Jurnal Agroekoteknologi FP USU *E-ISSN No. 2337- 6597*
Vol.5.No.4, Oktober 2017 (120): 941- 953

Karakterisasi Molekuler*Elaeidobius kamerunicus*Faust. (Coleoptera: Curculionidae) Asal Sumatera Utara Menggunakan Metode *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP)

*Insect Molecular characterizationofElaeidobius kamerunicusFaust.(Coleoptera; Curculionidae) From North Sumatra UsingAmplifiedFragment Length Polymorphism (**AFLP**)*

Mhd. Riza Fahlevi*, Darma Bakti, Suzanna Fitriany Sitepu
Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian USU, Medan 20155
*Coressponding author : E-mail : mhdrfahlevi@gmail.com

ABSTRACT

Elaeidobius kamerunicus introduced to Indonesia in Palm Research Center, Marihat. It is one pollinator to pollinate palm. Genetic changes in these insects cause a decline in palm oil production. The purpose of this study to determine the genetic diversity of it based molecular analysis techniques AFLP using three primers. Primers used are HEX (EcoR1 ACA - Mse1 CTT), FAM (EcoR1 AGG - Mse1 CAG) and FAM (EcoR1 AGG - Mse1 CTT). Analysis of genetic diversity using the MEGA program version 6. Phylogenetic tree using *'Neighbor-Joining Tree'*. AFLP amplification product to 42 samples of genomic it and 3 *Sitophilus oryzae* genomic sample as a control showed a high diversity. The analysis showed that itgenetically grouped separately with*S. oryzae.*Itcontained in districts in North Sumatra has two large groups: group A1 and A2. Group A1 consisting of Ajamu, Bah Birong Ulu, Binanga, Bukit Sentang, Marihat, Padang Madarsah and PT. TPS Sibolga while the Group A2 consists of two regions, namely Marihat and Bah Birong Ulu while *S. oryzae* contained in Medan form their own group.

Keywords:*Elaeidobius kamerunicus*,Amplified Fragment Length Polimorphysm (AFLP), genetic diversity, oil palm

ABSTRAK

*Elaeidobius kamerunicus*diintroduksi ke Indonesia di Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Marihat.*E. kamerunicus* merupakan salah satu pollinator dalam penyerbukan kelapa sawit. Perubahan genetik pada serangga ini menyebabkan turunnya produksi minyak kelapa sawit. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui keragaman genetik *E. kamerunicus*berdasarkan analisis molekuler dengan teknik AFLP menggunakan 3 primer.Primer yang digunakan yaitu HEX (EcoR1 ACA – Mse1 CTT), FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CAG) and FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CTT).Analisis keragaman genetik menggunakan program MEGA Versi 6. Pohon filogenetik menggunakan metode '*Neighbor-Joining Tree'*. Hasil amplifikasi AFLP terhadap 42 sampel genom *E. kamerunicus*dan 3 sampel genom *Sitophilus oryzae*sebagai kontrol menunjukkan adanya keragaman yang tinggi. Hasil analisis menunjukkan bahwa *E. kamerunicus*secara genetikdikelompokkan terpisah dengan*S.oryzae*.Seranggayang terdapat di kabupaten di Sumatera Utara memiliki dua kelompok besar yaitu kelompok A1 dan A2. Kelompok A1 terdiri dari Ajamu, Bah Birong Ulu, Binanga, Bukit Sentang, Marihat, Padang Madarsah dan PT. TPS Sibolga sedangkan Kelompok A2 terdiri dari 2 daerah yaitu Marihat dan Bah Birong Ulu sedangkan *S. oryzae* yang terdapat di Kota Medan membentuk kelompok sendiri.

KataKunci: *Elaeidobiuskamerunicus, Amplified Fragment Length Polimorphysm* (AFLP), keragaman genetik, kelapa sawit

PENDAHULUAN

DiIndonesiakomoditas perkebunan kelapa sawit telah berkembang dari Aceh,Sumatera Utara, Riau, Jambi, SumateraBarat, SumateraSelatan, Bengkulu,Lampung, Kepulauan BangkaBelitung,Jawa Barat, Kalimantan, Sulawesi, Maluku,dan Papua. Produksi kelapa sawit diIndonesia telah meningkat selama sepuluhtahun terakhir ini, sebesar 7,5% per tahun. Faktor yangmendukung tanaman ini mencapaiproduktivitas yang tinggi, diantaranyaadalah tanah, iklim, dan faktor pendukunglain yaitu optimalisasi serangga penyerbuk(Yanti, 2011).Keberhasilan penyerbukan akan meningkatkan fruit set buah tandan sehingga produksi juga meningkat(Arif, 2009).

Serangga merupakan pollinator yang paling efektif dan efisien pada tanaman kelapa sawit. Serangga yang sering berperan sebagai pollinator bunga kepala sawit di dunia adalah *Elaeidobius kamerunicus, E. plagiatus, E. singularis,E. bilineattusm Prosoestus sculplitis, P. minor, Thrips hawaiiensis, Pyroderces sp*dan beberapadari ordo *coleopteran, dipteral,hymenoptera* serta heteropter(Simatupang dan Widyaiswara, 2011).

E. kamerunicus paling efektif karena bersifat spesifik, yaitu dapat beradaptasi dengan baik. Bentuk bunga kelapa sawit sesuai dengan ukuran kumbang yang kecil sehingga kumbang tersebut mudah masuk di sela-sela bunga hingga paling dalam. Kondisi populasi kumbang sawit dalam suatu lingkungan perkebunan kelapa sawit sangat menentukan tingkat keberhasilan dari produksi buah (Erniwati dan Kahono, 2012).

Penyerbukan terjadi karena kumbang ini tertarik dengan aroma bunga jantan, kemudian mendekati, dan saat hinggap di bunga jantan, serbuk sari akan melekat di tubuhnya. Sewaktu hinggap di bunga betina yang mekar (*reseptif*), serbuk sari akan terlepas dari kumbang dan menyerbuki bunga betina. Selain itu, kumbang ini tidak berbahaya dan tidak mengganggu tanaman lain, karena kumbang ini hanya dapat makan dan bereproduksi pada bunga jantan kelapa sawit (Harumi, 2011).

