

Karakteristik Segmen Gen sitokrom C Oksidase Sub-unit I (COI) Ngengat *Plusia chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae)

Suriana⁽¹⁾, Marwansyah⁽¹⁾, Amirullah⁽¹⁾

⁽¹⁾Jurusan Biologi, Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Halu Oleo Kendari

Email Corresponding : Suriana0568@gmail.com

Diterima : 12 Oktober 2019 – Disetujui : 05 November 2019

© 2019 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Halu Oleo Kendari

Abstrak

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi untuk mengkarakterisasi sekuen gen COI. Karakterisasi gen COI meliputi isolasi DNA menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*), amplifikasi gen COI dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan *sequencing* untuk analisis susunan basa nitrogen pada gen COI. Analisis data molekuler menggunakan *software BioEdit* dan *MEGA Version 5.0*. Hasil penelitian menunjukkan segmen gen COI *Plusia chalcites* yang teramplifikasi berukuran 710 pb, dan terkarakterisasi sepanjang 657pb. Dari segmen tersebut terdapat 503/657 nukleotida yang bersifat *conserved* (kekal), 154/657 nukleotida yang bersifat variabel (bervariasi), 124/657 nukleotida *parsimoni informative* dan 30/657 nukleotida *singleton*. Komposisi basa nitrogen sekuen gen COI *Plusia chalcites* yaitu Timin (T) 39,0%, Cytosin (C) 14,0%, Adenin (A) 31,7% dan Guanin 15,4%.

Kata kunci : *Plusia chalcites*, Karakteristik Gen COI

Characteristics of The COI Gene Segment (Cytochrome Oxidase Subunit I) of *Plusia chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae)

Abstract

The research was exploration of partial COI gene of moth (*Plusia chalcites*). The aim of this research is to characterization of nucleotide sequence of these COI gene, that was extracted with *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) method, and then amplified by *Polymerase Chain Reaction* (PCR) technique with specific primer. The result PCR amplified subsequent analysis of nitrogen base arrangement in these COI gene. The analysis data using the *BioEdit* and *MEGA Version 5.0* software. The results showed that the segment of COI gene in *Plusia chalcites* as long 710 bp (base pairs). From these, there are 503/657 nucleotides which are *conserved*, 154/657 nucleotides of varies, 124/657 *parsimoni informative* nucleotides and 30/657 *singleton* nucleotides. The base N composition consist of 39.0% Timine, 14.0% Cytosin (C), 31.7% Adenine (A) and 15.4% Guanin.

Key words: *Plusia chalcites*, COI Gene characteristics and composition.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Plusia chalcites merupakan salah satu jenis serangga (ngengat) yang dikenal merugikan bagi manusia karena larva serangga ini dapat merusak tanaman dengan cara mengerat, mengigit, dan menghisap setiap bagian tanaman (Solihin, 1994). Bagian tanaman yang sering diserang oleh larva *Plusia chalcites* adalah daun. Larva ini menyerang tanaman kedelai (*Glycine max*) selain itu, larva ini juga menyerang tanaman kentang di Jawa Barat (Elsas, *et. al.*, 1969).

Larva *Plusia chalcites* dikenal sebagai ulat jengkal yang menjadi hama beberapa tanaman budidaya (Dirjen Pangan, 1992). Pengenalan ini berdasarkan cara bergerak atau berpindah tempat ulat jengkal. Cara pengenalan lainnya adalah ciri morfologi dari ulat jengkal tersebut. Namun, ciri tersebut sering tersamarkan oleh pengaruh lingkungan. Keterbatasan ini dilengkapi dengan pengenalan secara molekuler, baik pada fase larva maupun dewasa. Metode atau teknik molekuler yang dipergunakan adalah segmen DNA baik dari inti sel maupun di luar inti sel (Santosa, 1995).

Teknik molekuler untuk pengenalan atau identifikasi hewan termasuk serangga adalah menggunakan segmen DNA mitokondria. Beberapa segmen DNA mitokondria adalah penanda genetik yang sangat penting digunakan dalam mempelajari evolusi, kekerabatan, dan variasi genetik pada berbagai taksa hewan

(Kocher, *et. al.*, 1989). DNA mitokondria (mtDNA) berbentuk lingkaran heliks tertutup yang terdapat dalam matrik, urutan nukleotidanya telah diketahui secara lengkap dan dapat diakses melalui *Gen Bank Accession: M63933*. mtDNA mempunyai 2 untai yaitu untai *Heavy* (H) yang kaya dengan guanin dan untai *Light* (L) yang kaya dengan sitosin.

