

Perancangan PCR-RFLP untuk Autentikasi Spesies Ikan Kakap Merah Berdasarkan Gen CYB

(PCR-RFLP Design for Authentication of Red Snapper Species Based on CYB Gene)

Kevin A. T. Timbuleng*, Beivy J. Kolondam, Deidy Y. Katili

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sam Ratulangi Jl. Kampus UNSRAT FMIPA,
Manado 95115, Indonesia

*email: timbulengk@gmail.com

Abstract

The PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) technique is a species identification method that can facilitate food inspection agencies to overcome mislabelling. In addition, this technique is simple, fast, powerful, and cheap compared to DNA barcodes. This study aimed to accommodate the problem in determining restriction endonuclease enzymes for the digestion of PCR end products through the design of snapper species authentication using the CYB gene *in silico*. Differentiation of CYB gene sequences with DNA barcoding showed that all species could be differentiated with the highest similarity level in Red Fish (*Sebastes*) species by 98.9% and snapper species between *L. malabaricus* and *L. erythropterus* by 99.8%. Enzyme tracing based on sequences variation of snapper species with substitution species found three potential enzymes from the CYB gene sequence, namely, *AccI*, *Fnu4HI*, and *Tsp45I*. Where all these enzymes can discriminate red snapper species among other.

Key words: PCR-RFLP; CYB gene; Red snapper

Abstrak

Teknik PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) merupakan metode identifikasi spesies yang dapat memfasilitasi lembaga inspeksi makanan untuk mengatasi *mislabelling*. Selain itu, teknik ini sederhana, cepat, kuat, dan murah dibandingkan dengan barcode DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mengakomodasi masalah dalam menentukan enzim restriksi endonuklease untuk digesti produk akhir PCR lewat perancangan autentikasi spesies ikan kakap menggunakan gen CYB secara *in silico*. Diferensiasi sekuens gen CYB dengan DNA barcoding menunjukkan semua spesies dapat dibedakan dengan tingkat kesamaan tertinggi pada spesies Red Fish (*Sebastes*) sebesar 98,9% dan spesies kakap antara *L. malabaricus* dan *L. erythropterus* sebesar 99,8%. Penelusuran enzim berdasarkan variasi sekuens spesies kakap dengan spesies substitusi ditemukan sebanyak tiga enzim yang berpotensi yaitu, *AccI*, *Fnu4HI*, dan *Tsp45I*. Semua enzim tersebut dapat memdiskriminasikan spesies kakap merah dari spesies lainnya.

Kata kunci: PCR-RFLP; gen CYB; ikan kakap merah

PENDAHULUAN

Menurut Menteri Kelautan dan Perikanan (KKP), saat ini Indonesia merupakan produsen perikanan kedua terbesar di dunia (Yadika, 2019). Produksi ikan kakap berhasil mencapai 25.051 ton pada tahun 2017. Angka ini meningkat drastis dari produksi ikan kakap tahun 2016 yang sebanyak 5.544,68 ton (Winarto, 2018). Harga kakap merah mencapai Rp70 ribu per kilogram meskipun dalam masa pandemi covid-19 (Heryadie, 2020). Tingginya harga komoditas ikan ini

menjadikannya salah satu target pemalsuan ikan.

Sering kali produk ikan kakap merah dipalsukan dengan *tilefish*, *rockfish*, *sea bream*, mahi-mahi dan ikan kakap lainnya (Isaacs dan Hellberg, 2020). Akademisi di Liverpool John Mores University (LJMU), Inggris, memaparkan *mislabelling* pada ikan kakap disubsitusi dengan jenis *Sebastes* spp atau sejenis nila. Penyebabnya karena kompleksitas taksonomi ikan jenis ini (Julaika, 2020). Menurut investigasi Oceana (2013), kakap merah merupakan ikan yang paling banyak

disubstitusi. Berdasarkan tes DNA, hanya 7 dari 120 sampel yang dilabeli dengan benar untuk spesies kakap merah, sisanya merupakan ikan jenis lain (Warner *et al.*, 2013). Olmsted (2016) mengatakan bahwa ikan kakap merah yang diganti dengan *tilefish* sering dipalsukan di Amerika Serikat. Dalam daftar FDA, *tilefish* tidak disarankan untuk dikonsumsi wanita hamil karena mengandung kadar merkuri yang tinggi (Mustinda, 2016). Dibandingkan spesies kakap, ikan nila juga memiliki kandungan gizi yang lebih rendah di beberapa kategori, antara lain protein, kalsium, magnesium, fosfor, kalium, dan vitamin B-12 (USDA, 2019). *Mislabeled* secara tidak langsung dapat berdampak pada upaya konservasi dengan salah menggambarkan kelimpahan spesies berlabel yang berpotensi semakin berkurang, dan memungkinkan pemanenan berlebihan spesies substitusi ketika disamakan dengan nama yang berbeda (Pitcher *et al.*, 2002).

Teknik PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) adalah metode yang paling cocok untuk autentikasi berbagai *seafood* yang dapat memfasilitasi lembaga inspeksi makanan untuk menegakkan peraturan pelabelan dan meminimalkan penipuan *seafood* (Sivaraman *et al.*, 2018). Keunggulan utama PCR-RFLP adalah tekniknya sederhana, cepat, kuat, dan murah dibandingkan dengan barcode DNA menggunakan sekuensing mtDNA (Anjalina *et al.*, 2019). Selain itu, hanya membutuhkan *thermocycler* PCR dan peralatan elektroforesis, di mana sebagian besar laboratorium dapat menanggung biayanya, hal itu juga merupakan faktor realistis di sebagian besar negara berkembang (Yao *et al.*, 2020).

