

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

**Insect Molecular characterization of *Elaeidobius kamerunicus* Faust.
(Coleoptera ; Curculionidae) From North Sumatra Using
Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

Mhd. Riza Fahlevi^{*}, Darma Bakti, Suzanna Fitriany Sitepu, Agus Eko Prasetyo¹

¹Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Marihat

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian USU, Medan 20155

^{*}Coessponding author : E-mail : mhdrafahlevi@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*. It contained 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 genetik dikelompokkan terpisah dengan *S.oryzae*. Serangga yang 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.

Kata Kunci: *Elaeidobius kamerunicus*, Amplified Fragment Length Polimorphysm (AFLP), keragaman genetik, kelapa sawit

PENDAHULUAN

Di Indonesia komoditas perkebunan kelapa sawit telah berkembang dari Aceh, Sumatera Utara, Riau, Jambi, Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Bengkulu, Lampung, Kepulauan Bangka Belitung, Jawa Barat, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, dan Papua. Produksi kelapa sawit di Indonesia telah meningkat selama sepuluh tahun terakhir ini, sebesar 7,5% per tahun. Faktor yang mendukung tanaman ini mencapai produktivitas yang tinggi, diantaranya adalah tanah, iklim, dan faktor pendukung lain 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. bilineatus*, *Prosoestus sculplitis*, *P. minor*, *Thrips hawaiiensis*, *Pyroderces* sp dan beberapa dari ordo *coleopteran*, *dipteral*, *hymenoptera* serta *heteropter* (Simatupang dan Widayaiswara, 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 terbatas pada seleksi dan uji lapangan dengan menggunakan karakter morfologi dalam mendeskripsikan serangga. Karakter morfologi telah banyak dipergunakan, namun karakter morfologi memiliki kendala yaitu adanya faktor lingkungan sehingga perbedaan antar spesies berkerabat dekat seringkali sulit diamati. Kebanyakan karakter sulit dianalisis karena tidak memiliki sistem pengendalian genetik yang sederhana. Oleh karena itu, diperlukan adanya analisis molekuler. Teknik molekuler memberikan peluang untuk mengembangkan dan mengidentifikasi peta genetik dari suatu kultivar jambu mete. Pendekatan genetika molekuler dengan menggunakan penanda DNA telah berhasil membentuk penanda molekuler yang mampu mendeteksi gen dan sifat sifat tertentu dan mengevaluasi keragaman dan evolusi pada tingkat genetik. (Mikkonen *et al.*, 2005).

Variasi genetik *E. kamerunicus* dilihat dari polimorfisme yang digambarkan dengan perbedaan pola pita yang dipisahkan berdasarkan ukuran berat molekul. Data polimorfisme dapat digunakan untuk melihat variasi genetik pada populasi *E. kamerunicus*. Variasi tersebut diharapkan terekspresi sampai tingkat fenotip *E. kamerunicus*. Salah satu teknik untuk mendeteksi adanya variasi genetik adalah AFLP.

Keunggulan teknik AFLP adalah 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 genom secara menyeluruh sehingga dihasilkan informasi yang memadai untuk menganalisis variasi genetik (Syam *et al.*, 2012).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Pusat

Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) Marihat dimulai bulan Mei sampai September 2016 dengan 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°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 adalah 10 ng/ μ L. 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 μ L DNA, 0,3 μ L EcoRI (15 U/ μ L) (Invitrogen), 0,5 μ L Tru9I (10 U/ μ L) (Promega), 0,6525 μ L buffer F (10x), 0,0725 μ L buffer H (10x) dan 0,0725 μ L 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 μ L EcoRI adaptor (Invitrogen), 1,25 μ L Tru9I adaptor (Invitrogen), 1,25 μ L T4 DNA ligase (1 U/ μ L) (Invitrogen), 2,4 μ L T4 DNA ligation buffer (5x) (Invitrogen) dan 5,85 μ L 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 destiliet water (Invitrogen) untuk tahap berikutnya.
- Pre-amplifikasi produk ligasi: satu reaksi amplifikasi terdiri dari 2 μ L produk ligasi, 14,76 μ L pre-amplification primer mix (Invitrogen), 2 μ L PCR buffer (10x), 1,2 μ L MgCl₂ (25 mM), dan 0,04 μ L BioTaq DNA polymerase (Bioline). PCR buffer dan MgCl₂ tersedia bersama dengan taq polymerase. PCR dilakukan pada mesin C1000 Touch Cyclyer (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 destiliet water (Invitrogen) untuk tahap berikutnya.
- Amplifikasi selektif : Satu reaksi terdiri dari 0,1 μ L BioTaq DNA polymerase (Bioline), 0,8 μ L primer selektif Tru9I (5 μ M) (Sigma), 0,8 μ L primer selektif EcoRI (5 μ M) (Sigma), 2 μ L hasil pre-amplifikasi yang sudah diencerkan, 13,3 μ L Ultrapure destiliet water (Invitrogen), 0,4 μ L dNTPs (10 mM) (Promega), 2 μ L NH₄ reaction buffer

