

Evaluasi Sekuens Gen 16S rRNA untuk DNA Barcoding Ikan Tuna

(Evaluation of 16S rRNA Gene Sequence for DNA Barcoding of Tuna Fish)

Beivy Jonathan Kolondam

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sam Ratulangi
Jl. Kampus UNSRAT FMIPA, Manado 95115, Indonesia
Corresponding author: beivy.kolondam@unsrat.ac.id

Abstract

For fish product authentication, DNA barcoding has been a reliable tool. This is due to its requirement of a small amount of tissue sample in order to conduct a full analysis for species identification. This research aimed to conduct an assessment for the use of 16S rRNA gene sequence for tuna fish identification through DNA barcoding. Previous *in silico* studies using the COI gene and CYB gene were conducted using the same tuna fish specimens. A comparison of 16S rRNA gene sequence between Bluefin tuna (five species), Yellowfin tuna (three species), and another group of tuna (five species) showed the reliability of this gene in differentiating all species represented by the respective specimens. The multiple sequence alignment of 1695 bp in this research is reliable for accurate identification. All specimens of *Thunnus* (Bluefin group and Yellowfin group) were able to be differentiated with other genera (*Auxis*, *Euthynnus*, and *Katsuwonus*) group in 27 sites. The other tuna fish genera group members are similar in 27 sites and the member *Thunnus* group has a polymorphism in the same location. The similarity among the Bluefin group is 99.3% to 99.8%. The similarity among Yellowfin group is 99.6% to 99.9%. The similarity among the other group is 97.5% to 99.5%. In conclusion, the 16S rRNA gene is a reliable marker for DNA barcoding of tuna fish.

Keywords: *DNA barcoding*; *16S rRNA gene*; *tuna fish*

Abstrak

Untuk kepentingan autentikasi produk-produk dari ikan, DNA barcoding merupakan perangkat yang dapat diandalkan. Ini disebabkan karena metode ini hanya membutuhkan sedikit sampel jaringan untuk analisis identifikasi spesies. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan asesmen penggunaan sekuens gen 16S rRNA untuk identifikasi ikan tuna melalui DNA barcoding. Studi *in silico* sebelumnya untuk gen COI dan gen CYB dilaksanakan menggunakan spesimen ikan tuna yang sama. Perbandingan sekuens gen 16S rRNA antara kelompok ikan tuna Bluefin (lima spesies), kelompok ikan tuna Yellowfin (tiga spesies), dan kelompok ikan tuna jenis lain (lima spesies) menunjukkan kemampuan gen ini dalam membedakan semua spesies. Dari hasil yang diperoleh, penjajaran multisekuens dari 1695 bp dapat diandalkan untuk indentifikasi yang akurat. Semua spesimen genus *Thunnus* (kelompok Bluefin dan kelompok Yellowfin) dapat dibedakan dengan spesimen lainnya pada 27 titik nukleotida. Kelompok tuna jenis lain juga memiliki nukleotida yang seragam di 27 lokasi dibandingkan dengan yang dari genus *Thunnus*. Tingkat kesamaan antar spesimen kelompok tuna Bluefin yaitu 99,3% sampai 99,8%. Tingkat kesamaan antar spesimen kelompok tuna Yellowfin yaitu 99,6% sampai 99,9%. Tingkat kesamaan antar kelompok tuna jenis lain yaitu 97,5% sampai 99,5%. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa gen 16S rRNA merupakan gen yang dapat diandalkan untuk DNA barcoding ikan tuna.

Kata-kata kunci: *DNA barcoding*; *gen 16S rRNA*; *ikan tuna*

PENDAHULUAN

Tuna merupakan spesies ikan yang populer dijual sebagai produk makanan kaleng. Di pasaran juga tersedia produk dalam bentuk-bentuk lain misalnya daging mentah dan dalam bentuk filet beku (Servusova dan Piskata, 2021). Meningkatnya pengolahan makanan dan perdagangan ikan tuna secara otomatis meningkatkan potensi penipuan beberapa

produk makanan olahan (processed food) ikan tuna. Salah satu dari bentuk penipuan ini adalah adanya substitusi spesies, di mana makanan diberikan label yang sesuai (mislabeling) dengan tujuan untuk meningkatkan keuntungan. Dalam mendeteksi dan mencegah adanya substitusi spesies di pasar komersil, telah dikembangkan beberapa metode berdasarkan profil protein dan profil asam

deoksiribonukleat (DNA) dari beragam spesies berbeda (Hellberg dan Morrissey, 2011). Pada masa sekarang, adanya metode DNA barcoding menjadi perangkat biologi molekuler penting untuk autentifikasi spesies-spesies ikan tuna dan banyak produk hasil perikanan lainnya (Hebert *et al.*, 2003; Rasmussen dan Morrissey, 2008).