Dalam bidang pemuliaan tanaman, pemanfaatan*E. kamerunicus* hingga saat ini masih terbataspada seleksi dan uji lapangan dengan menggunakankarakter morfologi dalam mendeskripsikan serangga.Karakter morfologi telah banyak dipergunakan,namun karakter morfologi memiliki kendalayaitu adanya faktor lingkungan sehingga perbedaanantar spesies berkerabat dekat seringkali sulit diamati.Kebanyakan karakter sulit dianalisis karenatidak memiliki sistem pengendalian genetik yangsederhana.Oleh karena itu, diperlukan adanya analisis molekuler. Teknik molekuler memberikan peluanguntuk mengembangkan dan mengidentifikasipeta genetik dari suatu kultivar jambu mete. Pendekatangenetika molekuler dengan menggunakanpenanda DNA telah berhasil membentuk penandamolekuler yang mampu mendeteksi gen dan sifatsifattertentu dan mengevaluasi keragaman danevolusi pada tingkat genetik. (Mikkonen*et al*., 2005).

Variasi genetik *E. kamerunicus*dilihat daripolimorfisme yang digambarkan dengan perbedaanpola pita yang dipisahkan berdasarkan ukuran beratmolekul.Data polimorfismedapat digunakan untuk melihat variasi genetik pada populasi *E. kamerunicus*.Variasi tersebut diharapkanterekspresi sampai tingkat fenotip *E. kamerunicus*.Salah satu teknik untuk mendeteksi adanyavariasi genetik adalah AFLP.

KeunggulanteknikAFLPadalah dapat mendeteksi variasi genetik tanpa memerlukan informasi urutan basa genom.Selain itu, teknik AFLP memiliki tingkat reproduksi yang tinggi berdasarkan amplifikasi selektif fragmen hasil digesti genom. Teknik AFLP mampu menganalisis genomsecaramenyeluruh sehingga dihasilkan informasi yang memadai untuk menganalisis variasi genetik(Syam *et al.*, 2012).

BAHAN DAN METODE

Penelitian inidilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) Marihatdimulai bulan Mei sampai September 2016dengan metode *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP).

PELAKSANAAN PENELITIAN

Koleksi Serangga Uji

Serangga uji *E. kamerunicus* diambil dari beberapa kabupaten di Provinsi Sumatera Utara yang telah dikumpulkan oleh Pusat Penelitian Kelapa Sawit di Marihat. Serangga kemudian dikumpulkan dan ditempatkan pada botol yang berisi ethanol 70% dan disimpan ke dalam freezer pada suhu 20^{0}C.

Ekstraksi DNA *E. kamerunicus*

DNA kumbang *E. kamerunicus* diekstraksi menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Tissue) (GeneAid GT100) sesuai dengan instruksi masing-masing pabrikan. Serangga diambil sebagai sampel dan kemudian dihancurkan dengan homogenizer rotor-stator untuk mengekspos sel sebanyak mungkin.

Genotipe *E. kamerunicus* Berdasarkan Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Dilakukan penggabungan DNA dari setiap sampel serangga pada masing-masing daerah pengambilan sampel uji. Perbandingan volume DNA tiap individu sama dengan konsentrasi masing-masing sampel adalah10 ng/µL. Proses AFLP untuk tiap penggabungan sampel DNA menggunakan protokol Vos *et al.* (1995). Protokol tersebut diaplikasikan pada masing-masing perlakuan penggabungan DNA.

Tahapan pada protokol AFLP tersebut adalah sebagai berikut:

- Pemotongan DNA genom: setiap campuran terdiri dari 9,75 µl DNA, 0,3 µl EcoRI (15 U/ µl) (Invitrogen), 0,5 µl Tru9I (10 U/µl) (Promega), 0,6525 µl buffer F (10x), 0,0725 µl buffer H (10x) dan 0,0725 µl 0,5% BSA (buffer dan BSA tersedia bersama dengan masing-masing enzim restriksi). Total larutan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C, kemudian diinkubasi pada suhu 70°C selama 15 menit dan didinginkan hingga suhu kamar.
- Ligasi adaptor dengan fragmen DNA hasil pemotongan: adaptor EcoRI dan Tru9I dipanaskan masing-masing pada suhu 95°C selama 5 menit, kemudian didinginkan perlahan hingga suhu kamar. DNA genom hasil pemotongan kemudian diligasi dengan adaptor dengan mencampur DNA hasil pemotongan dengan adaptor dalam reaksi yang terdiri dari 1,25 µl EcoRI adaptor (Invitrogen), 1,25 µl Tru9I adaptor (Invitrogen), 1,25 µl T4 DNA ligase (1 U/ µl) (Invitrogen), 2,4 µl T4 DNA ligation buffer (5x) (Invitrogen) dan 5,85 µl PCR grade water (Invitrogen). Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 20°C selama 2 jam dan kemudian disimpan pada 4°C hingga akan digunakan. Produk ligase diencerkan 10 kali dengan Ultrapure destillet water (Invitrogen) untuk tahap berikutnya.
- Pre-amplifikasi produk ligasi: satu reaksi amplifikasi terdiri dari 2 µl produk ligasi, 14,76 µl pre-amplification primer mix (Invitrogen), 2 µl PCR buffer (10x), 1,2 µl $MgCl_2$ (25 mM), dan 0,04 µl BioTaq DNA polymerase (Bioline). PCR buffer dan $MgCl_2$ tersedia bersama dengan taq polymerase. PCR dilakukan pada mesin C1000 Touch Cycler (BioRad),dengan program: 20 siklus pada 94°C selama 30 detik, 56°C selama 1 menit dan 72°C selama 1 menit. Hasil pre-amplifikasi diencerkan 50 kali dengan Ultrapure destillet water (Invitrogen) untuk tahap berikutnya.
- Amplifikasi selektif: Satu reaksi terdiri dari 0,1 µl BioTaq DNA polymerase (Bioline), 0,8 µl primer selektif Tru9I (5 µM) (Sigma), 0.8 µl primer selektif EcoRI (5 µM) (Sigma), 2 µl hasil pre-amplifikasi yang sudah diencerkan, 13,3

µl Ultrapure destillet water (Invitrogen), 0,4 µl dNTPs (10 mM) (Promega), 2 µl NH_4 reaction buffer (10x) dan 0,6 µl $MgCl_2$ (50 mM). NH_4 reaction buffer dan $MgCl_2$ tersedia bersama dengan taq polymerase. PCR menggunakan mesin C1000 Touch Cycler (BioRad), dengan program: 94°C selama 2 menit, 13 siklus pada 94°C selama 30 detik, 65°C (annealing temperatur) selama 30 detik dan 72°C selama 1 menit, dan menurunkan annealing temperature 0.7°C setiap siklus. Tahap ini kemudian diikuti oleh 23 siklus pada 94°C selama 30 detik, 56°C selama 30 detik dan 72°C selama 1 menit, kemudian 72°C selama 5 menit.

