

IDENTIFIKASI IKAN TONGKOL DARI PASAR IKAN KEDONGANAN, KUTA, KABUPATEN BADUNG, BALI

IDENTIFICATION OF ‘TONGKOL’ FISH IN KEDONGANAN FISH MARKET, KUTA, BADUNG DISTRICT, BALI

Alifya Ibnu Aziz, Made Pharmawati, Ni Luh Watiniashih

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam,

Universitas Udayana

Email korespondensi: made_pharmawati@unud.ac.id

ABSTRAK

Ikan tongkol merupakan spesies yang tergolong dalam famili Scombridae. Terdapat berapa jenis ikan tongkol yaitu tongkol abu-abu, tongkol lisong, tongkol komo dan tongkol krai. Secara morfologi, spesies ikan tongkol mirip satu dengan lainnya. Hal ini dapat mengakibatkan kesalahan dalam pencatatan di lapangan dalam menentukan produksi spesies ikan tongkol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi spesies ikan tongkol yang ada di Pasar Ikan Kedongan, Badung, Bali menggunakan gen COI (*Cytochrome C Oxidase Subunit I*). Dua spesies ikan tongkol dibeli dari Pasar Ikan Kedongan, Badung, Bali. Ekstraksi DNA dilakukan dari sirip ikan menggunakan chelex, dilanjutkan dengan amplifikasi ruas gen COI. Produk PCR kemudian dielektroforesis dan disequens. Sekuens DNA dicocokkan dengan database menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang terdapat pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Ekstraksi menghasilkan DNA dengan konsentrasi 5,91 ng/μl dengan rasio A260/A280 = 1,3 untuk sampel 1, sedangkan untuk sampel 2 konsentrasi DNA adalah 6,27 ng/μl dengan rasio A260/A280 = 1,33. Produk PCR yang dihasilkan berukuran sekitar 700bp. Hasil sekuen gen COI memiliki panjang ukuran gen 682 bp untuk kedua spesies ikan. Analisis BLAST menghasilkan persen identitas sebesar 99.84-100% dengan tongkol komo (*Euthynnus affinis*) dan tongkol lisong (*Auxis rochei*).

Kata Kunci: DNA barcoding, ikan tongkol, PCR, sekuensing

ABSTRACT

‘Tongkol’ fishes are species in the family Scombridae. There are many types of ‘tongkol’ fishes, namely longtail tuna, eastern little tuna, frigate tuna and bullet tuna. Morphologically, ‘tongkol’ species are similar to one another. This can result in errors in recording the production of ‘tongkol’ species. The purpose of this study was to identify ‘tongkol’ species collected from Kedongan Market, Badung, Bali using the COI (*Cytochrome C Oxidase Subunit I*) gene. Two species of ‘tongkol’ fish were purchased from Kedongan Market, Badung, Bali. DNA isolation was carried out from fish fins using chelex, followed by amplification of the COI gene segment. The PCR products were then electrophoresed and sequenced. DNA sequences were matched to the database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) found in NCBI. Extraction yielded DNA with a concentration of 5.91 ng/μl with a ratio of A260/A280 = 1.3 for sample 1, while for sample 2 the concentration of DNA was 6.27 ng/μl with a ratio of A260/A280 = 1.33. The resulting PCR product is about 700bp in size. The results of the COI gene sequences had a gene size length of 682 bp for both fish species. BLAST analysis yielded a percent identity of 99.84-100% with eastern little tuna (*Euthynnus affinis*) and bullet tuna (*Auxis rochei*).

Keywords: DNA barcoding, PCR, sequencing, tuna,

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki sumberdaya alam yang melimpah, salah satunya pada sektor sumberdaya laut yang memiliki biodiversitas yang sangat tinggi. Dua per tiga wilayah Indonesia terdiri dari lautan dengan jumlah pulau lebih dari 17.000 serta garis pantai sepanjang 81.000 km (Badan Perencanaan Pembangunan Nasional, 2014). Kondisi geografis tersebut mengakibatkan Indonesia memiliki potensi sumberdaya ikan yang sangat besar.