PCR-RFLP untuk membedakan spesies kakap merah pernah dikembangkan dalam autentikasi produk ikan asin komersial dengan menggunakan metode *semi-nested* PCR-RFLP target gen 12S rRNA menunjukkan reaksi tiga enzim restriksi sekaligus antara lain *HaeIII*, *Scal* dan *SnaBI*, dapat membedakan *Lutjanus sanguineus* dan *L. erythropterus* dari *L. argentimaculatus* dan *L. malabaricus*. Di lain sisi, spesies *L. sanguineus* dan *L.*

erythropterus dibedakan dengan enzim restriksi endonuklease *Maell*, karena profil RFLP dari dua spesies ini tidak bisa dibedakan dengan *HaeIII*, *Scal* dan *SnaBI* (Zhang *et al.*, 2006). Berdasarkan penelitian Sivaraman *et al.* (2018), PCR-RFLP dengan menargetkan gen D-loop pada sembilan spesies kakap memberikan pola yang serupa pada spesies *L. fulvus* dan *L. fulviflamma* karena kesamaan identitas yang tinggi (94%), sedangkan tujuh spesies lainnya termasuk spesies kakap merah (*L. argentimaculatus* dan *L. gibbus*) dapat diferensiasi dengan jelas menggunakan enzim *Tsp509I* yang dipilih berdasarkan analisis *in silico* (WATCUT) dan laporan beberapa penelitian sebelumnya yang terbukti mampu membedakan spesies. Studi terbaru oleh Sivaraman *et al.* (2019) menunjukkan hasil penelitian untuk autentikasi enam spesies kakap yaitu, *L. fulvus*, *L. rivulatus*, *L. quinquelineatus*, *L. fulviflamma*, *L. madras* dan *L. decussatus* menggunakan metode PCR-RFLP dengan menargetkan gen mitokondria gen 12S rRNA. Keenam spesies tersebut dapat dibedakan secara jelas oleh enzim *BseDI*, sementara *Mn1I* dan *MspAI* hanya dapat membedakan empat spesies. Dari penelitian-penelitian ini, disimpulkan bahwa pemilihan enzim restriksi yang tepat menjadi masalah utama dalam analisis akhir PCR-RFLP, sehingga banyak enzim yang digunakan masih kurang diandalkan. Untuk itu, penelitian ini berusaha mengakomodasi masalah dalam menentukan enzim restriksi endonuklease yang relevan lewat perancangan autentikasi spesies ikan kakap

MATERI DAN METODE

Koleksi Spesimen untuk Analisis

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu unit komputer berbasis windows 10 dengan koneksi internet. Perangkat lunak yang digunakan untuk analisis DNA adalah Geneious v5.6 (Kearse *et al.*, 2012), NEBcutter v2.0 (Vincze *et al.*, 2003), dan Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini dipilih berdasarkan spesies yang umum disubstitusi dari beberapa penelitian dan

database genom lengkap mitokondria. Segmen DNA yang relatif lebih panjang menyediakan kemungkinan situs restriksi

lebih banyak (Zhang *et al.*, 2006). Tabel 1 merupakan daftar beberapa spesies yang dipilih dari GenBank untuk dianalisis.

Tabel 1. Spesimen Ikan Kakap yang diambil dari GenBank.

No	Nama latin	Kode Akses	Keterangan
1	<i>Lutjanus malabaricus</i> (Malabar Blood Snapper)	FJ824741.1	Wang <i>et al.</i> (2016)
2	<i>Lutjanus erythropterus</i> (Crimson snapper)	GQ265897.1	Li <i>et al.</i> (2016)
3	<i>Lutjanus argentimaculatus</i> (Mangrove red snapper)	JN182927.1	Liao <i>et al.</i> (2012)
4	<i>Oreochromis niloticus</i> (Nile Tilapia)	GU238433.1	Yang <i>et al.</i> (2016)
5	<i>Oreochromis sp.</i> 'red tilapia'	HM067614.1	Jiang <i>et al.</i> (2016)
6	<i>Coryphaena hippurus</i> (Dolphinfish)	KF814117.1	Musika dan Phinchongsakuldit (2014)
7	<i>Pagrus major</i> (Red seabream)	AP002949.1	Miya <i>et al.</i> (2016)
8	<i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod)	NC_002081.1	Johansen dan Bakke (2010)
9	<i>Lates niloticus</i> (Nile Perch)	KY213963.1	Gan <i>et al.</i> (2017)
10	<i>Pagellus erythrinus</i> (Pandora fish)	MG653592.1	Ceruso <i>et al.</i> (2018)
11	<i>Sebastes fasciatus</i> (Arcadian Redfish)	KX897946.1	Parent dan Normandeau (2017)
12	<i>Sebastes mentella</i> (Beaked Redfish)	LC493910.1	Poulsen <i>et al.</i> (2020)

Ekstraksi Gen CYB dari Genom DNA Mitokondria

Panjang DNA mitokondria spesimen-spesimen yang diperoleh dari GenBank berkisar antara 16,4-17,0 kbp. Gen target dapat ditemukan dari keterangan nama gen, region gen tersebut (berupa nomor), beserta CDS (Coding Sequence) urutan asam amino yang dikode oleh gen tersebut (Kolondam, 2020). DNA gen target dari setiap spesies ikan di konversi dalam bentuk format FASTA.

Penjajaran Sekuens

Sekuens yang telah diperoleh disunting menggunakan software Geneious v5.6 (Kearse *et al.*, 2012) dengan dipadukan berdasarkan algoritma MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) berdasarkan Edgar (2004). Variasi nukleotida pada titik di mana terdapat perbedaan ditampilkan menggunakan notasi nukleotida. Persentase kesamaan dihitung berdasarkan penjajaran sekuens sebagai bagian dari piranti lunak Geneious.

Penentuan Titik Potong Enzim Restriksi

Perangkat lunak daring Nebcutter v2.0 (Vincze *et al.*, 2003) digunakan untuk mengambil data enzim restriksi, dengan memilih opsi "All commercially available specificities" dan pertimbangan jumlah pemotongan enzim maksimal tiga kali, sehingga pola restriksi menghasilkan fragmen maksimal empat memudahkan pengenalan dalam elektroforesis gel. Enzim yang dapat memotong situs pengenalan yang mengapit titik-titik perbedaan (SNP) dicari dengan menggunakan opsi "flanking enzyme" yang disediakan nebcutter. Pemilihan enzim dilihat dari jumlah pemotongan maksimal tiga kali. Situs-situs pemotongan enzim restriksi dideskripsikan dalam bentuk tabel.