Ditahap Amplifikasi selektif PCR sampel DNA *E. kamerunicus*menggunakan 3 primer yang terdiri dari (Prasetyo, 2012) :

- HEX (EcoR1 ACA–Mse1 CTT)
- FAM (EcoR1 AGG–Mse1 CAG)
- FAM (EcoR1 AGG–Mse1 CTT)

o Primer selektif diberi label fluoresen yang berbeda sehingga hasil amplifikasi dengan label yang berbeda dapatdigabungsebagai satu sampelpadaanalisis fragmen menggunakan *capillary sequencer*(1stBASE, Malaysia). Profil AFLP pada masing-masing sampel *E. kamerunicus* dibandingkan menggunakan perangkat lunak GeneMarker®*versio*1.97 (SoftGenetics LLC®), untuk perbandingan jumlah individu yang DNA-nya digabung pada protokol BSA-AFLP, dan untuk mengidentifikasi polimorfisme antar DNA sampel *E. kamerunicus.*

Sekuensing Langsung Produk PCR (Polymerase Chain Reaction)

Sampel yang digunakan pada masing-masing produk PCR adalah 10 µl. Dilakukan *direct sequencing* pada hasil amplifikasioleh 1stBASE (Malaysia).

Analisis Keragaman Genetik*E. kamerunicus*

Data AFLPdiolah bentuk skoring data biner lalu dendrogram dikonstruksi menggunakan metode *Neighbor-Joining Tree*, dengan bantuan *MEGA* versi 6(Tamura *et al.*, 2013)

Peubah amatan yang dilakukan yaitu tingkat keragaman genetik *E. kamerunicus* di setiap kabupaten.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA

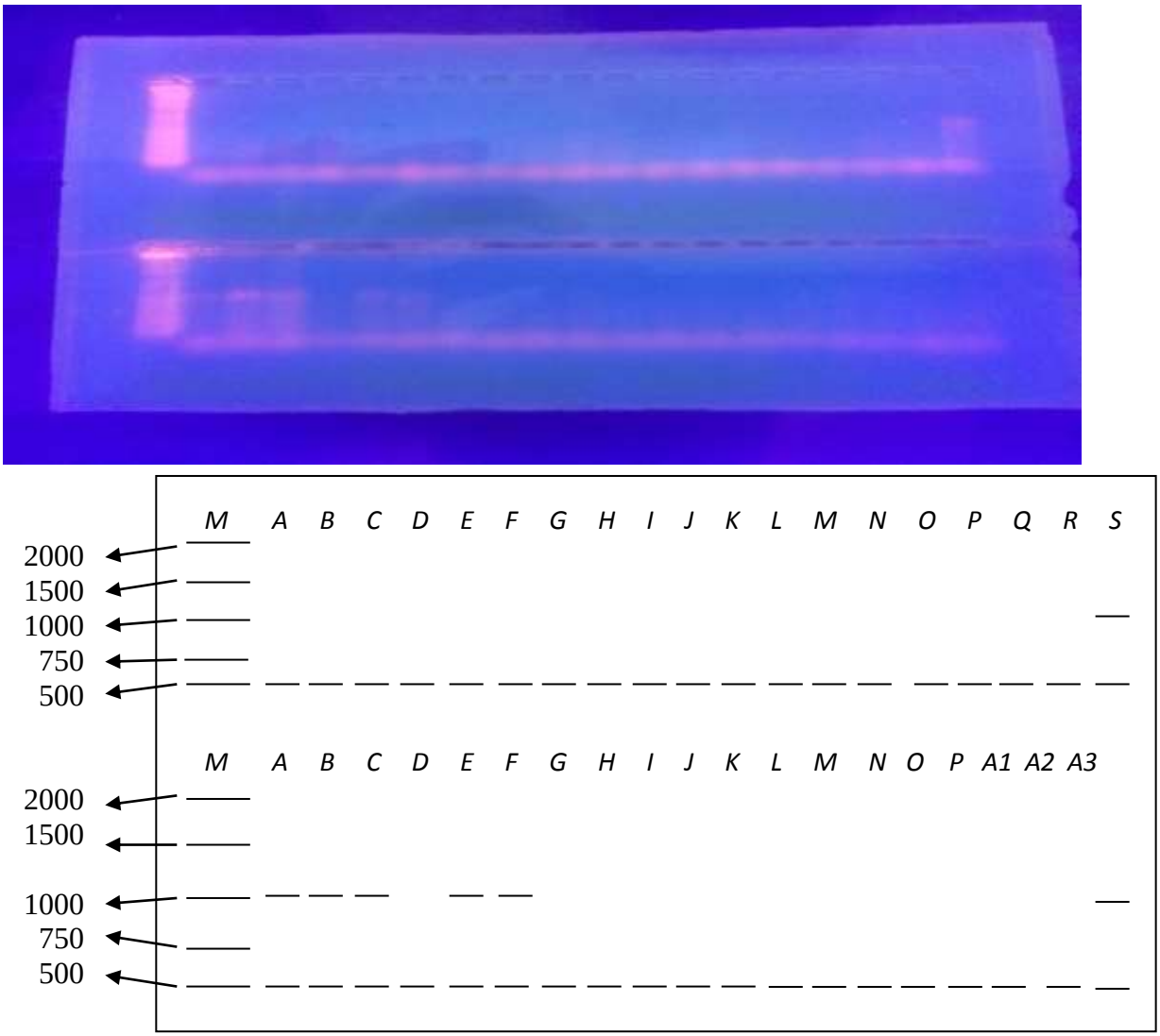
DNA yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil isolasi DNA dari kumbang*E. kamerunicus*sebanyak 42 sampel dan kutu beras sebagai kontrol sebanyak 3 sampel yang diambil dari beberapa daerah di provinsi Sumatera Utara.

Ekstraksi DNA sampel menggunakan metode *Genomic DNA mini kit*(Tissue) (GeneAid GT100). Beberapa faktor yang sangat mempengaruhi keberhasilan proses elektroforesis diantaranya adalah ukuran molekul DNA, konsentrasi gel agarose, konformasi DNA, voltase, keberadaan pewarna DNA dan komposisi buffer elektroforesis.Keberhasilannya dilihat menggunakan elektroforesis gel agarose.

Beberapa metode isolasi DNA yang dilakukan pada penelitian ini memungkinkan hasil isolat DNA yang berbeda.Hal ini bergantung pada efektifitas metode tersebut dalam menghasilkan isolat DNA baik dari segi kualitas maupun kuantitasnya serta efisiensi waktu pengerjaan. Hasil yang diperoleh tergantung pada teknik isolasi yang digunakan dan ketelitian cara pengerjaan. Teknik molekuler bervariasi dalam cara pelaksaan untuk mendapatkan data, baik tekniknya maupun tingkatan target data yang diinginkan sesuai kemudahan pelaksanaan, ketersediaan sumber daya manusia, fasilitas, dan dana (Karp *et al*., 1997 *dalam* Ardiana 2009).