(10x) dan 0,6 µl MgCl₂ (50 mM). NH₄ reaction buffer dan MgCl₂ 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)
- Primer selektif diberi label fluoresen yang berbeda sehingga hasil amplifikasi dengan label yang berbeda dapat digabung sebagai satu sampel pada analisis fragmen menggunakan *capillary sequencer* (1stBASE, Malaysia). Profil AFLP pada masing-masing sampel *E. kamerunicus* dibandingkan menggunakan perangkat lunak GeneMarker[®] versio 1.97 (Soft Genetics 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 amplifikasi oleh 1stBASE (Malaysia).

Analisis Keragaman Genetik *E. kamerunicus*

Data AFLP diolah 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.

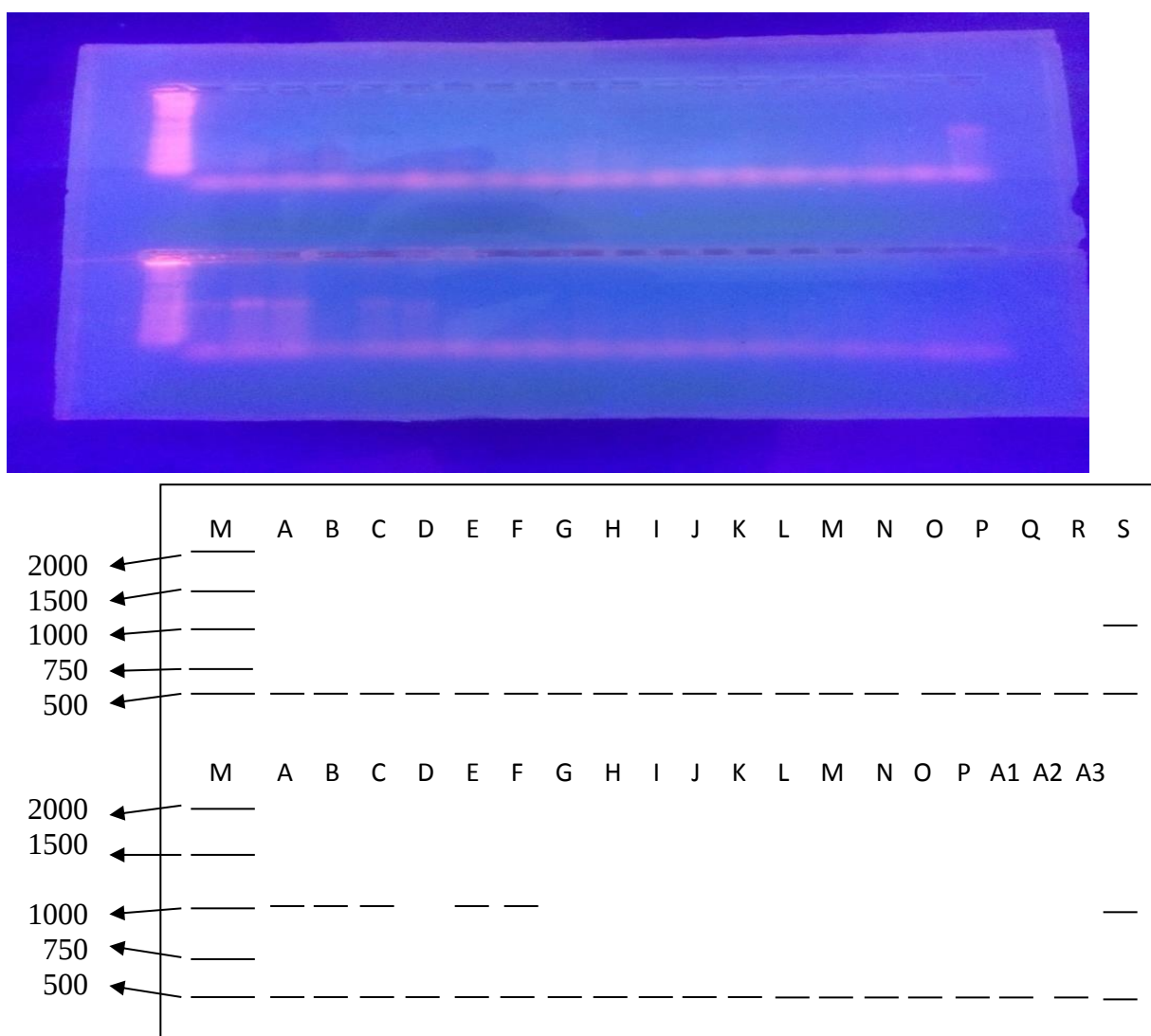
Beberapa metode isolasi DNA yang dilakukan pada penelitian ini memungkinkan hasil isolat DNA yang berbeda. Hal ini bergantung pada efektifitas metode tersebut dalam menghasilkan isolat DNA baik dari segi kualitas maupun kuantitasnya serta efisiensi waktu pengerjaan. Hasil yang diperoleh tergantung pada teknik isolasi yang digunakan dan ketelitian cara pengerjaan. Teknik molekuler bervariasi dalam cara pelaksanaan 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 elektroforesis melalui 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 Gambar 1.