Ikan tongkol merupakan salah satu ikan yang banyak dikonsumsi masyarakat Indonesia disebabkan karena rasanya yang lezat dan kandungan gizinya yang tinggi. Ikan tongkol termasuk famili Scombridae dan merupakan komoditas ikan air laut yang hidup di perairan lepas pantai dan lautan sampai kedalaman 250 m dengan kadar garam tinggi. Beberapa spesies ikan tongkol adalah tongkol komo (*Euthynnus affinis*), tongkol lisong (*Auxis rochei*), tongkol abu-abu (*Thunnus tonggol*) dan tongkol krai (*Auxis thazard*) (Zulkhasyni, 2014).

Secara morfologi, spesies ikan tongkol sangat mirip satu dengan lainnya mulai dari bentuk tubuh yaitu berbentuk torpedo, memiliki dua sirip punggung serta punggung yang berwarna hitam kebiruan dan perut yang berwarna putih keperakan (Collete and Nauen, 1983). Hal ini dapat mengakibatkan kesalahan dalam pencatatan di lapangan dalam menentukan produksi spesies ikan tongkol (Noegroho dan Chodrijah, 2015). Oleh karena itu, perlu dilakukan pendekatan genetik dalam identifikasi dengan teknik DNA *barcoding*.

DNA *barcoding* merupakan suatu teknik yang digunakan untuk mempercepat dan mempermudah proses identifikasi organisme dengan menggunakan potongan gen tertentu (Bangola *et al.*, 2014). DNA barcode yang baik digunakan pada hewan adalah gen COI yang terdapat pada mitokondria (mtDNA) (Hebert *et al.*, 2003).

Gen mikotokondria COI telah digunakan untuk identifikasi berbagai spesies hewan. Hebert *et al.*, (2003) menjelaskan bahwa dengan menggunakan gen COI yang terletak pada mitokondria, variasi basa nukleotida pada setiap spesies dapat diamati. Gen COI mitokondria juga sudah banyak digunakan dalam identifikasi ikan (Irmawati *et al.*, 2018).

Beberapa keunggulan DNA mitokondria diantaranya sangat efisien dengan 93% mewakili wilayah pengkodean (Chinnery & Hudson, 2013), pewarisan secara maternal (Sharma & Sampath, 2019), tingkat mutasi tinggi (Susanti *et al.*, 2018), dan replikasi yang berlangsung terus menerus (Muthiadin *et al.*, 2018).

Pasar Ikan Kedongan berlokasi di Desa Adat Kedongan, Kecamatan Kuta, Kabupaten Badung, Bali. Pasar Ikan Kedongan ini merupakan sentra pelelangan ikan terbesar dan menjadi pusat pembelian ikan segar untuk seluruh masyarakat yang ada di Bali. Pasar ini menjual berbagai ikan laut segar di antaranya ikan tongkol. Kemiripan morfologi antar ikan tongkol menyebabkan perlu dilakukan identifikasi secara molekuler. Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi ikan tongkol yang ada di pasar ikan Kedongan, Kecamatan Kuta, Provinsi Bali menggunakan gen COI, dan menganalisis hubungan filogeninya.

METODE PENELITIAN

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2022 sampai Mei 2022. Lokasi penelitian yaitu di Pasar Ikan Kedongan, Kuta, Kabupaten Badung, Bali sebagai tempat pengambilan sampel, Laboratorium Bionesia sebagai tempat ekstraksi DNA dan PCR.

Teknik Pengambilan Sampel

Ikan tongkol diambil masing-masing 1 ekor untuk tiap spesies berdasarkan keterangan pedagang di pasar Kedonganan, Badung, Bali yang digunakan untuk analisis molekuler *DNA barcoding*. Sampel diberi kode sampel 1 dan sampel 2. Sampel diambil pada bagian sirip dada sekitar 5 cm menggunakan gunting dan pinset lalu dimasukkan kedalam *ziplock bag* yang berisi es, pengambilan sampel ini didasarkan pada penelitian Holmes *et al.*, (2009).

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan larutan *Chelex 10%*. Sampel sirip ikan yang telah diambil dipotong-potong dan dicacah. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* 0.5 ml. Selanjutnya ke dalam *microtube* ditambahkan *chelex* sampai sampel terendam. *Microtube* 0.5 ml yang telah diisi sampel kemudian di vortex selama 15 detik.