Elektroforesis Gel Agarose

Penelitian menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1%. Konsentrasi gel agarose sangat mempengaruhi laju migrasi DNA pada proses elektroforesis. Hal ini sesuai dengan penelitian Fatciyah (2011) dimana konsentrasi agarose yang digunakan akan menentukan besarnya pori-pori gel yang akan memisah-misahkan DNA. Semakin rendah konsentrasi agarose maka matriks gel akan semakin kecil dan fragmen DNA dapat dipisah semakin jauh berdasarkan ukurannya. DNA yang sudah di ekstraksi langsung di elektroforesismelalui gel agarose dimana untuk melihat dan memperjelas ada atau tidaknya pita DNA dari sampel yang di uji. Elektroforesis gel agarose DNA hasil ekstraksi dapat dilihat pada Gambar1.



Gambar 1.Hasil Elektroforesis DNA hasil ekstraksi *E. kamerunicus*dan *S. oryzae*.Ket: M= marker ladder 1kb, kode sampel A-S (atas) dan A-O (bawah) untuk*E. kamerunicus* dan A1-A3 (bawah) untuk *S. oryzae.*

Hasil positif gel agarosa adalah munculnyapita yang berpendar jika gel dilihat di bawah sinarultraviolet. Hasil negatif elektroforesis gel agarosaadalah tidak adanya pita yang berpendar jika gelagarosa dilihat di bawah sinar UV. Ketebalan danintensitas pita DNA sampel dibandingkan dengan marka DNA yang telah diketahui konsentrasinya.Hasil isolasi DNA*E. kamerunicus* yang didapatkan disimpan pada

suhu 4^{o}C, dan dapat digunakan untuk aplikasi selanjutnya (Syam *et al.*, 2012).

Berdasarkan hasil elektroforesis DNA, hasil ekstraksi penelitian ini tampak jelas tetapi terdapat beberapa sampel yang smear (kabur). Hasil yang jelas akan menyebabkan penempelan primer yang sempurna pada DNA tersebut. Langga *et al* (2012) menjelaskan bahwa penanda genetik (RAPD) sangat sensitif padakondisi reaksi serta kualitas DNA templat.Oleh karena itu diperlukankonsentrasi dan kemurnian DNA primerserta prosedur penyiapan DNA genomkonsisten.

Ekstraksi sampel dengan *Genomic DNA mini kit* berhasil mengisolasi genom kumbang*E.kamerunicus*. Hal tersebut dapat dilihat pada pita genom yang jelas, meskipun masih terdapat smear (kabur). Hasil ekstraksi ini menunjukan bahwa isolasi DNA genom berhasil dengan baik sehingga dapat digunakan untuk analisis selanjutnya yaitu amplifikasi PCR.

Amplifikasi dan Genotyping

Sebanyak 45 sampel pada setiap primernya telah dianalisis menggunakan mesin PCR.Hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa beberapa hasil isolat *E. kamerunicus*tampak jelas, tipis dan sangat tipis hal ini dikarenakan kuantitas dari hasil ekstraksi DNA *E. kamerunicus* yang terlalu sedikit. Yulianti (2006) menjelaskan bahwa untuk mendapatkan metode yang benar dan dapat menghasilkan DNAdengan kualitas dan kuantitas yang tinggi, sebaiknya dilakukan pengujian mengenailangkah-langkah yang dilakukan, bahan-bahan yang digunakan beserta ukurannyaserta eksplan apa yang paling banyak mengandung DNA, sehingga untuk penelitian, DNA yang diperoleh bisa tampak lebih jelas. Pada Gambar 1-4 menunjukkan bahwa produk amplifikasi primer diseparasi dengan elektroforesis gel agarose 1% dan divisualisasikan dengan *UV transimulator*.

Tabel 1. Urutan primer yang dipakai dalam penelitian ini.

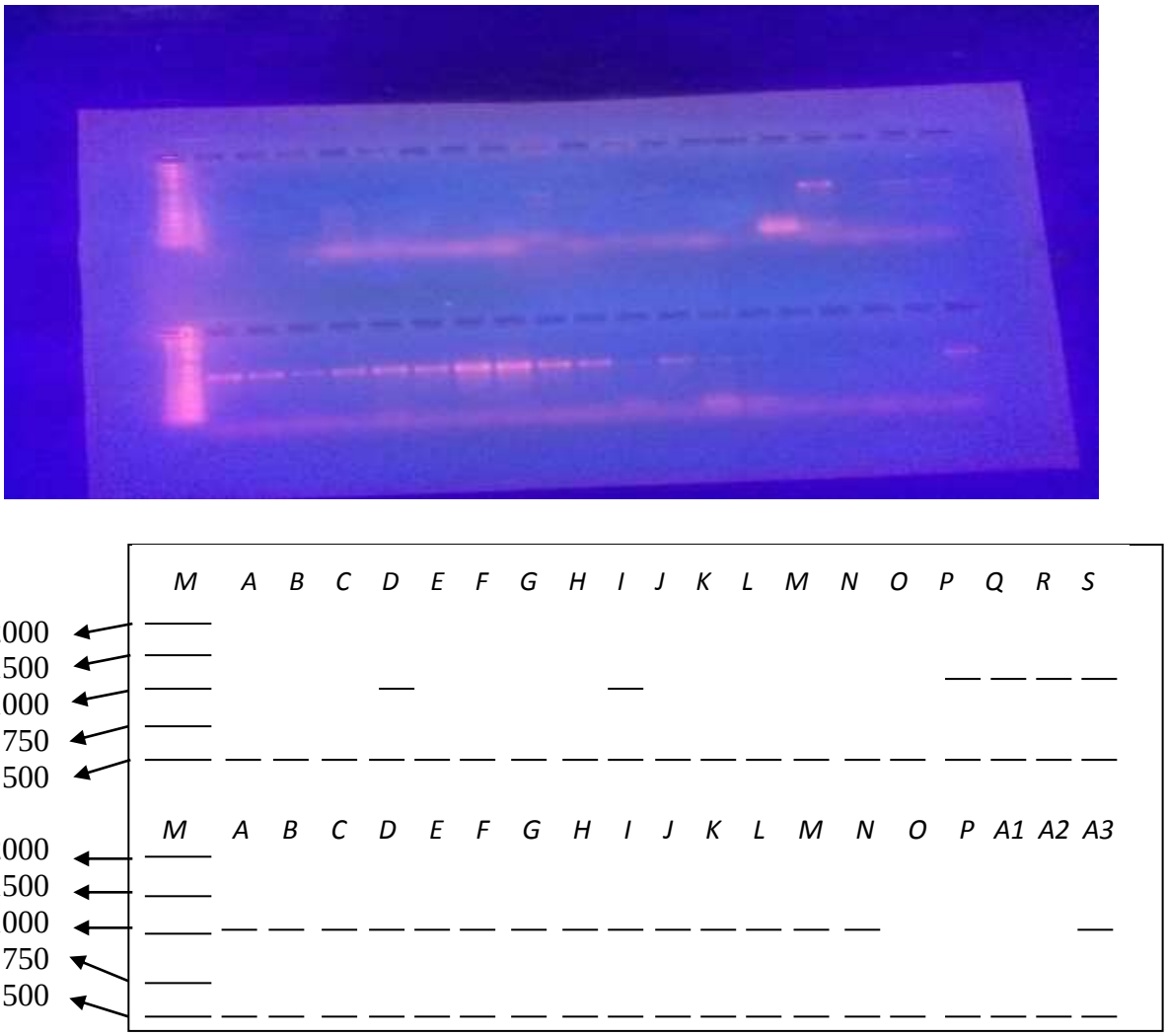
No	Nama Primer	Kombinasi
1.	Hex (EcoR1 ACA – Mse1 CTT)	Kombinasi 16
2.	FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CAG)	Kombinasi 10
3.	FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CTT)	Kombinasi 14