Meningkatnya praktek pelabelan yang tidak sesuai dari produk-produk berbahan ikan tuna menyebabkan meningkatnya kebutuhan akan pemanfaatan DNA barcoding (Xiong *et al.*, 2019). Proses identifikasi spesies ikan menggunakan fitur-fitur morfologi membutuhkan sumber daya manusia yang kompeten. Pada saat ini, pendekatan morfologi sulit untuk digunakan dalam proses identifikasi untuk autentifikasi produk pangan yang sudah berbentuk filet dan ikan kaleng (Bottero *et al.*, 2007). Di lain sisi, pihak konsumen ikan tuna memiliki hak untuk diinformasikan identitas bahan dari produk yang dibeli, baik ikan mentah maupun ikan hasil proses, sehingga metode identifikasi akurat penting untuk tetap dilakukan (Aranishi *et al.*, 2004).

Adanya teknologi DNA barcoding telah membuka peluang untuk identifikasi spesies menggunakan spesimen jaringan yang dalam jumlah yang sedikit (Dudu *et al.*, 2016). Untuk kasus ikan tuna, digunakan berapa sekuens gen yang berasal dari DNA mitokondria karena bisa diandalkan untuk membedakan banyak dari spesies ikan ini (Wulansari *et al.*, 2015). Penelitian yang memanfaatkan DNA barcoding untuk identifikasi spesies ikan tuna di Indonesia telah dilakukan. Nurilmala *et al.* (2016) dan Wulansari *et al.* (2015) menggunakan gen sitokrom B (CYB) untuk autentifikasi produk ikan tuna. Publikasi Kolondam (2020a) melakukan asesmen terhadap gen COI yang menjadi gen standar DNA barcoding hewan. Hasilnya dianggap kurang memuaskan karena ada beberapa spesies yang identik atau sama persis urutan sekuens DNANYA. Tujuan penelitian ini adalah melakukan asesmen penggunaan gen 16S rRNA untuk identifikasi ikan tuna lewat DNA barcoding. Genom DNA mitokondria yang sama dengan penelitian Kolondam (2020a dan 2020b) digunakan untuk

membandingkan spesies-spesies ikan tuna secara *in silico*.

METODE PENELITIAN

Pemilihan DNA Spesimen Ikan Tuna

Dalam penelitian ini digunakan DNA mitokondria dari spesimen-spesimen yang ada dalam repositori DNA dan dianalisis semuanya secara *in silico*. Komputer dengan sistem operasi Windows 10 (64 bit) digunakan untuk mengolah data. Pengumpulan informasi sekuens DNA dilakukan tanggal 10 Desember 2021 dari laman GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) di Amerika Serikat (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) yang tersedia daring menggunakan aplikasi Google Chrome v96. Urutan sekuens gen 16S rRNA dari spesimen ikan tuna dalam penelitian ini diambil dari genom mitokondria. Informasi detail semua sekuens yang digunakan dalam analisis telah dicantumkan dalam Tabel 1, sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Kolondam (2020a dan 2020b).

Tabel 1 menginformasikan 13 spesimen spesies ikan tuna berbeda beserta nomor aksesinya dalam GenBank. Nomor aksesinya setiap spesimen DNA dicantumkan untuk penelusuran kembali semua spesimen ini. Spesimen-spesimen ini mewakili spesies ikan tuna yang dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu tuna Bluefin, tuna Yellowfin, dan tuna jenis lain. Untuk *Euthynnus lineatus* dan *Allothunnus fallai* tidak dicantumkan untuk dianalisis karena belum ada informasi gen 16S rRNA utuh dalam genom DNA mitokondria yang terdata dalam GenBank. Untuk mempermudah perbandingan dengan hasil penelitian Kolondam (2020a dan 2020b), penelitian ini menggunakan genom mitokondria yang sama (tetapi dengan gen berbeda yaitu gen 16S rRNA) untuk mendapat perbandingan analisis dari satu sumber data individu.