Simulasi Pemotongan Enzim Restriksi

Berdasarkan enzim restriksi yang telah diseleksi sebelumnya. Diuji enzim digestion seluruh spesies tersebut menggunakan fitur yang terintegrasi dengan perangkat lunak Geneious v5.6. Diperoleh hasil yang berupa kromatogram fragmen RFLP divisualisasi dengan virtual gel. Enzim yang didapatkan dari masing-masing gen, dibandingkan dan dipilih yang

terbaik dalam menunjukkan variasi pola restriksi seluruh spesies.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Database Genom dan Gen Kakap Merah

Dari pencarian database di GenBank, diperoleh 11 genom utuh dan satu genom partial yang digunakan dalam penelitian ini. Semua sekuens yang dikoleksi berasal dari tahun 2010 – 2020. Dari 12 genom tersebut, tiga di antaranya termasuk dalam anggota spesies kakap merah di Indonesia (Badrudin dan Aisyah, 2009), dan sembilan spesies lainnya adalah spesies yang umum disubstitusi sebagai kakap merah berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya.

Gen CYB dapat langsung diekstraksi dari sekuens utuh. Gen CYB dapat diketahui dengan nama gen berupa "CYTB" atau "Cyt b". Data gen yang diambil sudah dalam bentuk format FASTA yang disediakan dari GenBank. Koleksi gen CYB memiliki panjang nukleotida berkisar antara 1135 sampai 1142 bp. Spesies *Oreochromis* sp. "red tilapia" memiliki sekuens yang terpendek di gen CYB.

Variasi nukleotida melalui multiple sequence alignment

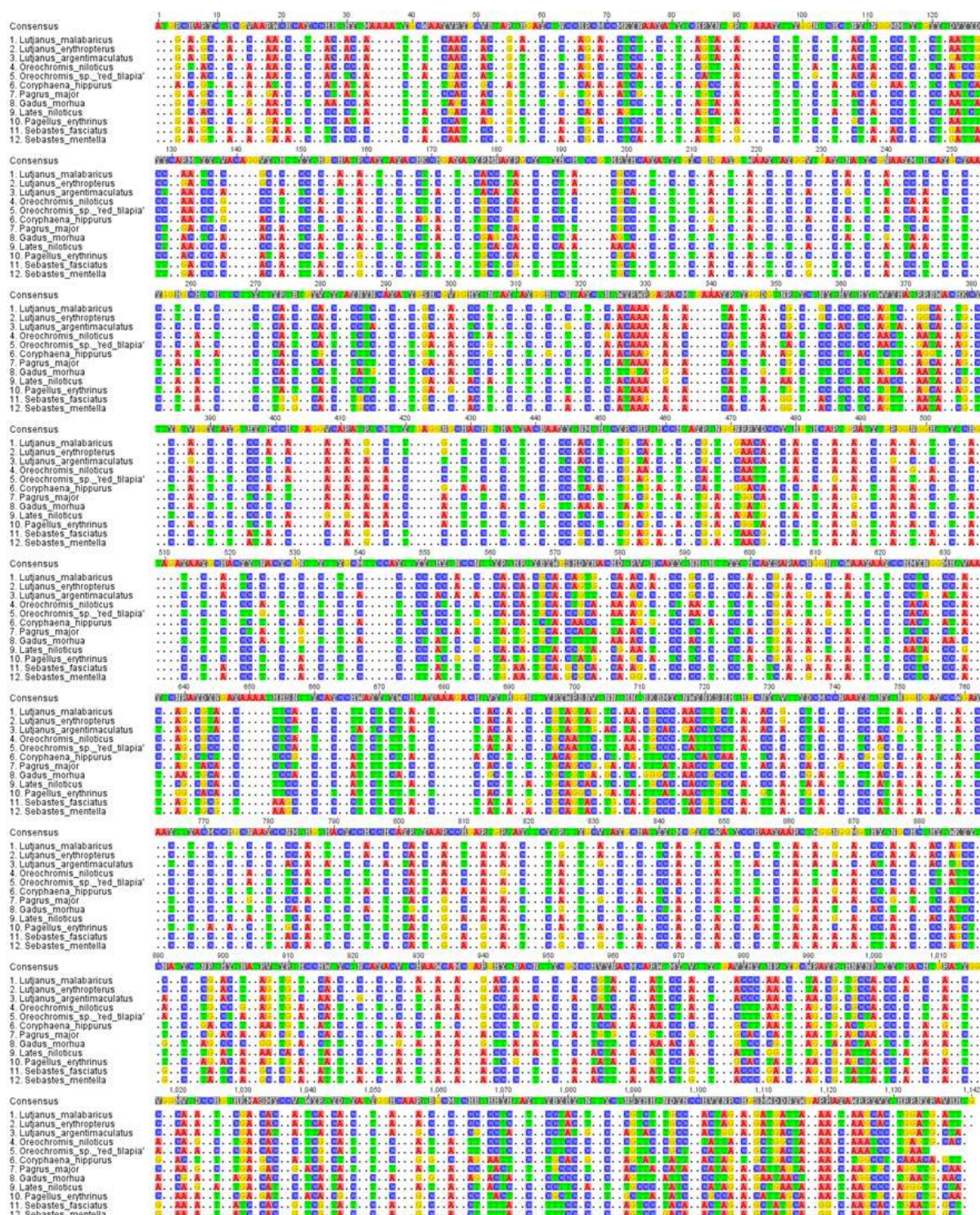
Pada Gambar 1 teramati bahwa perbedaan nukleotida gen CYB antara spesimen-spesimen yang dibandingkan berjumlah 536 titik. Sebanyak sembilan titik unik dapat mengenali ketiga kakap (*Lutjanus*) di antara spesies lainnya. Posisi-posisi nukleotida tersebut berada pada nomor 15, 178, 182, 591, 644, 666, 698, 810 dan 957. Pada posisi nukleotida yang ke-15 menjadi unik karena di posisi ini terdapat keseragaman dari kelompok *Lutjanus* dengan jenis lain yang memiliki nukleotida Sitosin (C) sedangkan yang lainnya bervariasi antara Adenin (A) atau Guanin (G). Pada posisi ke-178 terdapat keseragaman dari kelompok *Lutjanus* dengan jenis lain yang memiliki nukleotida Adenin (A) sedangkan yang lain Guanin (G). Pada posisi 182, 644, dan 698, nukleotida kelompok *Lutjanus* adalah Timin (T) sedangkan yang lainnya Sitosin (C). Pada posisi ke-591, nukleotida kelompok *Lutjanus* Guanin (G) sedangkan yang