Pada Gambar 3 menampilkan hasil elektroforesis dari tahap Pre-amplifikasi hasil dari produk ligasi sebelumnya.Tahap pre-amplifikasi ini tujuannya untuk lebih menjelaskan penempelan primer pada DNA sehingga tidak terjadi kesalahan. Hal ini sesuai dengan literatur Vos *et al*. (1995), pre-amplifikasibertujuan mengurangi kompleksitas fragmen hasildigesti, sehingga tidak terjadi kesalahan penempelanprimer pada amplifikasi selektif dan mengurangihasil pita smear pada elektroforesis gel poliakrilamid.

Pada Gambar 2merupakan hasil elektroforesis dari tahap restriksi/ligasi.Sampel yang telah didigesti kemudian diligasidengan adapter secara simultan. Adapter merupakanDNA untai ganda yang memiliki panjang sekitar20 pb. Terdapat dua jenis adapter yaitu adapterujung pemotongan *Eco*RI dengan kelebihan basaAATT pada ujung 5’ dan ujung pemotongan *Mse*Idengan kelebihan basa TA pada ujung 5’. Prosesligasi dilakukan dengan bantuan enzim T4 DNAligase yaitu membentuk ikatan fosfodiester antaraujung5’(ujung fosfat) dan ujung 3’(ujung OH) pada untai DNA.Adapter berfungsi menyamakandua ujung pragmen hasil digesti dan sebagaitempat menempelnya primer untuk proses amplifikasiselanjutnya. Hasil positif ligasi dapat dilihatpada akhir proses AFLP karena urutan basa padaprimer sehingga bila proses ligasi gagal maka prosesamplifikasi tidak akan berjalan (Saunders *et al.*,2001).

Pada Gambar 4 menjelaskan hasil elektroforesis tahap selektif amplifikasi dari hasil preamplifikasi sebelumnya.Tahap ini

bertujuan untuk lebih menunjukkan perbedaan ukuran pita yang mampu menggambarkan polimorfisme dari sampel. Menurut Saunders *etal*(2001) basa basaselektif pada primer melekat pada fragmen hasil digesti yang memiliki basa basa berkomplemen.Perbedaan basa–basa selektif pada setiap primermengakibatkan perbedaan amplifikasi fragmen,sehingga menghasilkan perbedaan pita berdasarkanukuran pita yang dihasilkan dari masing–masingsampel. Perbedaan ukuran pita menggambarkanpolimorfisme dari sampel.