Pemisahan Sekuens Gen 16S rRNA dari Genom DNA Mitokondria

Panjang DNA mitokondria yang diperoleh dari GenBank masing-masing spesimen memiliki panjang 16,5 kbp. Dari tiap spesimen dipisahkan gen 16S rRNA dari gen-gen lain dan dari bagian yang tidak mengkode protein (non-coding region).

Lokus gen-gen ini ditentukan dari keterangan nama gen, region gen (berupa nomor) dalam genomnya, dan CDS (Coding Sequence) sekuens asam amino

yang dikode gen tersebut. Panjang gen 16S rRNA utuh yaitu 1.691-2.692 bp sesuai informasi pemetaan genetik spesimen.

Tabel 1. Nomor akses DNA Mitokondria Spesies Ikan Tuna dari GenBank

No.	Nama Spesies	Nomor akses	Referensi
1	<i>Thunnus alalunga</i> ¹	AB101291.1	Manchado <i>et al.</i> (2016)
2	<i>T. maccoyii</i> ¹	KF925362.1	Li <i>et al.</i> (2016)
3	<i>T. obesus</i> ¹	GU256525.1	Martinez-Ibarra <i>et al.</i> (2016a)
4	<i>T. orientalis</i> ¹	KF906721.1	Chen <i>et al.</i> (2014)
5	<i>T. thynnus</i> ¹	AP006034.1	Satoh <i>et al.</i> (2016)
6	<i>T. atlanticus</i> ²	NC_025519.1	Marques <i>et al.</i> (2016)
7	<i>T. tonggol</i> ²	NC_020673.1	Martinez-Ibarra <i>et al.</i> (2013)
8	<i>T. albacares</i> ²	NC_014061.1	Martinez-Ibarra <i>et al.</i> (2010)
9	<i>Auxis rochei</i> ³	KM651784.1	Li <i>et al.</i> (2014a)
10	<i>A. thazard</i> ³	AB105447.1	Catanese <i>et al.</i> (2008)
11	<i>Euthynnus affinis</i> ³	NC_025934.1	Li <i>et al.</i> (2014b)
12	<i>E. alletteratus</i> ³	NC_004530.1	Infante <i>et al.</i> (2006)
13	<i>Katsuwonus pelamis</i> ³	JN086155.1	Martinez-Ibarra <i>et al.</i> (2016b)

¹⁾ Kelompok Tuna Bluefin; ²⁾ Kelompok Tuna Yellowfin; ³⁾ Kelompok Tuna Jenis Lain

Penjajaran Sekuens Gen CYB

Penjajaran sekuens (sequence alignment) penelitian ini digunakan algoritma MUSCLE berdasarkan Edgar (2004) yang sudah terintegrasi dalam piranti lunak Geneious v5.6. (Kearse *et al.*, 2012). Penjajaran sekuens digunakan untuk menunjukkan perbedaan tiap titik nukleotida di urutan penomoran yang sama untuk spesimen dalam penelitian ini. Tingkat persentase kesamaan disajikan dengan dihitung berdasarkan hasil penjajaran sekuens yang sebelumnya. Sekuens konsensus ditampilkan masing-masing dengan menggunakan notasi-notasi nukleotida baku dari variasi pada titik-titik yang terdapat perbedaan nukleotida.

