa ditentukan oleh beberapa faktor antara lain ukuran molekul DNA, konsentrasi agarosa, konformasi DNA, voltase yang digunakan, adanya ethidium bromida dalam gel serta komposisi larutan buffer. Semakin besar ukuran DNA maka bergerak lebih lambat dibandingkan dengan molekul berukuran kecil (Baker 2000).

Penggunaan DNA yang berasal dari mitokondria memiliki beberapa alasan seperti jumlah yang lebih banyak dibandingkan pada inti sel. Penggunaan *cyt b* didasarkan karena dapat digunakan untuk identifikasi spesies vertebrata yang mengandung informasi spesies yang spesifik dan dapat digunakan untuk filogenetik (Parson *et al.* 2000).

Laju mutasi pada mitokondria 5-10 kali lebih cepat dibandingkan pada inti, disebabkan mt-DNA tidak memiliki mekanisme DNA *repair* yang efisien, tidak memiliki protein histon, dan terletak berdekatan dengan membran dalam mitokondria tempat berlangsungnya reaksi fosforilasi oksidatif yang menghasilkan radikal oksigen sebagai produk samping. Penggunaan gen *cyt b* mitokondria efektif untuk identifikasi spesies dan analisis filogenetik (Biswas *et al.* 2005). Visualisasi hasil amplifikasi gen *cytb* dalam

bentuk analisis migrasi produk PCR dari sampel Tuna disajikan pada Gambar 2.

Analisis migrasi gen *cyt b* dari sampel Tuna steak menunjukkan ukurannya adalah 750 pasang basa (pb) dan telah sesuai dengan ukuran teoritis gen *cyt b* berdasarkan pasangan primer yang digunakan. Optimasi proses PCR dilakukan untuk menentukan primer dan suhu penempelan primer yang “conserved”, yang berarti dapat digunakan untuk berbagai spesies (Akasaki *et al.* 2006). Hal tersebut penting sebagai bagian dari langkah validasi metode pengujian autentikasi bahan baku hasil perikanan serta deteksi pencampuran daging ikan pada produk olahan terutama ikan kaleng. Hasil optimasi pada penelitian ini menunjukkan bahwa suhu optimum penempelan primer (*annealing*) adalah pada kisaran suhu 55-60 °C.



Gambar 2. Elektroforegram produk PCR. 1 = kontrol negatif; 2 = *Yellow fin*; 3 = *Albacore*; 4 = *Big eye*; 5 = *Blue fin*; 6 = *Big eye*; 7 = *Yellow fin*; 8 = *Steak* tuna pasar swalayan Bogor; 9 = *Steak* tuna pasar swalayan Bogor; 10 = Marker

Penentuan Urutan Nukleotida Gen Sitokrom b

Proses sekuensing merupakan suatu metode untuk memperoleh urutan nukleotida dari suatu spesies. Metode sekuensing yang digunakan adalah metode Sanger. Prinsip metode Sanger berdasarkan pendekatan sintesis molekul DNA baru dan pemberhentian sintesis tersebut pada basa tertentu. Hasil sekuensing spesies ikan tuna disajikan pada Tabel 3.

Hasil sekuensing berupa urutan nukleotida akan dibandingkan dengan bank data NCBI menggunakan metode BLAST. Berdasarkan data hasil sekuensing pada Tabel 3 tidak terjadi

Tabel 3 Hasil sekuensing spesies ikan tuna

Kode	Spesies hasil blast	Nomor akses NCBI	Homologi
BL1	<i>T. albacares</i>	DQ080284.1	99%
BL2	<i>T. alalunga</i>	GU256526.1	99%
BL3	<i>T. obesus</i>	DQ080280.1	100%
BL4	<i>T. macoyyi</i>	EF141183.1	99%
MB1	<i>T. obesus</i>	DQ080280.1	99%
MB5	<i>T. albacares</i>	DQ080287.1	99%
G3	<i>T. albacares</i>	DQ080287.1	99%

pemalsuan bahan baku yang terlihat dari sampel yang digunakan dengan hasil sekuensing menggunakan metode BLAST telah sesuai. Ikan tuna dengan spesies *yellow fin* (*T. albacares*), *albacore* (*T. alalunga*), *big eye* (*T. obesus*), dan *blue fin* (*T. macoyyi*) menggunakan gen target *cyt b* berhasil diidentifikasi. Hasil sekuensing selain berupa urutan nukleotida juga dapat melihat tingkat homologi spesies yang diuji.