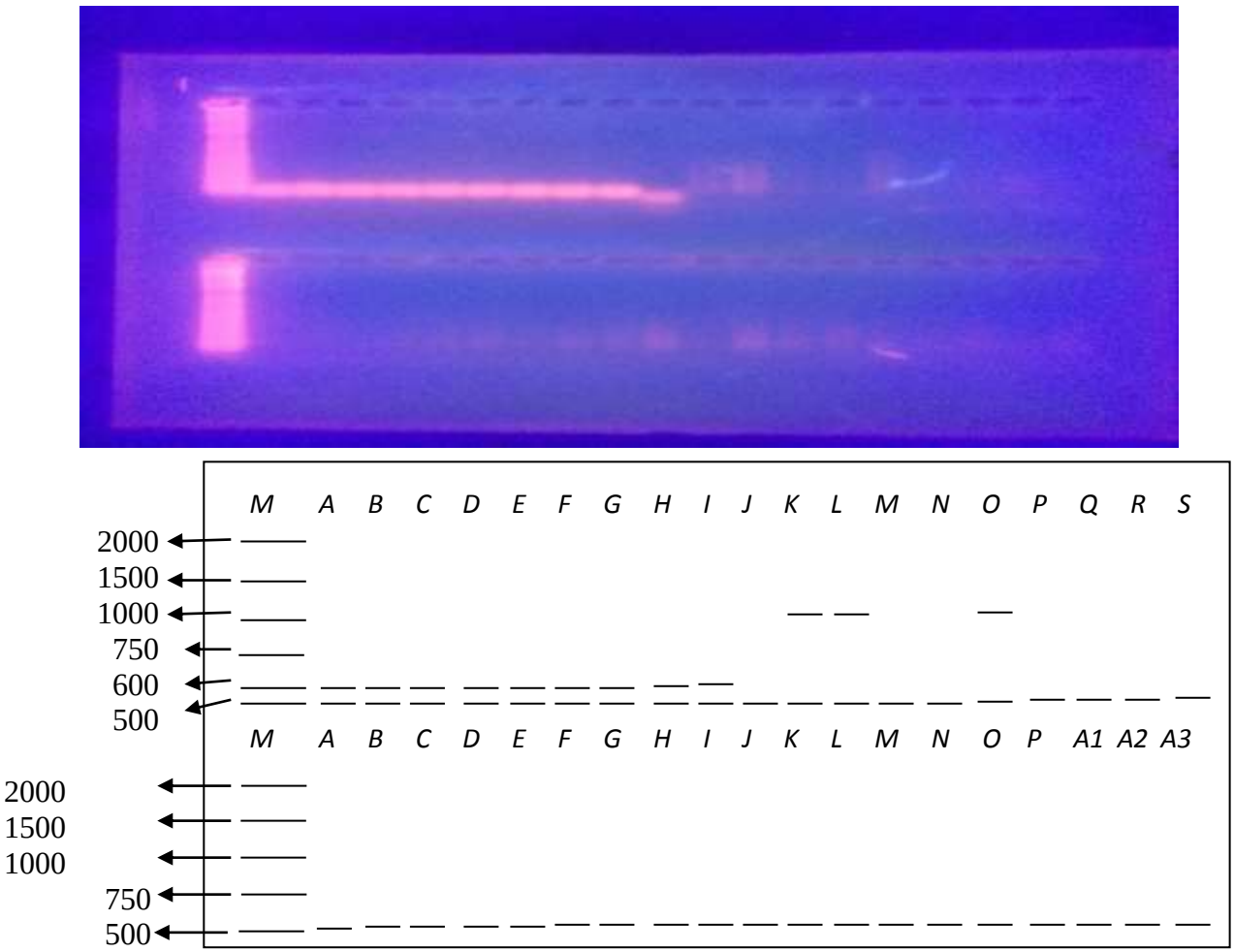


Gambar 2.Hasil Elektroforesis DNA hasil PCR tahap restriksi/ligasi sampel*E.kamerunicus*dan *S. oryzae*. Ket: M= marker ladder 1kb, kode sampel A-S (atas) dan A-O (bawah) untuk *E. kamerunicus* dan A1-A3 (bawah) untuk *S. oryzae.*

Berdasarkan hasil elektroforesis tahap PCR pada Gambar 2-4 terdapat beberapa pita DNA tersebut tidak terbentuk secara sempurna. Pada saat didokumentasikan dengan menggunakan *Gel-doc* terlihat pita-pita yang smear (tidak jelas/kabur). Hal ini disebabkan pita DNA yang tidak terbentuk secara sempurna. Azizah (2009) menyatakan bahwa hasil amplifikasi yang kurang baik dapat disebabkan oleh ketidaksesuaian primer, efisiensi, dan optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik atau sesuai dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Optimasi PCR juga diperlukan

untuk menghasilkan karakter yang diinginkan yang menyangkut suhu denaturasi dan *annealing* DNA dalam mesin PCR. Suhu denaturasi yang rendah dapat meyebabkan belum terbukanya DNA utas ganda sehingga tidak memungkinkan terjadinya penempelan primer.

Proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi karena primer tidak menempel atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi homologinya. Hal ini menyebabkan teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut.Suhu penempelan ini ditentukan berdasarkan primer.

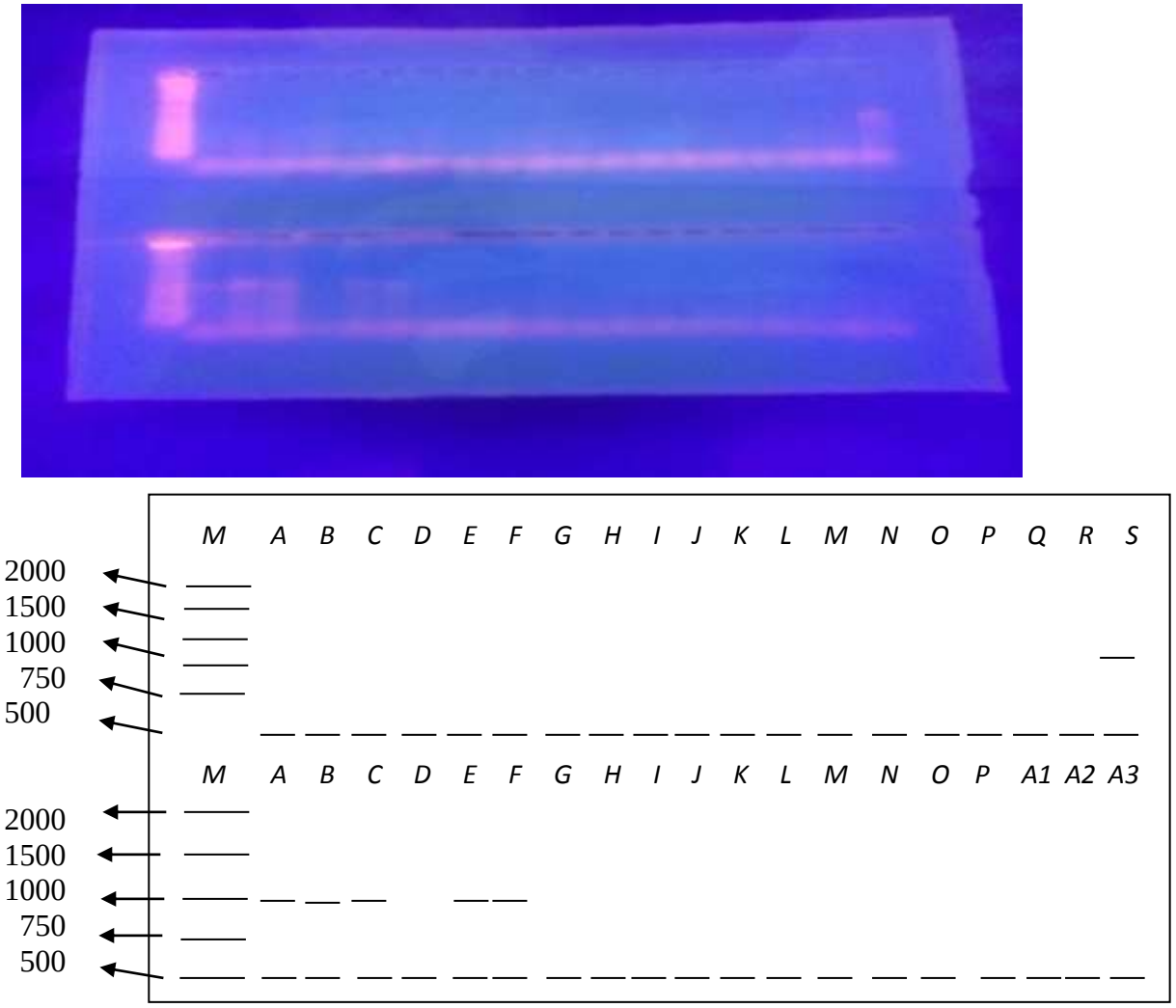


Gambar 3. Hasil Elektroforesis DNA hasil PCR tahap pre-amplifikasi produk ligasi sampel *E. kamerunicus*dan *S. oryzae*. Ket: M= marker ladder 1kb, kode sampel A-S (atas) dan A-O (bawah) untuk *E. kamerunicus* dan A1-A3 (bawah) untuk *S. oryzae.*

Analisis Keragaman Genetik *E. kamerunicus*

Berdasarkan elektroforesis hasil amplifikasi dengan menggunakan 3 primer yaitu HEX (EcoR1 ACA – Mse1 CTT), FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CAG) and FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CTT, diperoleh data berupa skoring untuk menentukan kesamaan genetik antar individu dalam 42 sampel kumbang *E. kamerunicus* dan 3 sampel *S.oryzae*. Sebelum dilakukan pengelompokan hasil analisis keragaman genetik melalui pohon filogenetik (*dendogram*), dilakukan skoring terlebih dahulu untuk mendapatkan data biner yang nantinya akan dianalisis di software MEGA versi 6 dengan menggunakan metode *Neighbor Joining Tree.*