HASIL DAN PEMBAHASAN

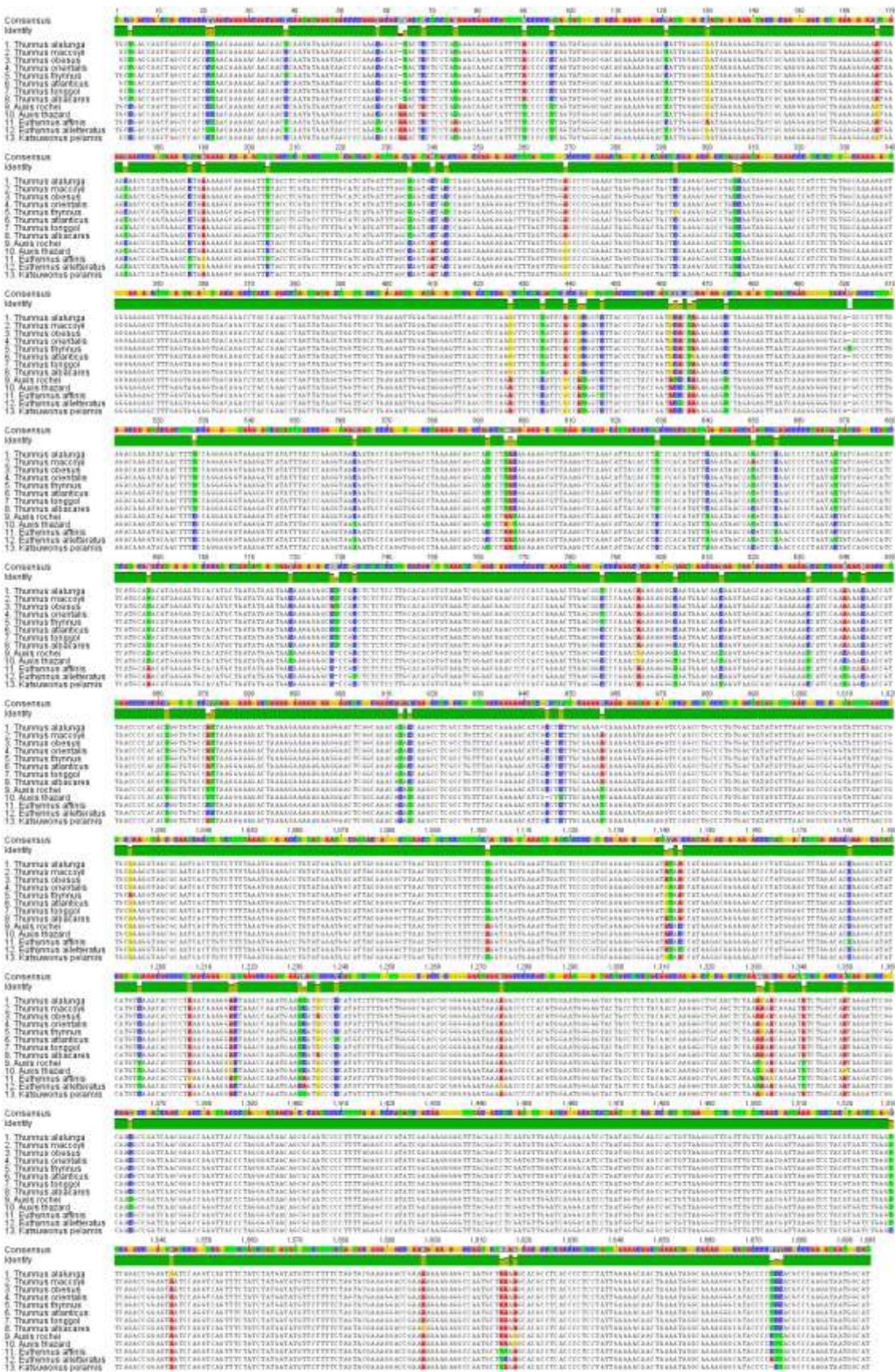
Gen 16S rRNA telah menunjukkan polimorfisme yang baik untuk digunakan sebagai pembeda spesies. Pada Gambar 1 ditampilkan 1.695 bp hasil penjajaran semua spesimen yang mewakili spesies dari kelompok-kelompok ikan tuna. Penjajaran sekuens mendeskripsikan adanya 99 posisi nukleotida yang dapat dibandingkan dan sangat berpotensi untuk membedakan spesies ikan tuna. Dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya, baik gen COI

(Kolondam, 2020a) maupun gen CYB (Kolondam, 2020b) memiliki titik pembeda yang dua kali lebih banyak tetapi spesimen dalam penelitian ini yang dibandingkan menggunakan gen 16S rRNA ini semunya memiliki keunikan. Tidak ada dua sekuens atau spesimen yang identik, berbeda seperti kedua gen yang dibandingkan sebelumnya tersebut.

Dari penjajaran diamati adanya variasi yang lebih kecil di antara anggota genus *Thunnus*, yaitu kelompok tuna Bluefin dan Yellowfin. Variasi yang lebih besar terjadi antara genus *Thunnus* dibandingkan dengan kelompok tuna jenis lain yaitu genus *Auxis*, *Euthynnus*, dan *Katsuwonus*.