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 munculnya pita yang berpendar jika gel dilihat di bawah sinar ultraviolet. Hasil negatif elektroforesis gel agarosa adalah tidak adanya pita yang berpendar jika gel agarosa dilihat di bawah sinar UV. Ketebalan dan intensitas pita DNA sampel dibandingkan

dengan marka DNA yang telah diketahui konsentrasinya. Hasil isolasi DNA *E. kamerunicus* yang didapatkan disimpan pada suhu 4°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 pada kondisi reaksi serta kualitas DNA templat. Oleh karena itu diperlukan konsentrasi dan kemurnian DNA primer serta prosedur penyiapan DNA genom konsisten.

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 menunjukkan 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 DNA dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi, sebaiknya dilakukan pengujian mengenai langkah-langkah yang dilakukan, bahan-bahan yang digunakan beserta ukurannya serta 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*.

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-amplifikasi bertujuan mengurangi

kompleksitas fragmen hasil digesti, sehingga tidak terjadi kesalahan penempelan primer pada amplifikasi selektif dan mengurangi hasil pita smear pada elektroforesis gel poliakrilamid.

Tabel 1. Urutan primer yang dipakai dalam penelitian ini.

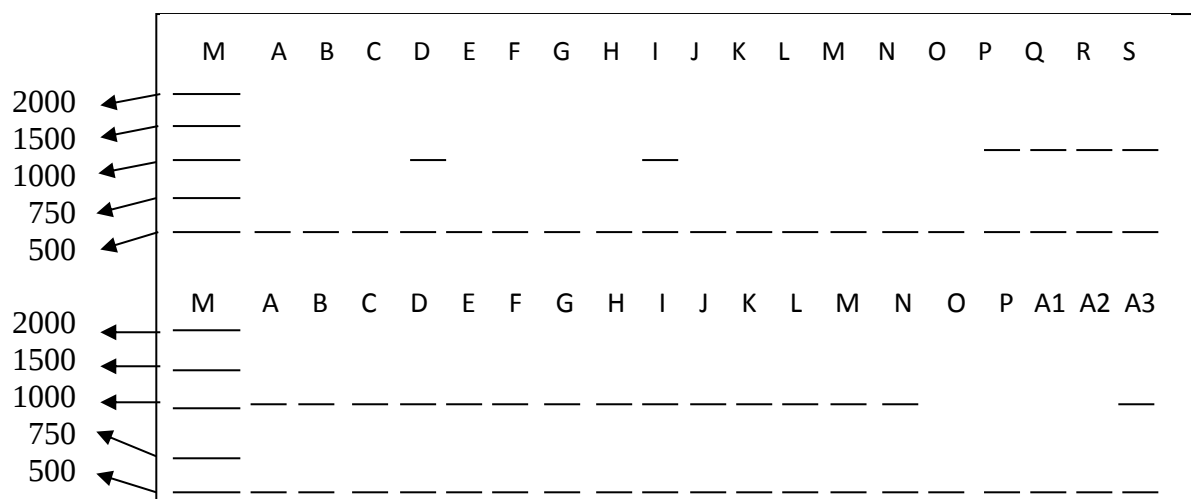
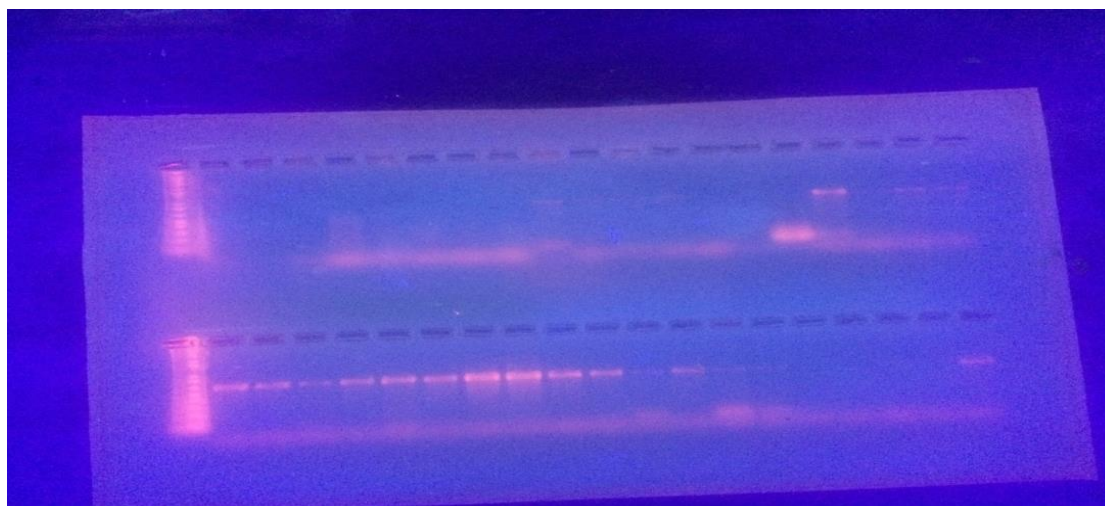
No	Nama Primer	Kombinasi
1.	Hex (EcoR1 ACA – Mse1 CTT)	Kombinasi 16