Gen COI (cytochrome oxidase subunit I) merupakan salah satu gen yang dapat digunakan sebagai penanda genetik, dalam studi molekuler untuk mempelajari karakteristik genetik antar spesies maupun antar individu (Folmer, *et. al.*, 1994). Gen COI (cytochrome oxidase subunit I) adalah salah satu gen dalam DNA mitokondria (*mtDNA*) yang berperan penting dalam produksi energi, sehingga urutan basanya bersifat lestari. Penanda gen COI (cytochrome oxidase subunit I) telah digunakan untuk mengidentifikasi hasil pemuliaan hampir semua hewan baik intraspesies maupun interspesies (Hebert, *et. al.*, 2003).

Gen COI (cytochrome oxidase subunit I) memiliki banyak kelebihan untuk mempelajari karakteristik genetik karena sedikit sekali mengalami delesi dan insersi pada sekuennya. Selain itu susunan asam amino dari protein yang disandi gen

COI (cytochrome oxidase subunit I) jarang mengalami substitusi sehingga gen COI (cytochrome oxidase subunit I) bersifat stabil dan dapat digunakan sebagai penanda analisis filogeni, namun basa-basa pada *triple* kodonnya masih berubah dan bersifat *silent* yaitu perubahan basa yang tidak merubah jenis asam amino (Lynch & Jarrell, 1993). Berdasarkan uraian latar belakang maka penelitian mengenai Karakteristik Segmen Gen COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) DNA Mitokondria *Plusia chalcites* (Famili : *Noctuidae*, Ordo : *Lepidoptera*) perlu untuk dilakukan.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mikropipet, timbangan analitik, *sentrifuge*, mesin *elektroresis*, mesin PCR, *waterbath*, *hot plate*, gelas ukur, sampel *Plusia chalcites*, CTAB, isopropanol, Amonium asetat, TE, dan alkohol 70%, dan beberapa alat tambahan untuk jalannya penelitian ini.

Prosedur Penelitian

Koleksi sampel

Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini telah dikoleksi oleh tim peneliti pada tahun 2015 yang berasal dari komunitas mangrove Pulau Kaledupa (Suriana, *et. al.*, 2015).

Isolasi dan Purifikasi DNA total

Prosedur isolasi genom sampel mengikuti prosedur (Suriana & Nasaruddin, 2017). Isolasi genom yaitu mengambil

bagian tubuh sampel dan menimbang sebanyak 1 gram, kemudian mengerus lalu menambahkan dengan *buffer lysis* yang mengandung CTAB, PVP, Tris-HCL, EDTA dan ddH₂O sebanyak 500 µL, kemudian memasukkan sampel ke dalam *eppendorf* 1,5 mL. Setelah itu, mengikubasi sampel pada suhu 55°C selama 2 jam dan membolak-balikkan tabung setiap 30 menit. Setelah proses inkubasi selesai, kemudian menambahkan kloroform sebanyak 500 µL ke dalam sampel. Selanjutnya, melakukan proses sentrifugasi pada sampel dengan kecepatan 14.500 rpm selama 12 menit lalu mentransfer supernatan ke *eppendorf* baru. Setelah mengambil supernatan kemudian menambahkan 0,08 volume 7,5 M amonium asetat (NH₄Ac) dan 0,54 volume isopropanol kemudian membolak-balikkan tabung dengan tujuan sampel menjadi homogen. Selanjutnya menginkubasi sampel ke dalam freezer selama 40 menit. Setelah itu, melakukan proses sentrifugasi pada sampel dengan kecepatan 14.500 rpm selama 3 menit dan membuang supernatan hingga hanya tersisa pelet. Kemudian menambahkan alkohol 70 % sebanyak 500 µL ke dalam pelet dan melakukan kembali proses sentrifugasi dengan kecepatan 14.500 rpm selama 3 menit.