Hasil analisis ini didapati dendogram dengan 2 kelompok besar pada 42 sampel *E.kamerunicus* dan 1 kelompok besar pada 3 sampel*S. oryzae* (Gambar 5). Hasil dendogram pada Gambar 5 menunjukkan bahwa dari 42 sampel kumbang *E. kamerunicus*dan 3 sampel *S. oryzae* terbagi menjadi dua kelompok besar dimana pada kelompok A yang terdiri dari *E. kamerunicus* dari kabupaten di Sumatera Utara terdiri dari 2 kelompok cabang yaitu kelompok A1 yang terdiri dari kumbang *E. kamerunicus*yang berasal dari seluruh kabupaten yang menjadi sampel, sedangkan kelompok A2 terdiri dari kumbang *E. kamerunicus*yang berasal dari Marihat dan Bah Birong Ulu. Kelompok B terdiri dari*S. oryzae* yang sampelnya berasaldari kota Medan dimana Kelompok B memiliki percabangan yaitu sampel Medan 1 berbeda kelompok dengan sampel Medan 2 dan Medan 3.

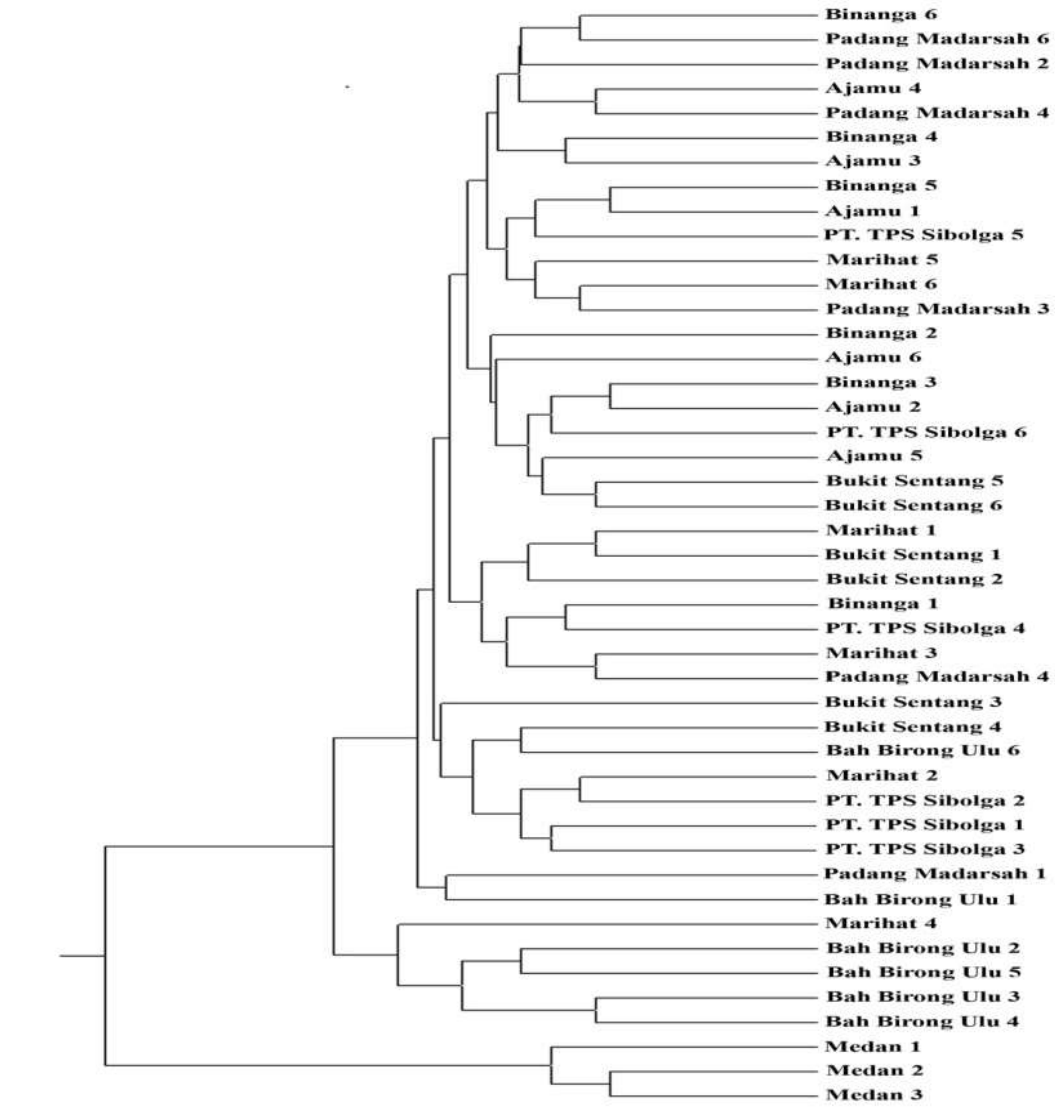


Gambar 4.Hasil Elektroforesis DNA hasil PCR tahap selektif amplifikasi sampel *E.kamerunicus*dan*S. oryzae*. Ket: M= marker ladder 1kb, kode sampel A-S (atas) dan A-O (bawah) untuk *E. kamerunicus* dan A1-A3 (bawah) untuk*S. oryzae.*

Pengelompokkan untuk sampel kumbang *E. kamerunicus* dan kutu beras (*S. oryzae)*berdasarkan marka AFLP menunjukkan perbedaan dankemiripan genetik antar sampel.Perbedaan dankemiripan genetik tersebut dihasilkan berdasarkanpola pita DNA (Mueller dan Wolfenbarger, 1999).Sampel kumbang *E. kamerunicus* yang tergolong dalam satu kelompok memiliki beberapa pola pita yang

mirip dari beberapa kabupaten di Sumatera Utara namun untuk sampel kutu beras dari kota Medan yang tergolong dalam satu kelompok terdapat perbedaan pola pita seperti pada sampel Medan 1 berbeda pola pitanya dengan sampel Medan 2 dan Medan 3.