Anggota-anggota spesimen dari genus *Thunnus* dapat dibedakan dengan spesimen lainnya pada 27 titik nukleotida. Posisi-posisi nukleotida dari perbedaan ini yaitu nomor 4, 64, 90, 96, 240, 269, 427, 434, 439, 442, 443, 462, 464, 474, 528, 596, 598, 629, 640, 668, 803, 913, 915, 1.142, 1.144, 1196, dan 1.674. Perbedaan ini dapat dilihat pada Gambar 1 yang mendeskripsikan polimorfisme sekuens DNA sepanjang 1.695 nukleotida. Pada posisi 63 terdapat bagian yang bisa dianggap sebagai delesi pada seluruh anggota genus *Thunnus* ketika dibandingkan dengan kelompok tuna jenis

yang lain yang sama-sama memiliki nukleotida A (adenin) pada posisi tersebut.



Gambar 1. Penjajaran (alignment) sekuens gen 16S rRNA spesies ikan tuna

Perbedaan-perbedaan sekuens ini berpotensi dalam mengembangkan metode PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) untuk identifikasi spesies atau kelompok makhluk hidup tertentu secara cepat (Dooley *et al.*, 2005). Dalam metode ini bisa digunakan gen 16S rRNA sebagai gen target yang kemudian potong menggunakan enzim restriksi tertentu yang dirancang khusus merestriksi pada lokasi dengan sekuens DNA spesifik. Pemotongan yang berhasil terjadi bisa dideteksi menggunakan proses elektroforesis gel agarosa, pewarnaan (staining) menggunakan etidium bromida, dan kemudian divisualisasi pita DNA tersebut di bawah sinar ultraviolet menggunakan alat UV-transilluminator. Dari dokumentasi gel dapat diamati dan diambil kesimpulan sesuai dengan tujuan aplikasinya.

Dari Gambar 1 bisa dilihat bahwa tidak ada nukleotida unik yang bisa mencirikan kelompok ikan tuna, misalnya nukleotida yang bisa membedakan antara anggota kelompok Bluefin dengan anggota kelompok Yellowfin maupun dengan kelompok ikan tuna jenis lain. Dari gambar yang sama bisa dilihat juga bahwa kelompok tuna jenis lain juga memiliki

nukleotida yang seragam di 27 lokasi, yaitu posisi nomor 4, 63, 64, 90, 96, 230, 240, 269, 427, 434, 439, 442, 443, 462, 474, 528, 596, 598, 629, 640, 728, 803, 913, 915, 957, 1.598, dan 1.676.

Untuk penelitian ini, tingkat kesamaan antar spesimen kelompok tuna Bluefin yaitu antara 99,3% sampai dengan 99,8%. Tingkat kesamaan antar spesimen kelompok tuna Yellowfin yaitu antara 99,6% sampai dengan 99,9%. Tingkat kesamaan antar kelompok tuna jenis lain yaitu antara 97,5% sampai dengan 99,5%. Tidak ada yang sama antar spesimen di dalam maupun di luar kelompok tuna yang dibandingkan.

Dari segi kesamaan, spesimen dengan tingkat kesamaan tertinggi adalah 99,9% yaitu antara *Thunnus tonggol* dengan *T. maccoyii* juga antara *T. tonggol* dengan *T. atlanticus*. Tingkat kesamaan kedua tertinggi adalah 99,8% antara *T. maccoyii* dengan *T. obesus*, *T. atlanticus*, *T. albacares*. Tingkat kesamaan 99,8% juga terjadi antara *T. obesus* dengan *T. tonggol* dan *T. albacares*. Untuk *T. tonggol* dan *T. albacares* juga memiliki tingkat kesamaan 99,8%. Untuk tingkat kesamaan terendah yaitu 96,1% terjadi antara *T. thynnus* dengan *Euthynnus affinis*.