Kemudian membuang alkohol 70% tersebut dan pelet dikering-anginkan lalu diresuspensi dengan TE sebanyak 35 μ L dan menginkubasi pada suhu ruang ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) untuk melarutkan pelet DNA.

Elektroforesis Hasil Purifikasi DNA Total

Proses elektroforesis hasil purifikasi DNA total yaitu diawali dengan membuat *gel agarose*. Pertama, menimbang *agarose* sebanyak 0,3 gram lalu memasukkan ke dalam gelas piala kemudian menambahkan dengan TBE 1X sebanyak 30 mL. *Gel agarose* dibuat dengan *buffer* TBE 1X untuk mendapatkan konsentrasi 1%, *Loading buffer* berupa TBE 1X. Kemudian memanaskan larutan *agarose* hingga mendidih. Sementara itu, menyiapkan cetakan *gel agarose* dan melekatkan selotip di tiap-tiap ujung cetakan *agarose* (pastikan bahwa selotip melekat kuat dan tidak ada lubang pada masing-masing ujung cetakan) dan memasang sisir elektroforesis di salah satu ujung cetakan *gel agarose* dengan posisi hampir menyentuh dasar cetakan. Setelah *gel agarose* mendidih, gel menambahkan 5 μ L Etbr (*Ethidium Bromide*) ke dalam *gel* lalu menghomegenkan. Setelah dingin, menuang *gel agarose* ke dalam cetakan dan membiarkan hingga gel memadat. Kemudian, membuka sisir dengan selotip pada masing-masing ujung cetakan. Memasukkan *gel agarose* ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi TBE 1X. Selanjutnya mengambil 5 μ L sampel dan mencampur dengan 1 μ L *loading dye*,

kemudian memasukkan ke dalam sumur *agarose*. Elektroforesis dijalankan hingga 30 menit. Setelah selesai, gel divisualisasi dengan menggunakan *photoforesis*. Sampel hasil isolasi yang bagus selanjutnya akan di PCR.

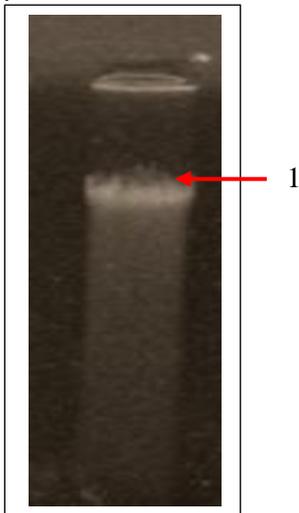
Amplifikasi Segmen Gen COI dengan Teknik PCR

Segmen gen COI diamplifikasi dengan teknik PCR (Gambar 3). Proses amplifikasi dipergunakan primer khusus barcoding hewan (Hebert *et al.*, 2003). Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat campuran larutan *set up* yang terdiri atas *master mix* sebanyak 25 μ L, masing-masing DNA primer sebanyak 0,5 μ L, dan ddH₂O μ L, jadi setiap *tube* terdiri atas 1 μ L DNA dan 9 μ L mix. Mesin PCR diset dengan *Pre Denaturation* selama 15 detik pada suhu 98 $^{\circ}\text{C}$, diikuti 35 siklus dari *Denaturation* selama 2 detik, pada suhu 98 $^{\circ}\text{C}$, *Annealing* selama 15 detik pada suhu 50 $^{\circ}\text{C}$ dan *Extension* 1 menit, pada suhu 72 $^{\circ}\text{C}$ serta diikuti dengan *Post Extension* selama 1 menit, pada suhu 72 $^{\circ}\text{C}$. Hasil amplifikasi divisualisasikan dengan menggunakan Prosedur elektroforesis serta alat dan bahan yang dipergunakan sama dengan prosedur elektroforesis hasil purifikasi DNA Total. Band yang baik akan diperbanyak hingga 50 μ L dan dikirim ke perusahaan jasa sekuensing.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi DNA Genom ngengat *Plusia chalcites*

Proses elektroforesis yang telah dilakukan diperoleh hasil isolasi DNA yang menunjukkan pita DNA yang sangat tegas saat divisualisasi menggunakan photoforesis. Hasil isolasi DNA genom ngengat *Plusia chalcites* memiliki kualitas DNA yang sangat baik dan berhasil (gambar 1). Sehingga DNA hasil isolasi dapat dijadikan sebagai cetakan dalam tahap PCR.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA *Plusia chalcites*, (1) Pita DNA