lainnya bervariasi antara Adenin (A), Timin (T) dan Sitosin (C). Pada posisi 666 dan 810, nukleotida kelompok *Lutjanus* adalah Timin (T) sedangkan yang lainnya bervariasi antara Sitosin (C) dan Adenin (A). Pada posisi ke-957, nukleotida kelompok *Lutjanus* adalah Sitosin (C) sedangkan yang lain Timin (T) dan Adenin (A). Di lain sisi, tidak ditemukan titik khusus yang dapat mendiferensiasikan ketiga spesies kakap. Semua titik-titik perbedaan ini menjadi pusat perhatian untuk tinjauan variasi secara umum.

Sebagai instrumen identifikasi, gen CYB harus bisa membedakan semua spesies ikan. Dalam Tabel 3, digambarkan tingkat kesamaan antara sesama kakap merah yang berkisar antara 86,0% sampai 99,8%. Tingkat kesamaan untuk bukan spesies kakap merah yaitu 72,1% sampai 98,9%. Tingkat kesamaan dari spesies *Sebastes* sebesar 98,9%. Tingkat kesamaan antara sesama spesies *Oreochromis* adalah 94,1%. Semua hasil di atas menunjukkan bahwa gen CYB dapat membedakan seluruh spesies yang diuji.

Diferensiasi spesies Red Fish (*Sebastes*) dengan menggunakan gen CYB dianggap kurang baik karena tingkat kesamaan 98,9%. Hal ini dilihat dari nilai 2% yang telah diajukan sebagai nilai ambang tentatif tingkat perbedaan antara spesies dan genus ikan (Ward, 2009). Spesies *S. mentella* dan *S. fasciatus* ini berbagi habitat yang sama dan menghuni pada interval kedalaman yang berbeda di laut Atlantik Utara (Atkinson, 1987). Dalam studi Mccusker et al. (2012) mengatakan tiga spesies *Sebastes* dari Atlantik Canada: *S. fasciatus*, *S. marinus* dan *S. mentella*, secara genetik tidak dapat dibedakan. Jenis ikan *Sebastes* di Atlantik diketahui memiliki sekuens mtDNA yang sangat mirip (Sundt dan Johansen 1998). Diferensiasi sekuens gen CYB untuk spesies kakap merah juga kurang bagus karena tingkat kesamaan antara spesies *L. malabaricus* dan *L. erythropterus* sebesar 99,8%. Penelitian sebelumnya Gold et al. (2011) menyatakan bahwa tiga spesies *Lutjanus* Indo-Pasifik (*L. erythropterus*, *L. malabaricus*, dan *L. sebae*) berada dalam

satu kluster sehingga memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat.



Gambar 1. Variasi sekuens berdasarkan gen cyb

Tabel 2. Tingkat Kesamaan Berdasarkan Gen CYB

No.	Spesimen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>Lutjanus malabaricus</i>	100											
2	<i>Lutjanus erythropterus</i>	99,8	100										
3	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	86	86	100									
4	<i>Oreochromis niloticus</i>	79,7	79,7	78,7	100								
5	<i>Oreochromis sp. 'red tilapia'</i>	79,6	79,6	78,5	94,1	100							
6	<i>Coryphaena hippurus</i>	74,7	74,6	74,6	74,7	74,9	100						
7	<i>Pagrus major</i>	79,2	79,4	79,3	75,8	75,5	73,8	100					
8	<i>Gadus morhua</i>	74,8	74,7	75,2	75,2	74,7	72,2	74,6	100				
9	<i>Lates niloticus</i>	78,2	78,2	78	78,8	78,5	74,8	78,3	74,7	100			
10	<i>Pagellus erythrinus</i>	78,6	78,6	78,8	75,6	75,8	72,4	86	73,9	76,2	100		
11	<i>Sebastes fasciatus</i>	77,5	77,7	77,5	75,6	75,2	72,3	75,8	72,3	75,1	74,9	100	
12	<i>Sebastes mentella</i>	77,4	77,6	77,9	75,5	75,4	72,1	76,1	72,2	75,6	75,5	98,9	100

Diferensiasi spesies Red Fish (*Sebastes*) dengan menggunakan gen CYB dianggap kurang baik karena tingkat kesamaan 98,9%. Hal ini dilihat dari nilai 2% yang telah diajukan sebagai nilai ambang tentatif tingkat perbedaan antara spesies dan genus ikan (Ward, 2009). Spesies *S. mentella* dan *S. fasciatus* ini berbagi habitat yang sama dan menghuni pada interval 1 A aman yang berbeda di laut Atlantik Utara (Atkinson, 1987). Dalam studi Mccusker et al. (2012) mengatakan tiga spesies *Sebastes* dari Atlantik Canada: *S. fasciatus*, *S. marinus* dan *S. mentella*, secara genetik tidak dapat dibedakan. Jenis ikan *Sebastes* di Atlantik diketahui memiliki sekuens mtDNA yang sangat mirip (Sundt dan Johansen 1998). Diferensiasi sekuens gen CYB untuk spesies kakap merah juga kurang bagus karena tingkat kesamaan antara spesies *L. malabaricus* dan *L. erythropterus* sebesar 99,8%. Penelitian sebelumnya Gold et al. (2011) menyatakan bahwa tiga spesies *Lutjanus* Indo-Pasifik (*L. erythropterus*, *L. malabaricus*, dan *L. sebae*) berada dalam satu klaster sehingga memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat.