Tabel 2. Kesamaan Sekuens 16S rRNA dari Ikan Tuna yang terdata di GenBank

No.	Nama Spesies*	Tingkat Kesamaan (%)												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>Thunnus alalunga</i>	100												
2	<i>T. maccoyii</i>	99,4	100											
3	<i>T. obesus</i>	99,3	99,8	100										
4	<i>T. orientalis</i>	99,6	99,5	99,5	100									
5	<i>T. thynnus</i>	99,6	99,4	99,3	99,7	100								
6	<i>T. atlanticus</i>	99,3	99,8	99,7	99,5	99,4	100							
7	<i>T. tonggol</i>	99,4	99,9	99,8	99,6	99,5	99,9	100						
8	<i>T. albacares</i>	99,3	99,8	99,8	99,4	99,2	99,6	99,8	100					
9	<i>Auxis rochei</i>	96,6	96,8	96,8	96,7	96,5	96,7	96,8	96,7	100				
10	<i>A. thazard</i>	96,3	96,6	96,6	96,4	96,2	96,5	96,6	96,5	99,5	100			
11	<i>Euthynnus affinis</i>	96,3	96,3	96,2	96,2	96,1	96,2	96,3	96,3	97,9	97,5	100		
12	<i>E. alletteratus</i>	96,4	96,6	96,6	96,3	96,2	96,5	96,6	96,5	97,8	97,7	98,6	100	
13	<i>Katsuwonus pelamis</i>	97,3	97,5	97,4	97,3	97,2	97,5	97,6	97,5	98,3	98,2	97,9	98,2	100

*) Sesuai spesimen dan nomor akses pada Tabel 1.

Dalam identifikasi spesies, secara khusus pemanfaatannya untuk autentifikasi spesies, gen 16S rRNA sebagai barcode DNA diharapkan mampu membedakan semua spesies ikan tuna. Berdasarkan Tabel 2 dapat dengan mudah ditentukan bahwa harapan ini sudah tercapai. Semua spesimen ikan yang dibandingkan dalam penelitian ini tidak ada yang identik. Hasil

ini berbeda dengan penelitian Kolondam (2020a) sebelumnya yang memiliki sekuens-sekuens yang identik dari perbandingannya menggunakan gen COI. Meskipun gen COI merupakan gen penanda standar, gen ini tidak bisa membedakan beberapa spesies tuna. Di lain sisi, gen 16S rRNA yang bukan merupakan penanda standar untuk DNA

barcoding hewan telah menunjukkan kemampuan yang lebih baik membedakan semua spesimen yang terdiri atas 13 spesies tersebut. Ini tentunya menjadikan gen ini sebagai gen yang bisa diandalkan sebagai pembanding, sekaligus berpotensi untuk dimanfaatkan untuk kepentingan lain, misalnya perancangan metode PCR-RFLP untuk autentifikasi cepat yang dibahas sebelumnya

KESIMPULAN

Sekuens gen 16S rRNA telah mampu membedakan semua spesimen yang mewakili 13 spesies ikan tuna dari kelompok tuna Bluefin, kelompok tuna Yellowfin, dan kelompok tuna jenis lain dari 27 titik perbedaan nuklotida. Ini membuat gen 16S rRNA lebih baik dari gen COI (yang menjadi standar) dan gen ini bisa diandalkan sebagai gen penanda untuk DNA barcoding ikan tuna. Pengembangan metode autentifikasi menggunakan gen ini juga memungkinkan untuk dilakukan di masa depan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aranishi, F., T. Okimoto, dan S. Izumi. (2005) Identification of Gadoid Species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP Analysis. *Journal of Applied Genetics* 46(1): 69–73.
- Bottero, M. T., A. Dalmaso, M. Cappelletti, C. Secchi, dan T. Civera (2007) Differentiation of Five Tuna Species by a Multiplex Primer-extension Assay. *Journal of Biotechnology*, 129(3), 575–580.
- Catanese, G., C. Infante, dan M. Manchado (2008) Complete Mitochondrial DNA Sequences of the Frigate Tuna *Auxis thazard* and the Bullet Tuna *Auxis rochei*. *DNA Sequence*, 19(3), 159-166.
- Chen, C., Y. Li, H. Yu, S. Peng, S. Sun, L. Wang, X. Meng, Y. Huang dan X. Kong (2014) *Thunnus orientalis* Mitochondrion, Complete Genome <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF906721.1> [diakses 30 November 2021]
- Dooley, J.J., H.D. Sage, M.L. Clarke, H.M. Brown, dan S.D. Garrett (2005) Fish Species Identification using PCR-RFLP Analysis and Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis: Application to Detect White Fish Species in Food Products and an Interlaboratory Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3348-3357.
- Dudu, A., T. Barbălată, G. Popa, S. Georgescu, dan M. Costache (2016) Advantages and Limitations of DNA Barcoding in Identifying Commercially-Exploited Fish Species. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 49(1), 45-49.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- Hebert, P.D., A. Cywinska, S.L. Ball dan J.R. de Waard (2003) Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proceedings of Royal Society B Biological Sciences*, 270(1512), 313–321.
- Hellberg, R.S.R., dan M.T. Morrissey (2011) Advances in DNA-Based Techniques for the Detection of Seafood Species Substitution on the Commercial Market. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, 16(4), 308-321.
- Infante, C., G. Catanese dan M. Manchado (2006) *Euthynnus alletteratus* Mitochondrion, Complete Genome. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_004530.1 [diakses 30 November 2021]
- 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, and 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. (2020a) Variasi Sekuens Gen COI untuk DNA Barcoding Ikan Tuna. *Media Teknologi Hasil Perikanan*, 8(2), 70-75.