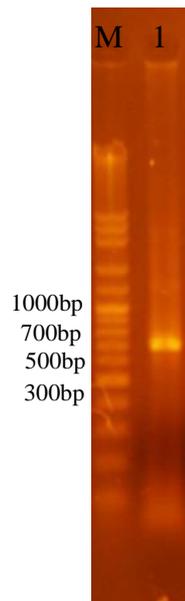
Menurut Irmawati, (2003) bahwa pita DNA yang tebal dan tidak menggumpal (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dari DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus.

Amplifikasi Gen COI dengan Teknik PCR

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) atau reaksi *polimerase* berantai merupakan cara untuk mengamplifikasi atau melipat

gandakan suatu fragmen DNA secara *in vitro* dengan menggunakan suatu primer tertentu. Amplifikasi gen COI dilakukan dengan menggunakan primer FCOI 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG -3' dan primer RCOI 5'TAAACTTCAGGGTG ACCAAAAAATCA -3' (Hebert *et al.*, 2003). Proses amplifikasi yang dilakukan memperlihatkan pita segmen gen target dengan jelas dan tebal yang membentuk *single band* (pola pita tunggal).

Proses yang dilakukan untuk mendapatkan hasil pada gambar 2 ialah terlebih dahulu dilakukan proses PCR untuk menggandakan DNA *Plusia chalcites* setelah hasil penggandaan DNA dirasa sudah mencukupi kemudian dilakukan proses *running* dengan menggunakan elektroforesis untuk melihat hasilnya apakah pita segmen gen target berhasil didapatkan. Sebelum dilakukan proses *running* terlebih dahulu membuat perkiraan berapa jumlah bp pita segmen target yang akan diperoleh dengan cara memasukkan marker dengan kisaran 300, 500, 700, dan 1000 bp dalam sumuran *agarose* pada sisi kiri sedangkan produk hasil PCR yang disimpan pada sumuran sebelah kanan agar setelah proses *running* dapat terlihat dengan jelas berapa jumlah total bp yang diperoleh.



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk PCR gen COI dengan menggunakan primer gen COI khusus barcoding hewan pada gel agarose 1% dengan 5 μ L etidium bromide (EtBr), Marker (M), (1) Produk PCR.

Proses amplifikasi dengan primer khusus COI maka didapatkan pita segmen target dengan jumlah total 700 bp hal ini diketahui karena setelah proses *running* dilakukan dan divisualisasikan dengan photoperesis terlihat bahwa produk pcr yang ditempatkan pada sumuran sebelah kanan berada tepat dengan posisi marker 700 bp. Setelah diketahui tola bp pita segmen gen target hasil produk PCR selanjutnya dilanjutkan dengan proses sekuensing untuk menentukan urutan basa nukleotida dari gen target yang telah diperoleh yaitu gen COI.

Karakterisasi

Pensejajaran Sekuen COI *Plusia chalcites* dengan COI Spesies Pembadingnya

Hasil pensejajaran menunjukkan bahwa gen COI (Cytochrome Oxidase

Subunit I) pada *Plusia chalcites* bersifat *conserve* pada level spesies tetapi masih menunjukkan keragaman dengan beberapa *insecta* lain. Segmen gen COI *Plusia chalcites* kemudian disejajarkan dengan sekuen gen COI pada beberapa *insecta* lainnya dari famili *Noctuidae* yang diakses dari *Gen Bank* yaitu *Plusia festucae* (kode akses KX045960), *Plusia putnami* (kode akses GU688241), *Plusia magnimacula* (kode akses GU096550), *Plusia putnami* (Kode akses KJ394019), *Plusia nichollae* (Kode akses KJ392747), *Anthanassa ardys* (Kode akses KP172551) dan *Anthanassa drusilla* (Kode akses KP172553). Berdasarkan hasil pensejajaran berganda diketahui terdapat 503/657 nukleotida yang bersifat *conserve*, 154/657 nukleotida yang bersifat variabel, 124/657 nukleotida *parsimoni informative* dan 30/657 nukleotida *singleton*.