2.	FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CAG)	Kombinasi 10
3.	FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CTT)	Kombinasi 14

Pada Gambar 2 merupakan hasil elektroforesis dari tahap restriksi/ligasi. Sampel yang telah didigesti kemudian diligasi dengan adapter secara simultan. Adapter merupakan DNA untai ganda yang memiliki panjang sekitar 20 pb. Terdapat dua jenis adapter yaitu adapter ujung pemotongan *EcoRI* dengan kelebihan basa AATT pada ujung 5' dan ujung pemotongan *MseI* dengan kelebihan basa TA pada ujung 5'. Proses ligasi dilakukan dengan bantuan enzim T4 DNA ligase yaitu membentuk ikatan fosfodiester antara ujung 5' (ujung fosfat) dan ujung 3' (ujung OH) pada untai DNA. Adapter berfungsi menyamakan dua ujung fragmen hasil digesti dan sebagai tempat menempelnya primer untuk proses amplifikasi selanjutnya. Hasil positif ligasi dapat dilihat pada akhir proses AFLP karena urutan basa pada primer sehingga bila proses ligasi gagal maka proses amplifikasi 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 *et al* (2001) basa basa selektif pada primer melekat pada fragmen

hasil digesti yang memiliki basa basa berkomplemen. Perbedaan basa-basa selektif pada setiap primer mengakibatkan perbedaan amplifikasi fragmen, sehingga menghasilkan

perbedaan pita berdasarkan ukuran pita yang dihasilkan dari masing-masing sampel. Perbedaan ukuran pita menggambarkan polimorfisme 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*.