Seleksi Enzim Restriksi Endonuklease

Berdasarkan hasil kajian variasi nukleotida sebelumnya. Dipilih enzim yang terbaik dalam menunjukkan variabilitas seluruh spesies khususnya spesies kakap dengan spesies lain mengikuti kriteria yang

telah ditetapkan yaitu, pemotongan enzim maksimal tiga kali dan situs pengenalan enzim RE mengapit titik-titik perbedaan (SNP). Seleksi enzim restriksi endonuklease untuk gen CYB adalah enzim *AccI*, *Fnu4HI* dan *Tsp45I*.

AccI

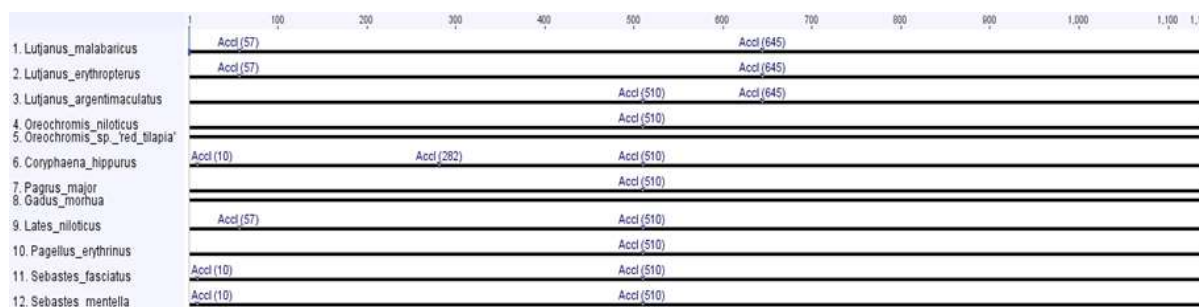
Dari hasil analisis pemilihan enzim yang cocok, ditemukan enzim *AccI* yang menunjukkan variabilitas antara spesies kakap dengan spesies substitusi lainnya. Enzim *AccI* dipilih berdasarkan acuan titik perbedaan nomor ke-644 gen CYB yang sesuai dengan kriteria. Peninjauan dari posisi nukleotida nomor ke-644 menunjukkan bahwa nukleotida kelompok *Lutjanus* adalah Timin (T) sedangkan yang lainnya Sitosin (C) sehingga enzim *AccI* dengan sekuens pengenalan GT[^]MKAC yang memotong pada titik tersebut hanya pada spesies kakap. Hal ini menyebabkan profil RFLP yang dihasilkan menggambarkan pita ketiga spesies kakap cukup dikenali diantara spesies lainnya. Posisi pita sepanjang 590 bp dari *L. malabaricus* dan *L. erythropterus* sekilas hampir sejajar dengan pita sepanjang 632 bp dari spesies lain, tetapi masih dapat diidentifikasi. Spesies *L. argentimaculatus* dapat dibedakan dengan mudah dikarenakan pola restriksi sangat berbeda dari semua spesies. Pada spesies *Oreochromis sp. 'red tilapia'* dan *Gadus morhua* tidak terdapat pemotongan dengan

menggunakan enzim Accl. Akibatnya profil RFLP menunjukkan satu pita saja.

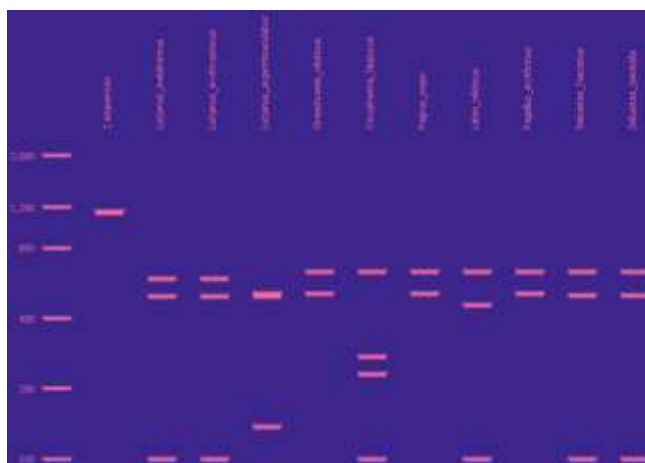
Tabel 3. Lokasi Pemotongan Enzim Accl

No	Spesies	Jumlah pemotongan	Lokasi Pemotongan (blunt - 5' ext. - 3' ext.)
1	<i>Lutjanus malabaricus</i>	2	56/58, *644/646
2	<i>Lutjanus erythropterus</i>	2	56/58, *644/646
3	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	2	509/511, *644/646
4	<i>Oreochromis niloticus</i>	1	*509/511
5	<i>Oreochromis sp. 'red tilapia'</i>	-	-
6	<i>Coryphaena hippurus</i>	1	*509/511
7	<i>Pagrus major</i>	1	509/511
8	<i>Gadus morhua</i>	-	-
9	<i>Lates niloticus</i>	2	*56/58, 509/511
10	<i>Pagellus erythrinus</i>	1	509/511
11	<i>Sebastes fasciatus</i>	2	*9/11, 509/511
12	<i>Sebastes mentella</i>	2	*9/11, 509/511

*: pemotongan dipengaruhi oleh metilasi CpG (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).