Berdasarkan hasil pensejajaran berganda maka terdapat pula beberapa situs perbedaan nukleotida pada hasil karakterisasi gen COI *Plusia chalcites* dengan sekuen gen COI kelompok *insecta* yang diakses pada *Gen Bank* sebagai pembanding. Situs perbedaan nukleotida pada *Plusia chalcites* dengan *outgroupnya* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Situs perbedaan nukleotida *Plusia chalcites* dengan spesies *insecta* pembandingnya

```

#MEGA
!Title base singleton;
!Format
!DataType=Nucleotide
NSegs=8 NSites=78
Identical=. Missing=? Indel=-;

!Domain=Data;
[
11111 111222222 222233333 333334444 444444444 444555556 666666666]
[
122233345 5688811245 6682233456 888901445 567788012 4556667778 8890244680 12233334]
[
8106726874 6806909895 1751409049 1245651570 3817496565 628492450 1916726342 40925891]
#Plusia chalcites
TTTATAGAT ATTAATATCT GATATATATA ACTAATAT TATATATTT TACACCAGAA AATTAACATA TACACTCA
CCAGGATTC TACATTAT TTTTAAATC TATAATCTA TATTTTITI TATATTAAT CCATTAAT TTAGACTA
#K0045960 Plusia festucae
CCAGGATTC TACATTAT TTTTAAATC TATAATCTA TATTTTITI TATATTAAT CCATTAAT TTAGACTA
#G0688241 Plusia putnami
CCAGGATTC TACATTAT TTTTAAATC TATAATCTA TATTTTITI TATATTAAT CCATTAAT TT-----
#G0956550 Plusia magninacula
-----ATC TACATTAT TTTTAAATC TATAATCTA TATTTTITI TATATTAAT CCATTAAT TT-----
#K394019 Plusia putnami
-----ATC TACATTAT TTTTAAATC TATAATCTA TATTTTITI TATATTAAT CCATTAAT-----
#K392747 Plusia nichollae
-----TC TACATTAT TTTTAAATC TATAATCTA TATTTTITI TATATTAAT CCATTAATC-----
#KP172551 Anthonassa ardyae
-----TC TACGCTAT TTTTAAATC TATAATCTA TATTTTITI TATATTAAT CCATTAAT CCGCTCC
#KP172553 Anthonassa drusilla
-----TC TACATTAT TTTTAAATC TATAATCTA TATTTTITI TATATTAAT CCATTAAT CCGCTTGT TTTTITI
    
```

Tabel 3 menunjukkan situs perbedaan nukleotida pada *Plusia chalcites* dan nukleotida *insecta* pembandingnya. Berdasarkan data tersebut maka dapat diketahui bahwa terdapat sebanyak 30/657 nukleotida pada *Plusia chalcites* yang bersifat *singleton* atau berbeda sendiri dengan sekuen nukleotida *insecta* yang lain yang dijadikan sebagai pembandingnya yang diperoleh dari *Gen Bank*. Salah satu contohnya yaitu pada situs ke 54 nukleotida yang bersifat *singleton* untuk *Plusia chalcites* yaitu Timin sedangkan nucleotida *insecta* yang lain adalah Sitosin. Contoh lain yaitu pada situs ke 69, *Plusia chalcites* nukleotidanya yaitu Adenin, sementara nukleotida pada *insecta* lain adalah Sitosin, sehingga dari perbedaan nukleotida tersebut maka dapat dijadikan sebagai penciri tersendiri pada spesies *Plusia chalcites* dengan spesies pembandingnya. Perbedaan nukleotida tersebut pada *Plusia chalcites* tersebut adalah penanda genetik yang dapat digunakan sebagai marker atau DNA *barcode* untuk *Plusia chalcites*, namun tidak menyebabkan perubahan asam amino yang dikodonya seperti CUU,

CUC, CUA dan CUG (tanda kuning) yang keempat kodon tersebut mengkode asam amino *Leusin* (L). Keempat kodon tersebut telah mengalami perubahan nukleotida ke tiga, namun tidak sampai menyebabkan perubahan asam amino yang dikodonya sehingga mutasi tersebut merupakan mutasi *non sense* atau tidak bermakna. Oleh karena itu, mutasi tersebut tidak akan mempengaruhi pembentukan protein yang digunakan untuk perkembangan dan pertahanan organisme tersebut (Redana, 2011).