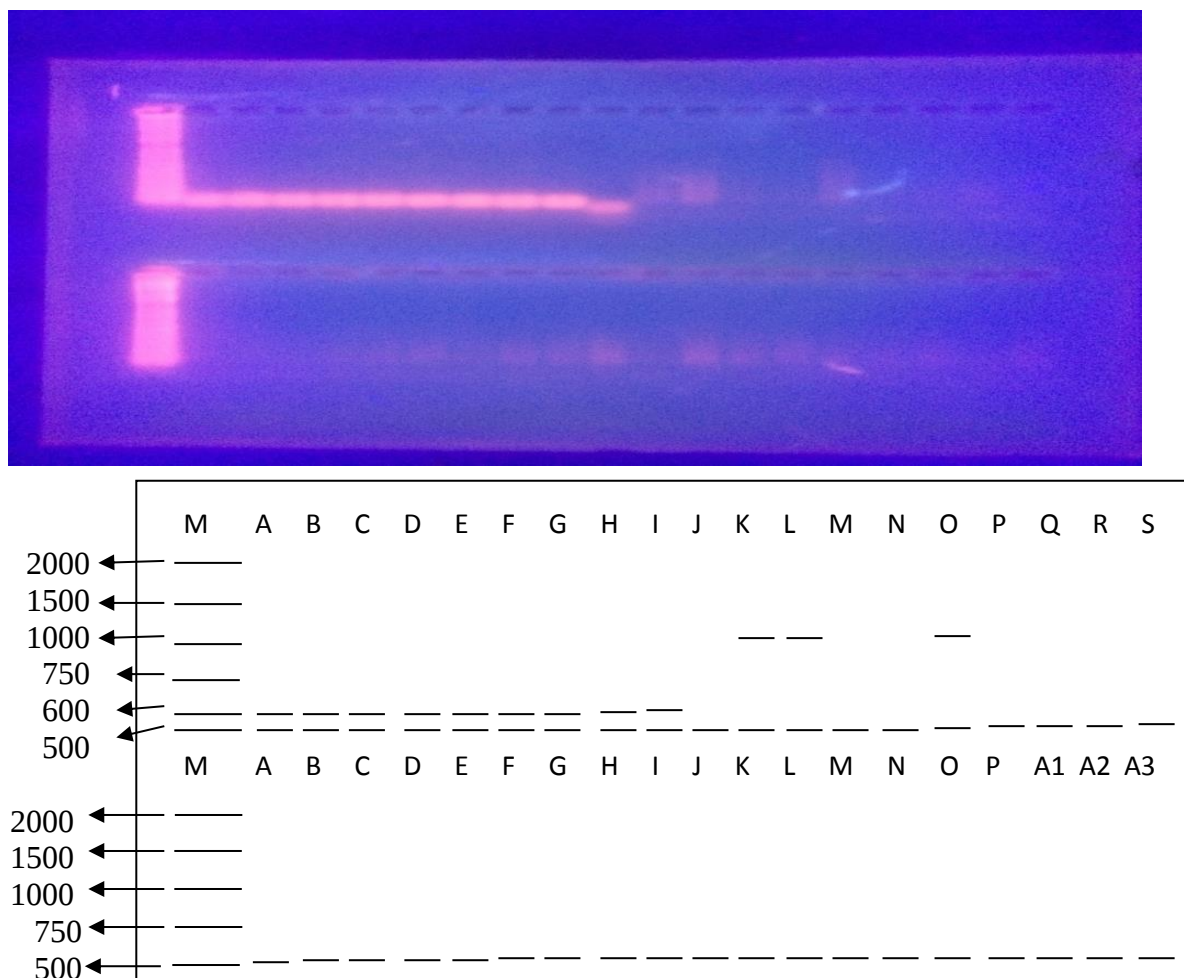
Berdasarkan hasil elektroforesis tahap PCR pada Gambar 2-4 terdapat beberapa pita DNA tersebut tidak terbentuk secara sempurna. Pada saat didokumentasikan dengan menggunakan *Gel-doc* terlihat pita-pita yang smear (tidak jelas/kabur). Hal ini disebabkan pita DNA yang tidak terbentuk secara sempurna. 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 menyebabkan 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 homolognya. 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*