Pada Gambar 5 dapat dilihat di kelompok *E. kamerunicus* terdapat perbedaan di beberapa sampel yaitu pada sampel Marihat dan Bah Birong Ulu terdapat perbedaan dengan sampel yang berasal dari daerah lain. Perbedaan tersebut muncul karena adanya perbedaan iklim dari setiap sampel. Astuti (2011) menjelaskan bahwa faktor lingkungan utama yang berpengaruh terhadap persebaran makhluk hidup adalah faktor fisik (abiotik) adalah iklim (suhu,kelembaban udara, angin), air, tanah, dan ketinggian permukaan bumi, dan yang termasuk faktor non fisik (biotik) adalah manusia, hewan, dan tumbuh-tumbuhan.



Gambar 5. Pohon filogenetik 42 sampel kumbang *E. kamerunicus* dan 3 sampel*S. oryzae* yang dianalisis berdasarkan software MEGA versi 6 dengan metode *Neighbor Joining Tree.*

Pada penelitian ini dilakukan perbandingan dengan spesies outgroup yaitu *S.oryzae*(kutu beras).Dilihat dari pohon filogenetik pada Gambar5,jarak genetik dan

komposisi sekuens antara *E. kamerunicus* dengan *S. oryzae* menunjukkan kelompok yang berbeda begitu juga dengan hasil yang jauh dan komposisi basanya sangat berbeda.Hal tersebut disebabkan oleh kedua individu tersebut berasal dari kelas yang berbeda sehingga sangat banyak variasi yang digambarkan dari sekuens komposisi basanya.

Kelompok outgroup sangat dibutuhkan dalam pembuatan pohon filogenetik karena moyang terakhir dari suatu kelompok yang lebih modern. Oleh karena itu kelompok outgroup yang dipilih dari penelitian ini merupakan spesies yang berbeda pada tingkatan genus. Spesies yang digunakan moyang adalah*S.oryzae*yang termasuk dalam genus sitophilus. Hasil topologi pohon filogenetik menunjukkan bahwa kelompok outgroup berada pada cabang yang terpisah dengan kelompok sampel*E. kamerunicus.*

SIMPULAN

Analisis filogenetik dari DNA genom*E. kamerunicus* dari berbagai kabupaten di Sumatera Utaradengan menggunakan metode AFLP ditemukan adanya keragaman genetik. Pada pohon filogenetik didapati dua kelompok besar yaitu kelompok A yang terdiri dari kumbang *E. kamerunicus* yang terdapat di beberapa kabupaten di Sumatera Utara, sedangkan kelompok B terdiri dari kutu beras (*S. oryzae)* yang terdapat di Kota Medan Pada Kelompok A memiliki 2 kelompok cabang yaitu Kelompok A1 terdiri dari sampel yang berasal dari seluruh kabupaten dan Kelompok A2 terdiri dari sampel yang berasal dari Marihat dan Bah Birong Ulu Penggunaan primer HEX (EcoR1 ACA – Mse1 CTT), FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CAG) dan FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CTT) dalam metode AFLP dinilai sangat efisien dan tepat untuk serangga *E. kamerunicus* dikarenakan mampu menghasilkan keragaman genetik yang tergolong cukup tinggi dengan koefisien kesamaan yang rendah.

DAFTAR PUSTAKA

Ardiana DW. 2009. Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Pepaya dan Jeruk Dengan Menggunakan Modifikasi Bufer CTAB. Buletin Teknik PertanianVol. 14 No. 1. Hal 12-16.

Arif GA. 2009. Pemanenan Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) dan Identifikasi Serangga Penyerbuk di PT. Bina Sains Cemerlang, Minamas Plantation, Sumatera Selatan. [Skripsi]. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.

Astuti D. 2011. Variasi Gen Mitokondria Cytochrome b pada Dua Jenis Burung Kakatua Putih (*Cacatua alba dan C.Moluccensis*)**.** *Jurnal Biologi Indonesia*, (Online), 7 (2) : 263-276

Azizah A. 2009.Perbandingan Pola PitaAmplifikasi DNA Daun, Bunga, dan Buah Kelapa Sawit Normaldan Abnormal. [Skripsi]. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.

Erniwati dan Kahono S. 2012. Keanekaragaman dan Potensi Musuh Alami Dari Kumbang *Elaeidobius kamerunicus* Faust (Coleoptera: Curculionidae) di Perkebunan Kelapa Sawit Di Kabupaten Penajam Paser Utara, Kalimantan Timur. Vol 21 (2) : 9-5.

Fatchiyah.2011. Isolasi DNA & RNA.Table of Genetic Disorders. Jurusan Biologi. Universitas Brawijaya.

HarumiER. 2011. Populasi Kumbang *Elaeidobius kamerunicus* Faust pada Tanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) Di Ptpn Viii Cimulang, Bogor. [Skripsi]. Fakultas Ilmu Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.

Langga IF., M Restu dan T Kuswinanti. 2012. Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi Dna Tanaman Bitti (*Vitex cofassus Reinw*)Serta Analisis Keragaman Genetik Dengan Teknik Rapd-Pcr. Jurnal Sains dan Teknologi Vol (12) : 3 : 265-276.

Mikkonen T, JMK Koort, KJ Bjorkroth, A Sukura. 2005. Testing of amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique as a tool for molecular epidemiology of Trichinella nativa. Veterinary Parasitology 132 (2005) 19-22

Mueller UG. and Wolfenbarger LL. 1999. AFLP Genotyping and Fingerprinting. Reviews.Tree, V.14.

Prasetyo AE.2012.Aktivitas *Elaeidobius kamerunicus* Faust pada perkebunan kelapa sawit yang berpotensi produksi tinggi.Warta *Pusat Penelitian Kelapa Sawit* 18 (2): 59-65.

Saunders JA, S Mischke, dan Hemeida AA. 2001.*The use of AFLP techniques for DNA fingerprintingin plants*. Beckman Coulter, Inc.,Fullerton.9 hlm.

Simatupang, B dan Widyaiswara. 2011. Pemanfaatan Serangga Penyerbuk Kelapa Sawit (*Elaeidobius kamerunicus*) dalam Upaya Peningkatan Produktivitas Kelapa Sawit. [Skripsi]. Universitas Jambi.

Syam R., Gusti RS dan Muzuni. 2012. Analisis Variasi Genetik Jambumete (*Anacardium Occidentale* L.)Asal Sulawesi Tenggara Menggunakanmarkamolekuler AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphism*). Vol 1 (2) : 164-173.

Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S.2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetiks Analisis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology Evolution*, 24(8): 1596-1599.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., HornesM., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 11 : 4407–4414.

Yanti FA. 2011. Populasi Kumbang *Elaeidobius kamerunicus* Faust padaTanaman Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) Di PtpnViii Kebun Sukamaju, Cikidang, Sukabumi. [Skripsi]. Fakultas Ilmu Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.

Yulianti E. 2006.Pengembangan Teknik Isolasi DNA TumbuhanMenggunakan Detergen Komersial [Skripsi]. Yogyakarta.

.