Gambar 2. Peta pemotongan enzim Accl



Gambar 3. Visualisasi elektroforesis gel enzim Accl

Fnu4HI

Penemuan enzim dengan sekuens pengenalan GC^NGC ini berdasarkan titik potong pada nukleotida nomor ke-698 di spesies *Pagrus major* dan *Lates niloticus*, yang kemudian ditemukan memotong pada ketiga spesies kakap sebanyak dua kali

dan menghasilkan tiga pita yang berbeda dengan spesies lainnya. Perbedaan profil restriksi dapat dilihat bahwa hanya spesies-spesies kakap yang memiliki tiga pita, spesies lainnya bervariasi antara satu-dua pita, dan empat pita. Simulasi pemotongan enzim restriksi pada kedua spesies

Oreochromis menunjukkan adanya overlapping sites atau situs restriksi yang tumpang tindih. Ketika dua situs restriksi hadir berdekatan atau tumpang tindih satu sama lain dalam DNA atau gen yang akan dikloning, pencernaan ganda bisa sangat bermasalah (Makam et al., 2018). Selain itu, enzim ini tidak dapat memotong

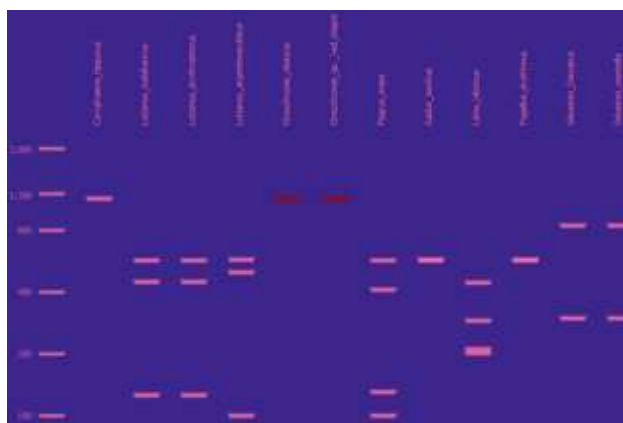
sekuens spesies *Coryphaena hippurus* mengakibatkan munculnya hanya satu pita dalam elektroforesis gel. Dari hasil diatas, enzim *Fnu4HI* menunjukkan bahwa enzim ini dapat membedakan spesies kakap merah (*Lutjanus*) diantara spesies lainnya.

Tabel 4. Lokasi Pemotongan Enzim *Fnu4HI*

No	Spesies	Jumlah pemotongan	Lokasi Pemotongan (blunt - 5' ext. - 3' ext.)
1	<i>Lutjanus malabaricus</i>	2	*569/570, *1017/1018
2	<i>Lutjanus erythropterus</i>	2	*569/570, *1017/1018
3	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	2	*498/499, 569/570
4	<i>Oreochromis niloticus</i>	3	*125/126, 569/570, 572/573
5	<i>Oreochromis sp. 'red tilapia'</i>	3	*125/126, 569/570, *572/573
6	<i>Coryphaena hippurus</i>	-	-
7	<i>Pagrus major</i>	3	569/570, 698/699, 1106/1107
8	<i>Gadus morhua</i>	1	569/570
9	<i>Lates niloticus</i>	3	*210/211, *498/499, 698/699
10	<i>Pagellus erythrinus</i>	1	569/570
11	<i>Sebastes fasciatus</i>	1	*297/298
12	<i>Sebastes mentella</i>	1	*297/298



Gambar 4. Peta pemotongan enzim *Fnu4HI*



Gambar 5. Visualisasi eletroforesis gel enzim *Fnu4HI*

Tsp45I

Enzim *Tsp45I* dengan sekuens pengenalan \wedge GTSAC ditemukan memotong pada titik perbedaan nomor 957 untuk spesies *Lutjanus argentimaculatus*

dan *Pagrus major*. Enzim ini dapat membedakan spesies-spesies kakap di antara spesies lainnya dengan jelas. Profil RFLP yang dihasilkan untuk spesies *L. malabaricus* dan *L. erythropterus*

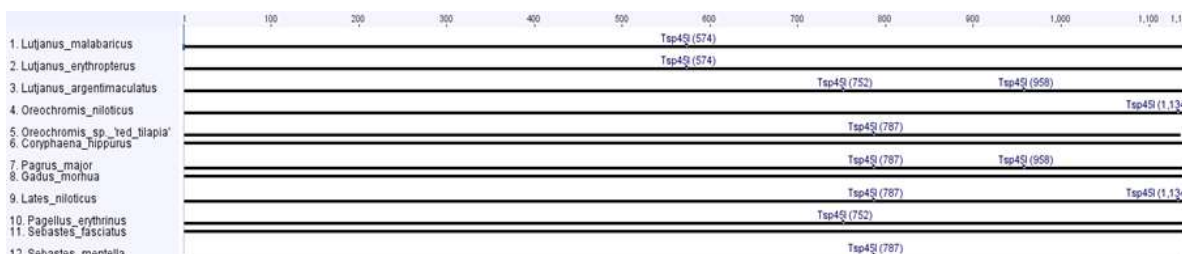
menggambarkan dua pita yang saling berdekatan karena pemotongan pada situs restriksi menghasilkan fragmen 569 bp dan 578 bp. Pita *L. argentimaculatus* juga cukup dibedakan khususnya dengan spesies *Pagrus Major*. Di lain sisi, spesies *Coryphaena hippurus*, *Gadus morhua* dan *Sebastes fasciatus* tidak dapat dipotong oleh enzim ini, sehingga hanya menunjukkan satu fragmen saja. Dengan melihat semua hasil di atas, variabilitas spesies-spesies kakap dapat dibedakan

dengan spesies lainnya menggunakan enzim Tsp45I.

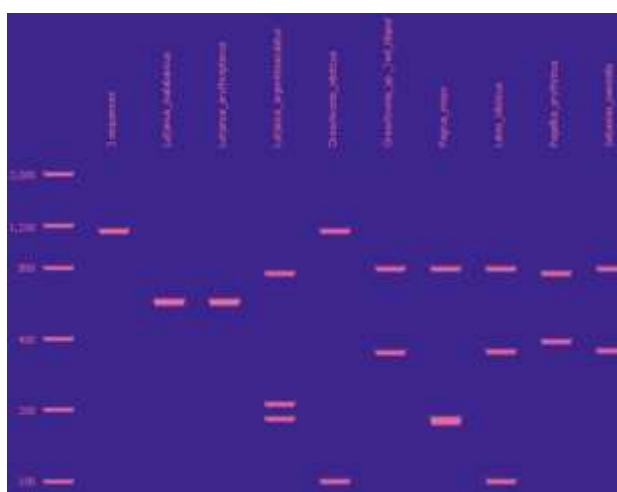
Enzim ini juga tidak terdeteksi kemungkinan terjadi metilasi oleh alat restriksi online Nbcutter. Metilasi diketahui dapat menahan pencernaan restriksi oleh Enzim. Biasanya dengan metilasi di salah satu basa di situs, DNA dilindungi dari pemotongan karena situs pengenalan spesifik dimodifikasi, membuat situs tersebut tidak lagi menjadi substrat untuk pembelahan RE (Davis et al., 1986).