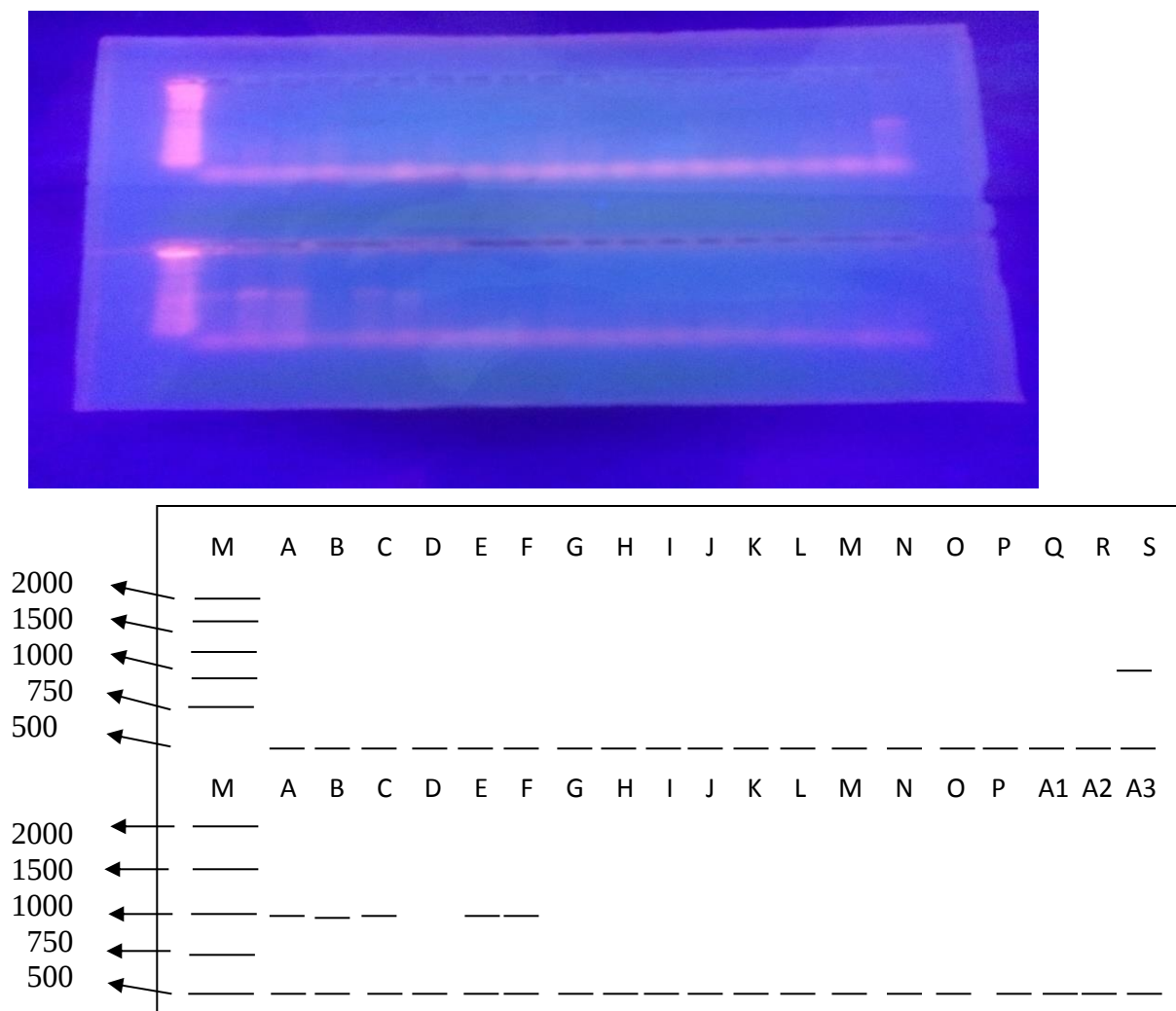
Berdasarkan elektroforesis hasil amplifikasi dengan menggunakan 3 primer yaitu HEX (EcoR1 ACA – Mse1 CTT), FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CAG) and FAM (EcoR1 AGG – Mse1 CTT, diperoleh data berupa skoring untuk menentukan kesamaan genetik antar individu dalam 42 sampel kumbang *E. kamerunicus* dan 3 sampel *S.oryzae*. 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 berasal dari 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*.