Microtube selanjutnya disentrifus dengan kekuatan 8000 rpm selama 30 detik. *Microtube* dimasukkan ke dalam *heating block* untuk diinkubasi dengan suhu 92°C selama 1 jam. Setiap 30 menit *microtube* kembali di vortex. Setelah 1 jam diinkubasi *microtube* dikeluarkan dari *heating block* dan disimpan di dalam lemari pendingin. Konsentrasi DNA ditentukan dengan menggunakan nanodrop. Kemurnian DNA dianalisis dengan menghitung rasio A260 dengan A280.

Amplifikasi DNA

DNA *template* divortex selama 10 detik dan disentrifus dengan kekuatan 8000 rpm selama 1 menit. Amplifikasi gen COI dilakukan menggunakan pasangan primer (LCO1490 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') dan (HCO2198 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'). Primer ini merupakan primer universal untuk amplifikasi fragmen pasangan basa berukuran 658 bp dari ujung '5 gen mitokondria sitokrom c oksidase subunit I. (Folmer *et al.*, 1994).

Pasangan primer (Fish F1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') dan (Fish R1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') juga digunakan (Ward *et al.*, 2005) Reaksi PCR terdiri dari *master mix* yang berisi dengan ddH₂O, sepasang primer dan *KAPA Ready Mix* dari merek Bioline. Master mix dibuatkan dengan mencampurkan 9 μL ddH₂O, 1.25 μL masing-masing primer Fish F1 dan Fish R1, 12.5 μL *KAPA Ready Mix* dan 1μl DNA.

Amplifikasi DNA menggunakan *thermocycle* dengan pengaturan suhu sebagai berikut: pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 92°C selama 30 detik, annealing pada suhu 50°C dan 55°C selama 30 detik, elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit sebanyak 38 siklus dan satu siklus perpanjangan akhir pada suhu 75°C selama 20 menit.

Visualisasi Produk PCR dan Sekuensing

Produk PCR divisualisasi dengan menggunakan gel agarose 1% dalam larutan SB (Boric acid dan NaOH) buffer. Sebanyak 2μl produk PCR dimasukkan ke dalam sumur gel. Sebagai *size marker* digunakan 100bp DNA ladder. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 200-volt, 120 ampere selama 30 menit.

Visualisasi pita DNA dilakukan dengan pewarnaan menggunakan biotium dan diamati dengan *UV transilluminator*. Produk PCR beserta primer yang digunakan selanjutnya dikirim ke fasilitas sekuensing.

Analisis Data

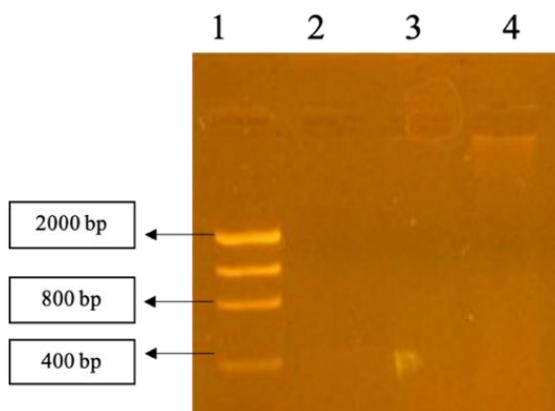
Hasil sekuensing berupa *chromatograph* diubah ke dalam format FASTA dengan menggunakan MEGA X. Urutan DNA yang telah diperoleh dianalisis kesamaan sekuennya dengan data *gene bank* menggunakan BLAST pada situs NCBI. Filogeni antara sampel dengan beberapa spesies tongkol dilakukan menggunakan *neighboring joining tree* (NJ) pada MEGA X dengan pengulangan 1000 *bootstrap*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

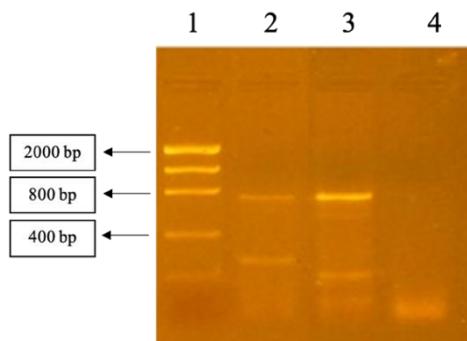
Hasil isolasi DNA menggunakan chelex pada dua spesies tongkol menghasilkan konsentrasi DNA 5,91 ng/ μ l dengan rasio A260/A280=1,3 untuk sampel 1, sedangkan untuk sampel 2 konsentrasi DNA adalah 6,27 ng/ μ l dengan rasio A260/A280 = 1,33.