Tabel 5. Lokasi Pemotongan Enzim Tsp45I

No	Spesies	Jumlah pemotongan	Lokasi (blunt - 5' ext. - 3' ext.)	Pemotongan
1	<i>Lutjanus malabaricus</i>	1	573/578	
2	<i>Lutjanus erythropterus</i>	1	573/578	
3	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	2	751/756, 957/962	
4	<i>Oreochromis niloticus</i>	1	1133/1138	
5	<i>Oreochromis sp. 'red tilapia'</i>	1	786/791	
6	<i>Coryphaena hippurus</i>	-	-	
7	<i>Pagrus major</i>	2	786/791, 957/962	
8	<i>Gadus morhua</i>	-	-	
9	<i>Lates niloticus</i>	2	786/791, 1133/1138	
10	<i>Pagellus erythrinus</i>	1	751/756	
11	<i>Sebastes fasciatus</i>	-	-	
12	<i>Sebastes mentella</i>	1	786/791	



Gambar 6. Peta pemotongan enzim Tsp45I



Gambar 7. Visualisasi elektroforesis gel enzim Tsp45I

KESIMPULAN

Dari hasil penjabaran sekuens gen CYB menunjukkan sebanyak sembilan titik unik sebagai pembeda ketiga kakap (Lutjanus) di antara spesies lainnya berada pada nomor 15, 178, 182, 591, 644, 666, 698, 810 dan 957. Seleksi enzim restriksi endonuklease dalam penelitian ini untuk gen CYB adalah enzim *AccI*, *Fnu4HI* dan *Tsp45I* di mana semua enzim ini dapat membedakan spesies kakap merah (Lutjanus) di antara spesies lainnya. Penelitian ini dilakukan secara *in silico* sehingga diperlukan pengujian secara langsung untuk melihat hasil yang aktual. Selain itu, perlu diperiksa konsistensi dari situs pengenalan enzim RE di antara variasi-variasi spesies yang sama untuk menghindari adanya situs restriksi tambahan yang dapat mempengaruhi jumlah dan/atau panjang fragmen.

DAFTAR PUSTAKA

- Anjalia, K.M., A. Mandala, B. Gunalanb, L. Rubana, E. Anandajothia, D. Thineshsanthara, T.G. Manojkumara, & S. Kandan. 2019. Identification of six grouper species under the genus *Epinephelus* (Bloch, 1793) from Indian waters using PCR-RFLP of cytochrome c oxidase I (COI) gene fragment. *FOOD CONTROL*, 101, 39-44.
- Atkinson, D.B. 1987. The redfish resources off Canada's east coast. Prosiding Lowel Wakefield Fisheries Symposium: International Rockfish Symposium, Anchorage, AK (USA). Alaska Sea grant College program report 97-2. Hal: 15-33.
- Badrudin, & Aisyah. 2009. Separate stock of red snapper exploitation and management in the Indonesian sector of the Arafura Sea. *INDONESIAN FISHERIES RESEARCH JOURNAL*, 15(2), 81-88.
- Ceruso, M., C. Mascolo, E. K. Lowe, G. Palma, A. Anastasio, P. Sordino, and T. Pepe. 2018. *Pagellus erythrinus* Mitochondrion, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG653592.1> [diakses 12 November 2020].
- Davis, L., M. Dibner, & J. Battey. 1986. *Methods of Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing, New York.
- Edgar, R. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high through put. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 32(5), 1972-1979.
- Gan, H.M., M.Hammer, J.Voss, H.Takahashi, Y.P. Lee, and M.H. Tan. 2017. *Lates niloticus* Isolate A5135 Mitochondrion, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY213963.1> [diakses 12 November 2020].
- Gold, J., G. Voelker, & M. Renshaw. 2011. Phylogenetic relationships of tropical western Atlantic snappers in subfamily Lutjaninae (Lutjanidae: Perciformes) inferred from mitochondrial DNA sequences. *BIOLOGICAL JOURNAL OF THE LINNEAN SOCIETY*, 102, 915-929.
- Heryadie, H. 2020. Pandemi Covid-19 Masih Berdampak, Penjualan Ikan Laut di Palabuhanratu Turun Drastis. <https://sukabumiupdate.com/detail/sukabumi/ekonomi-dan-bisnis/75974-Pandemi-Covid-19-Masih-Berdampak-Penjualan-Ikan-Laut-di-Palabuhanratu-Turun-Drastis> [diakses 10 oktober 2020].
- Isaacs, R.B., & R.S. Hellberg. 2020. Authentication of red snapper (*Lutjanus campechanus*) fillets using a combination of real-time PCR and DNA barcoding. *FOOD CONTROL*, 118.
- Jiang, Z., X. Gan, M. Zhang, Y. Lin, J. Zhu, and M. Li. 2016. *Oreochromis* sp. 'red tilapia' Mitochondrion, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM067614.1> [diakses 12 November 2020].
- Johansen, S. and I. Bakke. 2010. *Gadus morhua* Mitochondrion, Complete Genome

- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_002081.1 [diakses 12 November 2020].
- Julaika, H. 2020. Pelabelan Produk Jaga Daya Saing Bisnis Perikanan. <https://mediaindonesia.com/read/detail/323313-pelabelan-produk-jaga-daya-saing-bisnis-perikanan> [diakses 10 oktober 2020].
- Kearse, M., R., Moir, A., Wilson, S., Stones-Havas, M., Cheung, S., Sturrock, S., Buxton, A., Cooper, S., Markowitz, C., Duran, T., Thierer, B. Ashton, P. Meintjes, & A. Drummond. 2012. Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data. *BIOINFORMATICS*, 28(12), 1647–1649.
- Kolondam, B.J. 2020. Variasi Sekuens Gen COI untuk DNA Barcoding Ikan Tuna. *MEDIA TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN*, 8(2), 70-75.
- Li, H., Z. Wang, Y. Guo, and C. Liu. 2016. *Lutjanus erythropterus* Mitochondrion, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GQ265897.1> [diakses 12 November 2020].
- Liao, J., Z. Wang, and C. Liu. 2012. *Lutjanus argentimaculatus* Mitochondrion, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN182927.1> [diakses 12 November 2020].
- Makam, S., K. Srirama, V.R. Dirisala, & P.N. Reddy. 2018. An efficient method for integration of PCR fragments into adjacent or overlapping restriction sites during gene cloning. *3 BIOTECH*, 8, 1-5.
- Mccusker, M.R., D. Denti, L. Van Guelpen, E. Kenchington, & P. Bentzen. 2012. Barcoding Atlantic Canada's commonly encountered marine fishes. *MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES*.
- Miya, M., A. Kawaguchi, and M. Nishida. 2016. *Pagrus major* Mitochondrial DNA, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP002949.1> [diakses 12 November 2020].
- Musika, J. and J. Phinchongsakuldit. 2014. *Coryphaena hippurus* Mitochondrion, Partial Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF814117.1> [diakses 12 November 2020].
- Mustinda, L. 2016. Inilah 5 Bahan Makanan yang Paling Sering Dipalsu. <https://food.detik.com/info-kuliner/d-3262236/inilah-5-bahan-makanan-yang-paling-sering-dipalsu> [diakses 10 oktober 2020].
- Oceana. 2013. Oceana Study Reveals Seafood Fraud Nationwide. <https://oceana.org/reports/oceana-study-reveals-seafood-fraud-nationwide> [10 oktober 2020].
- Olmsted, L. 2016. *Real Food/Fake Food: Why You Don't Know What You're Eating and What You Can Do About It*. Algonquin Books, New York.
- Parent, E. and E. Normandeau. 2017. *Sebastes fasciatus* Mitochondrion, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX897946.1> [diakses 12 November 2020].
- Pitcher, T.J., R. Watson, R. Forrest, H.P. Valtýsson, & S. Guénette. 2002. Estimating illegal and unreported catches from marine ecosystems: A basis for change. *FISH AND FISHERIES*, 3, 317–339.
- Poulsen, J.Y., T P. Satoh, T. Sado, J. Hlidberg, H. Ho, and M. Miya. 2020. *Sebastes mentella* 10_SEME Mitochondrial DNA, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LC493910.1> [diakses 12 November 2020].
- Sivaraman, B., G. Jeyasekaran, R.J. Shakila, L. Wilwet, V. Alamelu, S. Aanand, & D. Sukumar. 2019. Molecular identification of *Lutjanus* species by PCR-RFLP analysis of mitochondrial 12S rRNA region. *JOURNAL OF FOOD*

- COMPOSITION AND ANALYSIS, 84, 1-5.
- Sivaraman, B., G. Jeyasekaran, R.J. Shakila, V. Alamelu, L. Wilwet, S. Aanand, & D. Sukumar. 2018. PCR-RFLP for Authentication of Different Species of Processed Snappers Using Mitochondrial D-Loop Region by Single Enzyme. *FOOD CONTROL*, 90, 58-65.
- Sundt, R.C, & T. Johansen. 1998. Low levels of interspecific DNA sequence variation of the mitochondrial 16s rRNA in North Atlantic redfish *Sebastes* (Pisces, Scorpaenida). *SARSIA*, 83, 449–452.
- USDA. 2019. Fish, snapper, mixed species, raw. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/173698/nutrients> [diakses 10 oktober 2020].
- USDA. 2019. Fish, tilapia, raw. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/175176/nutrients> [diakses 10 oktober 2020].
- Vincze, T., J. Posfai, R.J. Roberts. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 31, 3688–3691.
- Wang, Z., Y. Guo, W. Tan, and C. Liu. 2016. *Lutjanus malabaricus* Mitochondrion, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ824741.1> [diakses 12 November 2020].
- Ward, R.D. 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES*, 9, 1077–1085.
- Warner, K., W. Timme, B. Lowell, & M. Hirshfield. 2013. Oceana Study Reveals Seafood Fraud Nationwide. http://oceana.org/sites/default/files/reports/National_Seafood_Fraud_Testing_Results_FINAL.pdf [diakses 10 oktober 2020].
- Winarto, Y. 2018. KKP targetkan produksi kakap capai 30.000 ton tahun ini. <https://industri.kontan.co.id/news/kkp-targetkan-produksi-kakap-capai-30000-ton-tahun-ini> [diakses 10 oktober 2020].
- Yadika, B. 2019. RI Bakal Susul China jadi Produsen Ikan Terbesar di Dunia. <https://www.liputan6.com/bisnis/read/4008280/ri-bakal-susul-china-jadi-produsen-ikan-terbesar-di-dunia> [diakses 10 oktober 2020].
- Yang, L., M. Lu, X. Ye, H. Zhu, F. Gao, Y. Mo, and Z. Huang. 2016. *Oreochromis niloticus* Mitochondrion, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU238433.1> [diakses 12 November 2020].
- Yao, L., Lu, J., Qu, M., Jiang, Y., Li, F., Guo, Y., Wang, L., & Yuxiu, Z. 2020. Methodology and application of PCR-RFLP for species identification in tuna sashimi. *FOOD SCIENCE & NUTRITION*, 8, 1-9.
- Zhang, J., H. Huang, Z. Cai, & L. Huang. 2006. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. *FOOD CONTROL*, 17, 557-563.