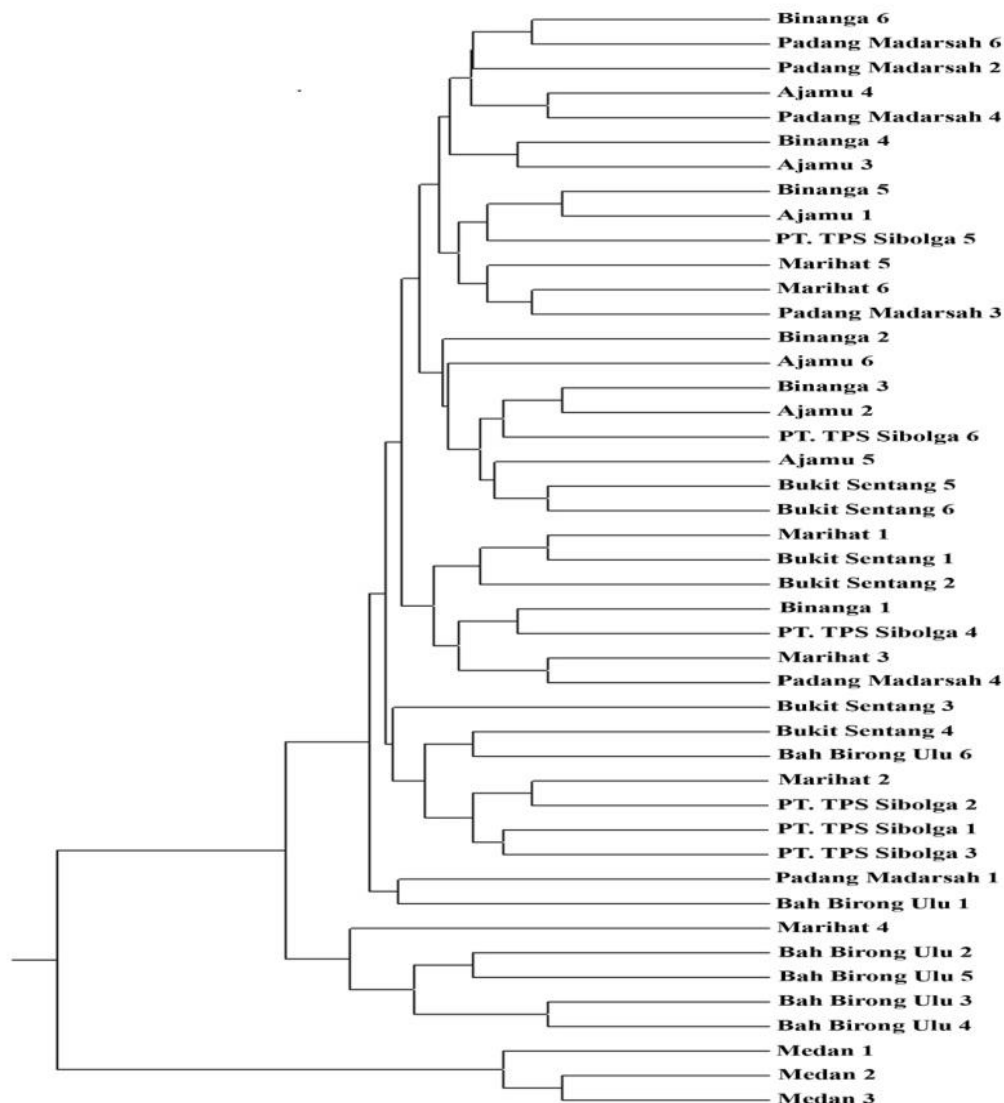
Pengelompokkan untuk sampel kumbang *E. kamerunicus* dan kutu beras (*S. oryzae*) berdasarkan marka AFLP menunjukkan perbedaan dan kemiripan genetik antar sampel. Perbedaan dan kemiripan genetik tersebut dihasilkan berdasarkan pola pita DNA

(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 Gambar 5, 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

SIMPULAN

Analisis filogenetik dari DNA genom *E. kamerunicus* dari berbagai kabupaten di Sumatera Utara dengan 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 Pertanian Vol. 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.
- 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*.
- [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 Pita Amplifikasi DNA Daun, Bunga, dan Buah Kelapa Sawit Normal dan 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.
- Harumi ER. 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 fingerprinting in 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 Menggunakan marka molekuler 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 pada Tanaman 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 Tumbuhan Menggunakan Detergen Komersial [Skripsi]. Yogyakarta.