Amplifikasi DNA menggunakan primer LCO1490 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') dan primer (HCO2198 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') dengan menggunakan suhu annealing 50°C tidak menghasilkan produk untuk kedua sampel. Penggeraan PCR diulang kembali dengan menaikkan jumlah DNA *template* yang berawal dari 1 μ l menjadi 2 μ l, tetapi PCR tetap menunjukkan hasil yang negatif untuk kedua sampel (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA ikan tongkol dengan primer LCO1490 dan HCO2198;
Ladder (1), Sampel 1 (2), Sampel 2 (3), kontrol negatif (4)

Primer kemudian diganti dengan primer forward Fish F1 dan primer reverse Fish R1 dengan suhu annealing 50°C menunjukkan produk PCR yang tidak spesifik yaitu terdapat beberapa pita DNA (Gambar 2).

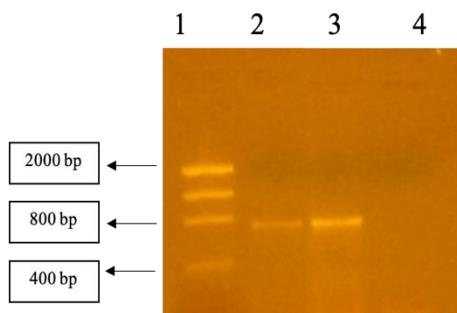


Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA ikan tongkol dengan primer Fish F1 dan Fish R1 pada suhu annealing 50°C; Ladder (1), Sampel 1 (2), Sampel 2 (3), kontrol negatif (4).

Suhu annealing kemudian dinaikkan menjadi 55°C. Hasil amplifikasi yang divisualisasi melalui gel elektroforesi menunjukkan bahwa pada suhu annealing 55°C, produk yang tidak spesifik dapat dihilangkan (Gambar 3).

Tabel 1. Hasil analisis BLAST sampel ikan tongkol

Kode Sampel	Spesies	Max score	Total score	Query Cover	E. Value	Identification	Accession
1	Tongkol komo (<i>Euthynnus affinis</i>)	1144	1144	99%	0.0	99.84%	MH638750.1
2	Tongkol lisong (<i>Auxis rochei</i>)	1149	1149	99%	0.0	100.00%	MH638763.1

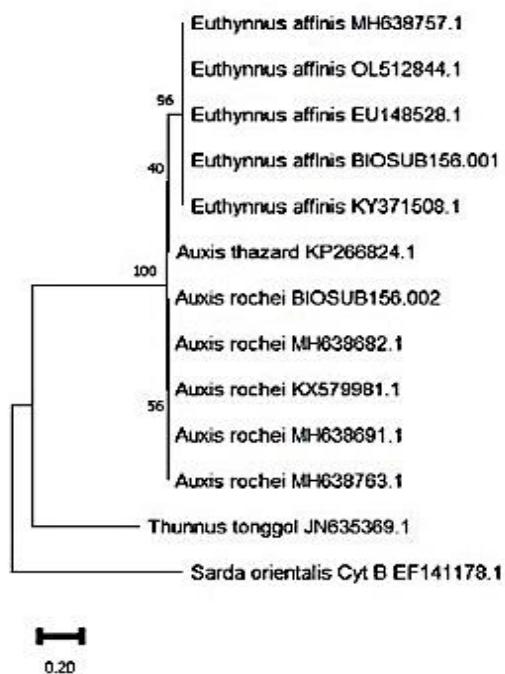


Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA ikan tongkol dengan primer Fish F1 dan Fish R1 pada suhu annealing 55°C; Ladder (1), Sampel 1 (2), Sampel 2 (3), kontrol negatif

Produk PCR ini kemudian disekuensing dan hasil sekuen DNA gen COI tongkol komo adalah 674 bp sedang tongkol lisong menghasilkan panjang sekuen DNA adalah 682 bp. Sekuen gen COI DNA mitokondria tersebut selanjutnya dianalisis pada fitur *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) di NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Hasil BLAST ditunjukkan pada Tabel 1 dimana sampel 1 teridentifikasi sebagai tongkol komo (*Euthynnus affinis*) sedang sampel 2 teridentifikasi sebagai tongkol lisong (*Auxis rochei*).