- Kolondam, B.J. (2020b) Comparison of CYB Gene Sequence for Species Identification of Tuna Fish. *Jurnal Ilmiah Platax*, 8(2), 257-263.
- Li, M., L. Guo, H. Zhang, S. Yang, X. Chen, Z. Meng, dan H. Lin (2014a). *Auxis rochei* Mitochondrion, Complete Genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KM651784.1> [diakses 30 November 2021]
- Li, M., L. Guo, H. Zhang, S. Yang, X. Chen, Z. Meng dan H. Lin (2014b) *Euthynnus affinis* Mitochondrion, Complete Genome. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_025934.1 [diakses 30 November 2021].
- Li, Y., C. Chen, H. Yu, S. Peng, S. Sun, L. Wang, X. Meng, Y. Huang dan X. Kong (2016) The Complete Mitochondrial Genome of the Southern Bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. *Mitochondrial DNA*, 27(6), 3921-3922.
- Manchado, M., G. Catanese, A. Crespo dan C. Infante (2016) *Thunnus alalunga* Mitochondrial DNA, Complete Genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB101291.1> [diakses 30 November 2021].
- Márquez, E.J., J.P. Isaza and J.F. Alzate (2016) Mitochondrial Genome of the Blackfin Tuna *Thunnus atlanticus* Lesson, 1831 (Perciformes, Scrombidae), *Mitochondrial DNA*, 27(3), 1771-1772.
- Martinez-Ibarra, C., S. Ishizaki dan Y. Nagashima (2016a) *Thunnus obesus* Mitochondrion, Complete Genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU256525.1> [diakses 30 November 2021].
- Martinez-Ibarra, C., S. Ishizaki dan Y. Nagashima (2016b) *Katsuwonus pelamis* Voucher KP02-2318 Mitochondrion, Complete Genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN086155.1> [diakses 30 November 2021].
- Martinez-Ibarra, C., S. Ishizaki dan Y. Nagashima (2013) *Thunnus tonggol* Mitochondrion, Complete Genome. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_020673.1 [diakses 30 November 2021].
- Martinez-Ibarra, C., S. Ishizaki, S. dan Y. Nagashima (2010) *Thunnus albacares* Mitochondrion, Complete Genome. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_014061.1 [diakses 30 November 2021].
- Nurilmala, M., U. Widyastuti, W.A. Kusuma, Nurjanah, N. Wulansari, Y. Widyatuti. 2016. DNA Barcoding for Identification of Processed Tuna Fish in Indonesian Market. *Jurnal Teknologi*, 78(4), 115–118
- Rasmussen, R.S., dan Morrissey, M.T. 2008. DNA-based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. *Comprehensive Review of Food Science and Food Safety*, 7(3), 280-295.
- Satoh, T.P., M. Miya, K. Mabuchi, M. Nishida (2016) Structure and Variation of the Mitochondrial Genome of Fishes. *BMC Genomics*, 17(1), 719.
- Servusova, E., Piskata, Z. (2021) Identification of Selected Tuna Species in Commercial Products. *Molecules*, 26(4), 1137.
- Wulansari, N., M. Nurilmala dan Nurjanah (2015) Deteksi Ikan Tuna dan Produk Olahannya Berbasis Protein dan DNA Barcoding. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(2), 119-127.
- Xiong, X., F. Yuan, M. Huang, L. Lu, X. Xiong, J. Wen (2019) DNA Barcoding Revealed Mislabeling and Potential Health Concerns with Roasted Fish Products Sold across China. *Journal of Food Protection*, 82 (7), 1200-1209.