Jarak Genetik *Plusia chalcites* dengan Spesies Pembandingnya

Jarak genetik digunakan untuk melihat kedekatan hubungan genetik antar individu *Plusia chalcites* dan spesies lain (*outgroup*). Tujuan dari metode jarak genetik yaitu untuk merekonstruksi pohon filogenetik dengan benar dan juga mempunyai cabang yang menghasilkan data orisinil sedekat mungkin. Melalui penggunaan analisis perhitungan *Pairwis Distance* dapat ditunjukkan matriks perbedaan genetik antara *Plusia chalcites* dengan kelompok *insecta* yang lain yang datanya diambil dari *Gen Bank*. Tabel 2 menunjukkan hasil analisis jarak genetik berdasarkan perbedaan sekuen COI berdasarkan analisis *Distance Estimation* dengan metode

atau model *p-distance* dan pengolahan Bootstrap 1000X.

Tabel 2. Jarak Genetik *Plusia chalcites* dengan kelompok *insecta* yang lain menggunakan analisis perhitungan *Distance Estimation* berdasarkan model *p-distance* dengan Bootstrap 1000X

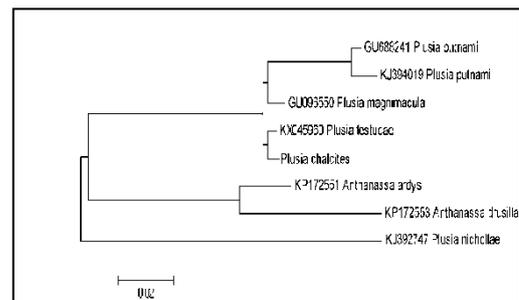
No	Nama Sekuen	1	2	3	4	5	6	7	8
1.	<i>Plusia chalcites</i> KX045960	-							
2.	<i>Plusia festucae</i> GU688241	0.147							
3.	<i>Plusia putnami</i> GU096550	0.165	0.037						
4.	<i>Plusia magnimacula</i> KJ394019	0.147	0.013	0.038					
5.	<i>Plusia putnami</i> KJ392747	0.167	0.042	0.013	0.044				
6.	<i>Plusia nichollae</i> KT172551	0.148	0.007	0.040	0.013	0.046			
7.	<i>Anthanassa ardis</i> KP172553	0.141	0.119	0.128	0.123	0.132	0.119		
8.	<i>Anthanassa drussila</i>	0.167	0.132	0.137	0.134	0.137	0.134	0.066	

Hasil perhitungan berdasarkan daerah COI parsial menunjukkan nilai jarak genetik berkisar hingga 0,141-0,165. Jarak ini sangatlah kecil, karena jarak genetik tersebut tidak mencapai 1 yang berarti hubungan kekerabatan individu tersebut sangatlah dekat. Fenomena tersebut dapat dikatakan sebagai kekerabatan *insecta* monofiletik yang berarti sekelompok taksa yang berasal dari nenek moyang yang sama. Berdasarkan hasil analisis jarak genetik tersebut maka akan dapat mempengaruhi rekonstruksi pohon filogenetik. Hal tersebut karena hubungan jarak genetik berkaitan dengan rekonstruksi pohon filogenetik.

Rekonstruksi Pohon Filogeni Berdasarkan Segmen Gen COI

Proses analisis hubungan kekerabatan *Plusia chalcites* dan sekuen pembanding yang diambil dari *Gen Bank* dengan spesies yang sama dengan spesies out groupnya menggunakan software MEGA 5.0.

pembuatan rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan urutan sekuen segmen gen COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) DNA mitokondria. Berdasarkan pohon filogeni akan terlihat jarak genetik yang akan mempengaruhi rekonstruksi topologi pohon filogenetik yang digambarkan. Pohon filogenetik berdasarkan gen COI menggunakan model *Neighbor-Joining* dan metode *p-distance* dengan pengolahan bootstrap 1000X. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pohon filogenetik *Plusia chalcites* dan beberapa kerabatnya dari Gen Bank berdasarkan urutan nukleotida gen COI, dikonstruksi menggunakan metode *Neighbor-Joining* model *P-distance* dengan Bootstrap 1000X.