Filogeni antara tongkol komo (*E. affinis*), tongkol lisong (*A. rochei*) dengan tongkol krai (*A. thazard*) dan tongkol abu-abu (*Thunnus tonggol*) dengan *Sarda orientalis* sebagai outgroup

ditunjukkan pada Gambar 4. Sekuens gen COI *A. thazard*, *T. tonggol* dan *S. orientalis* diambil dari NCBI yang ditunjukkan dengan kode accession number dibelakang nama spesies pada Gambar 4.



Gambar 4. Filogeni antara sampel 1 (BIOSUB 156.001, *E. affinis*), sampel 2 (BIOSUB 156.002, *A. rochei*) dengan *A. thazard* dan *T. tonggol*.

Pembahasan

Konsentrasi DNA yang diperoleh pada sampel 1 (*E. affinis*) dan sampel 2 (tongkol lisong) dengan metode chelex adalah 5,91 ng/μl dan 6,27 ng/μl. Tingkat kemurnian DNA ditentukan dengan rasio A260 dengan A280. Jika rasio A260 dengan A280 adalah 1,8 sampai 2,00, maka DNA dikatakan murni (Sambrook and Russell, 2001). Pada penelitian ini rasio A260 dengan A280 adalah 1,3 dan 1,33. Hal ini menunjukkan DNA yang diekstraksi masih mengandung kontaminan. Walaupun demikian, amplifikasi masih dapat dilakukan.

Amplifikasi gen COI dengan primer Fish F1 dan Fish R1 pada suhu annealing 50°C menghasilkan produk dengan banyak band. Hal ini dapat terjadi karena penggunaan suhu annealing yang tidak tepat. Annealing merupakan tahapan penempelan primer, sehingga pemilihan suhu yang tepat sangat berpengaruh terhadap hasil amplifikasi. Suhu annealing yang terlalu rendah menyebabkan primer dapat menempel pada lokasi lain sehingga menghasilkan produk yang tidak spesifik. Suhu yang terlalu tinggi mengakibatkan primer tidak dapat menempel (Herman *et al.*, 2018)

Sekuensing menghasilkan 674 bp untuk tongkol komo dan 682 bp untuk tongkol lisong. Ukuran produk ini mendekati panjang basa gen COI jika menggunakan primer Fish F1 dan Fish R1 yaitu 700 bp (Torres *et al.*, 2013).

Hasil analisis BLAST menunjukkan kedua sampel tongkol adalah tongkol komo (*E. affinis*) dan *A. rochei* (tongkol lisong). Hasil ini didukung oleh nilai *percent identity* yang tinggi yaitu

99,84% untuk tongkol komo (*E. affinis*) dan 100% untuk sampel yang teridentifikasi sebagai tongkol lisong (*A. rochei*).

Penentuan spesies dilakukan pada *percent identity* (nilai identitas) berkisar 99 – 100%. Jika nilai identitas yang tinggi menunjukkan kesamaan spesies yang tinggi pula. Menurut Madduppa *et al.*, (2013), nilai identitas yang mendekati 100%, dan nilai E = 0 memiliki arti tingkat kesamaan spesies tinggi. Sementara itu menurut Hebert *et al.* (2003) nilai identifikasi di bawah 97% menunjukkan spesies berbeda. Berdasarkan hal tersebut maka hasil BLAST yang diperoleh pada penelitian ini yaitu berkisar 99% - 100% menunjukkan tingkat validasi kesamaan spesies yang tinggi.

Analisis filogeni menunjukkan tongkol komo, tongkol krai dan tongkol lisong berada dalam satu kelompok besar sedang tongkol abu-abu terpisah dari tongkol lainnya. Hal ini sesuai dengan Kumar *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa berdasarkan DNA mitokondria daerah D-loop, Auxis dan Euthynnus membentuk satu cluster, sedang Thunnus membentuk cluster tersendiri yang terpisah dari cluster Auxis dan Euthynnus.

KESIMPULAN

Ikan tongkol yang diambil dari Pasar Ikan Kedongan, Kuta, Kabupaten Badung, Bali teridentifikasi sebagai tongkol komo (*Euthynnus affini*) dengan nilai 99,84% dan tongkol lisong (*Auxis rochei*) dengan nilai 100%. Tongkol komo, tongkol lisong berada dalam satu group bersama tongkol krai.