Tingkat homologi merupakan persentase kesamaan spesies yang diuji dengan data yang tersedia di bank data. Spesies *yellow fin* (*T. albacares*), *albacore* (*T. alalunga*), *big eye* (*T. obesus*), dan *blue fin* (*T. macoyyi*) memiliki tingkat homologi berturut-turut adalah 99%, 99%, 99%, 100%. Perbedaan pada tingkat homologi ini disebabkan adanya ketidaksesuaian dengan bank data yaitu sebesar 1% yang bisa disebabkan adanya perbedaan urutan nukleotida pada spesies.

KESIMPULAN

Pengujian berbasis DNA dapat dilakukan pada bahan baku yang telah mengalami proses penghilangan ciri morfologi seperti sirip. Karakteristik daging yang digunakan dalam keadaan segar dengan memperhatikan warna dan tekstur. Hasil pengujian sampel ikan tuna didapatkan fragmen DNA dengan ukuran 750 pasang basa (pb) menggunakan primer spesifik berhasil mengamplifikasi dengan gen target *cyt b*. Hasil sekuensing berupa urutan nukleotida menunjukkan tuna *steak* yang berasal dari perusahaan dan pasar swalayan Bogor tidak ada pemalsuan atau substitusi bahan baku dengan jenis spesies lain. Hasil sekuensing yang dicocokkan ke bank data memiliki tingkat homologi rata-rata yang masih dapat diterima.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi (DIKTI) yang telah membiayai penelitian ini melalui Program Hibah Penelitian Strategis Nasional 2011

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiana DW. 2009. Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk menggunakan modifikasi buffer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian* 14:12-16
- Akasaki T, Yanagimoto T, Yamakami K, Tomonaga H, Sato S. 2006. Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome *b* gene in cod fish (order Gadiformes) products. *Journal of Food Science* 71(3): C190
- [BSN] Badan Standar Nasional. 2006. *Tuna steak beku*. Jakarta: Dewan SNI.
- [BSN] Badan Standar Nasional. 2009. *Tuna loin segar*. Jakarta: Dewan SNI.
- [BRKP] Badan Riset Kelautan dan Perikanan. 2009. *Potret dan Strategi Pengembangan Perikanan Tuna, Udang dan Rumput Laut*. Jakarta: Badan Riset Kelautan dan Perikanan
- Baker JA. 2000. *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science: Australia
- Biswas SK, Li Wang, Yokoyama K, Nishimura K. 2005. Molecular phylogenetics of the genus *Trichosporon* inferred from mitochondrial *cytochrome b* gene sequences. *Journal of Clinical Biology* 43: 5171-5178
- Civera T. 2003. Species identification and safety of fish products. *Vet Research Communication*. 27: p. 481
- Gil L.A. 2007. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *J Food science and Technology* 18:p. 558-566
- Less M. 2003. *Food Authenticity and Traceability*. England: Woodhead Publishing Limited
- Maffra I, Ferreira IM, Oliveira MB. 2007. Food authentication by PCR-based methods. *Eur Food Res Technol*. published online: 30 October 2007.
- Parson W, Pegoraro K, Niederstatter H, Foger M. 2000. Species identification by means of the cytochrome *b* gene. *Journal of Legal Med* 114: p. 23-28.
- Rasmussen RS, Morrissey MT. 2008. DNA-Based methods for identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive reviews in food science and food safety Journal*. Vol.7. 2008-IFT.
- Suptijah P. 1996. Ekstraksi Insulin dari Ikan dan Uji Kemurniannya. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*, 2(2):.103-121
- Trilaksana W, Bintang M, Monintja DR, Hubeis M. 2010. Analisis Regulasi Sistem Manajemen Keamanan Pangan Tuna di Indonesia dan Negara Tujuan Ekspor. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 13(1): 62-80.