Pembuatan pohon filogenetik dengan menggunakan metode *Neighbor-Joining* disebabkan karena pada metode tersebut memilih sekuen yang apabila digabungkan akan memberikan estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen. Metode *Neighbor-Joining* sangat cocok ketika panjang cabang dari pohon yang diketahui

topologinya berubah dengan cara menstimulasi tingkat yang bervariasi dari perubahan evolusi dan serta metode ini akan menggabungkan apabila spesies yang berbeda pada satu klade yang sama (Dharmayanti, 2011). Berdasarkan filogeni tersebut diketahui bahwa output group dari *plusia chalcites* adalah *Papilio blumei*.

PENUTUP

Simpulan

Simpulan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Hasil karakteristik segmen Gen COI (Cytochrome Oxidase SubUnit I) sepanjang 710 bp pada *Plusia chalcites* yaitu diketahui 503/657 nukleotida yang bersifat *conserve*, 154/657 nukleotida yang bersifat variabel, 76/657 nukleotida *parsimoni informative* dan 30/657 nukleotida *singleton*. Komposisi basa nitrogen *Plusia chalcites* yaitu Timin (T) 39,0%, Cytosine (C) 14,0%, Adenin (A) 31,7% dan Guanin 15,4%.
2. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik *Plusia chalcites* dengan insecta pembandingnya diketahui bahwa *Plusia chalcites* memiliki laju kekerabatan paling dekat dengan *Plusia festucae* dan diketahui bahwa output groupnya adalah *Papilio blumei*.

Saran

Saran pada penelitian ini yaitu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai karakteristik segmen gen COI (Cytochrome Oxidase Subunit I) pada Ngengat Tolewa (*Plusia chalcites*) spesies ini memiliki karakteristik yang unik dan berbeda dari serangga yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Dharmayanti, N. L. P. I. (2011). Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa*, 21(1), 1–10.
- Direktur_Jenderal_Tanaman_Pangan. (1992). *Pedoman Pengenalan dan Pengendalian Hama Tanaman Kedelai*. Jakarta: tanamanpangan.pertanian.go.id.
- Elsas, L. J., Waksman, B. H., Magee, P. T., & Lentz, T. L. (1969). The Science of Genetics. An Introduction to Heredity. *Yale Journal of Biology and Medical*, 42(August), 48–50. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2591510/pdf/yjbm00174-0053b.pdf>
- 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., Ratnasingham, S., & DeWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.

- Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(SUPPL. 1), 1–5. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Irmawati. (2003). *Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu dan Tikus Generasi Pertama pada Stok Hatchery*. Institut Pertanian Bogor.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), 6196–6200. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>
- Lynch, M., & Jarrell, P. E. (1993). A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics*, 135(4), 1197–1208.
- Redana, D. N. (2011). Kode Genetik (Kodon) Sebagai Bukti dari Konsep Tat Twam, Asi. In *Widyatech Jurnal Sains dan Teknologi* (III), pp. 112–131. Retrieved from <https://jurnalwidyatech.files.wordpress.com/2012/02/dewa-nyoman-redana.pdf>
- Santosa, Y. (1995). *Teknik Pengukuran Keanekaragaman Satwa Liar*. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?cluster=11413630721079590395&hl=en&oi=scholar>
- Solihin, D. D. (1994). Peran DNA Mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. *Hayati*, 1(1), 1–4.
- Suriana, Jamili, & Rahman. (2015). Keanekaragaman Jenis Serangga Pada Komunitas Mangrove. *Jurnal Biowallacea*, 2(1), 146–152.
- Suriana, S., & Nasaruddin, N. (2017). "Karakteristik Parsial Gen Sitokrom-C Oksidase Subunit-I Katak Pohon Suaka Marga Satwa Tanjung Peropa Moramo, Sulawesi Tenggara (CHARACTERISTICS OF PARTIAL CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT I (COI) GENE OF TREE FROG (Polypedates celebensis) IN TANJUNG PEROPA W. *Jurnal Veteriner*, 17(4), 517–523. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.4.517>