SARAN

Perlu dilakukan eksplorasi lebih jauh terhadap spesies ikan tongkol di Pasar Ikan Kedongan, Kuta, Badung, Bali maupun di semua Pelabuhan Pendaratan Ikan di Bali

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih disampaikan kepada Yayasan Bionesia atas bantuan selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Perencanaan Pembangunan Nasional. 2014. *Pembangunan Kelautan dalam RPJMN 2015-2019*. Rapat Koordinasi Kementerian Kelautan dan Perikanan, Tema: RKP 2015 dan RPJMN 2015-2019. Bappenas. Jakarta
- Bangola, I., Momuata, L.I., Kumaunanga, M., 2014. Barcode DNA Tumbuhan Pangi (*Pangium edule* R.) berdasarkan Gen matK. *Jurnal Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi*, 3(2), 113-119.
- Chinnery, P.F., Hudson, G. 2013. Mitochondrial Genetics. *British Medical Bulletin*, 106(1), 135-159.
- Collette, B.B., Nauen, C.E. 1983. FAO Species Catalogue. Scrombrids of the World: An Annotated and Illustrated Catalogue of Tunas, Mackerels, Bonitos and Related Species Known to Date. *FAO Fish. Synop.* FAO Rome, 125 (2), 137
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates.

- Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(5): 294- 299.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R. 2003. *Biological Identifications through DNA Barcodes*. Department of Zoology. University of Guelph. Ontario, Canada.
- Herman, Nainggolan, M., Roslim, D.I. 2018. Optimasi Suhu Annealing untuk Empat Primer RAPD pada Kacang Hijau (*Vigna radiata L.*). *Jurnal Dinamika Pertanian XXXIV (I)*: 41-46.
- Holmes, B., Steinke, D., Ward, R.D. 2009. Identification of Shark and Ray Fins using DNA Barcoding. *Fisheries Research*, 95(2-3), 280-288.
- Irmawati, I., Tresnati, J., Fachruddin, L., Arma, N., dan Haerul, A. 2018. Identification of Wild Stock and the First Generation (F1) of Domesticated Snakehead Fish, *Channa* spp. (Scopoli 1777) using Partial Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) gene. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 17(2), 165-173.
- Kumar, G., Kocour, M., Kuna, S.P. 2014. Mitochondrial DNA Variation and Phylogenetic Relationships Among Five Tuna Species Based on Sequencing of D-loop Region. *Mitochondrial DNA Part A*, 27:3, 1976-1980, DOI: 10.3109/19401736.2014.971313
- Muthiadin, C., Aziz, I.R., dan Darojat, A.Z. 2018. DNA Mitokondria untuk Identifikasi Ikan yang Kaya Spesies. In Prosiding Seminar Biologi.
- Noegroho, T., Chodrijah, U. 2015. *Parameter Populasi dan Pola Rekruitmen Ikan Tongkol Lisong (Auxis rochei) di Perairan Barat Sumatera*. *Bawal*, 7(3):129- 136.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Press. University of Texas South Western Medical Centre, Texas. I.47 hlm.
- Sharma, P., Sampath, H. 2019. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells*, 8(2), 100.
- Susanti R, Iswari R.S., Fibriana, F., and Indriawati, I. 2018. The Duck Cytochrome Oxidase I (COI) Gene: Sequence and Patterns Analysis for Potential Barcoding tool. *Biodiversitas* 19(3): 997-1003.
- Torres, R.A., Rafael, B., Feitosa, R.B., Carvalho, D.C., Freitas, M.O., Hostim-Silva, M., Ferreira, B.P. 2013. DNA Barcoding Approaches for Fishing Authentication of Exploited Grouper Species Including the Endangered and Legally Protected Goliath Grouper *Epinephelus itajara*. *Scientia Marina* 77(3):409-418.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N. 2005. DNA Barcoding Australia's Fish Species. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*. 360: 1847-1857
- Wibowo, M. A. Djaelani, and H. P. Kusumaningrum. 2013. Pelacakan Gen Sitokrom Oksidase Sub Unit I (COI) DNA Mitokondria Itik Tegal (*Anas domesticus*) Menggunakan Primer Universal. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, vol. 15, no. 1, pp. 20-26
- Zulkhasyni. 2014. Musim Penangkapan Ikan Cakalang di Perairan Kota Bengkulu, *Jurnal Agroqua: Media Informasi Agronomi dan Budidaya Perairan*, 1(13): 68-73.