

## Karakterisasi Molekuler *Elaedobius kamerunicus* Faust. (Coleoptera : Curculionidae) Asal Sumatera Utara Menggunakan Sekuen DNA

*Molekuler Characterization Elaedobius kamerunicus* Faust. (Coleoptera : Curculionidae) Origin North Sumatera Using DNA Sequence

Bayu Syahputra\*, Darma Bakti, Mukhtar Iskandar Pinem, Agus Eko Prasetyo  
Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, USU, Medan 20155  
\*Corresponding author : bayusyahputra012@gmail.com

### ABSTRACT

*Elaedobius kamerunicus* is palm oil's pollinator that is effective to increase oil palm fruit set. The decline of aggressivity of *E. Kamerunicus* is guess by decrease in the ability in recent years resulting in decreased oil palm fruit set. The result that *E. Kamerunicus* genetic relationship in North Sumatera used 2 primer that is LCO1490/HCO2198 and r1138/f1094. The analysis diversity by MEGA Version 7. The tree phylogenetic is constructed by Neighbor-Joining Tree'. The result of amplification DNA sequence from 35 sample of *E. kamerunicus* genom and three sample *S. Oryza* genom as control with indicate the diversity. The analysis result that *E. kamerunicus* by Primer LCO1490/HCO2198 consists of 2 major group that is group 1 *E. kamerunicus* from Ajamu, Binanga, Bukit Sentang, Padang Madarsah and PT TPS Sibolga at group 2 *E. kamerunicus* from Marihat and Bah Birong Ulu. At primer r1138/f1094 consists of 2 major group that is group 1 Bah Birong Ulu and PT TPS Sibolga and group 2 *E. kamerunicus* from Marihat, Ajamu, Binanga, Padang Madarsah dan Bukit Sentang.

---

Keywords: *Elaedobius kamerunicus*, genetic diversity, DNA sequence.

### ABSTRAK

*Elaedobius kamerunicus* adalah serangga penyerbuk kelapa sawit (SPKS) yang efektif untuk meningkatkan *fruit set* kelapa sawit. Penurunan agresivitas kumbang *E. kamerunicus* diduga karena telah terjadi penurunan kemampuan dalam beberapa tahun ini sehingga terjadi penurunan *fruit set* kelapa sawit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan kekerabatan *E.kamerunicus* di Sumatera Utara dengan menggunakan 2 primer yaitu LCO1490/HCO2198 dan r1138/f1094. Analisis keragaman menggunakan program MEGA Versi 7. Pohon filogenetik dikonstruksi dengan cara 'Neighbor-Joining Tree'. Hasil amplifikasi sekuen DNA terhadap 35 sampel genom *E. kamerunicus* dan 3 sampel genom *S.oryza* sebagai kontrol menunjukkan adanya keragaman yang tinggi. Hasil analisis menunjukkan bahwa *E. kamerunicus* dengan menggunakan Primer LCO1490/HCO2198 terdiri dari 2 kelompok besar yaitu kelompok 1 *E. kamerunicus* di Ajamu, Binanga, Bukit Sentang, Padang Madarsah dan PT TPS Sibolga kelompok 2 Marihat dan Bah Birong Ulu. Pada primer r1138/f1094 terdiri dari 2 kelompok besar yaitu kelompok 1 *E. kamerunicus* di Bah Birong Ulu dan PT TPS Sibolga dan kelompok 2 *E.kamerunicus* di Marihat, Ajamu, Binangan, Padang Madarsah dan Bukit Sentang.

---

Kata Kunci : *Elaedobius kamerunicus*, keragaman genetik, sekuen DNA.

## PENDAHULUAN

*Elaeodobius kamerunicus* adalah serangga penyerbuk kelapa sawit (SPKS). Pemasukan *E. kamerunicus* dari Malaysia ke Indonesia pada tahun 1982 dilakukan atas prakarsa PT PP London Sumatera bekerja sama dengan Pusat Penelitian Marihat. SPKS dimasukkan melalui Bandara Polonia Medan (Mangoensoekarjo dan Semangun, 2003).

Populasi *E. kamerunicus* dalam beberapa tahun terakhir dilaporkan telah terjadi fluktuasi maupun kepadatan populasi di sejumlah wilayah di Indonesia yang cenderung menurunkan *Fruit set* kelapa sawit (Prasetyo *et al.*, 2014). Penurunan agresivitas kumbang *E. kamerunicus* ini juga diduga karena telah terjadi *inbreeding depression* selama 30 tahun ini (Hendrick dan Kalinowski, 2000).

Salah satu metode untuk mengetahui adanya *inbreeding depression* adalah dengan melihat perubahan genetik pada DNA kumbang. Sekuen DNA kumbang secara umum yang bersifat stabil (*conserve*) yang memiliki variabilitas tinggi antar spesies dan sering digunakan untuk identifikasi serangga adalah bagian *mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (Cox1)* (Hajibabaei *et al.*, 2005).

## BAHAN DAN METODE

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Pusat Penelitian Kelapa Sawit Marihat dengan ketinggian tempat  $\pm$  400 m di atas permukaan laut mulai bulan April 2016 sampai Oktober 2016. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah imago *Elaeodobius kamerunicus*, ethanol 70% , Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Geneaid GT100, proteinase k, GT buffer, W1 buffer, GBT buffer, wash buffer, elution buffer, gel agaros, 1KB plus, ddH<sub>2</sub>O, aquades dan larutan TAE.

**Pelaksanaan penelitian** dimulai dari:

### 1. Pengambilan Serangga Uji

Dicari bunga jantan anthesis dengan ciri khas terdapat polen dan berbau khas seperti adas serta dikunjungi oleh kumbang *E. kamerunicus* kemudian disungkup seluruh

tandan bunga menggunakan kantung kain kassa yang tidak dapat ditembus oleh tubuh kumbang pada jam 09.00-12.00 wib. Ketok/goyang tandan bunga jantan tersebut sehingga sebagian besar kumbang jatuh di dalam kantung kain kassa tersebut. Untuk mempermudah pengumpulan kumbang, tandan bunga jantan tersebut dapat dipotong terlebih dahulu kemudian keluarkan tandan, dan goyang kembali kantung tersebut sehingga polen maupun serasah bunga dapat keluar dari kantung dan hanya kumbang saja yang tertinggal.

### 2. Pengoleksian Serangga Uji

Serangga uji *E. kamerunicus* diambil dari 7 Kabupaten di Sumatera Utara yang telah dikumpulkan oleh Pusat Penelitian Kelapa Sawit di Marihat yang kemudian dikumpulkan dan ditempatkan pada botol yang berisi ethanol 70% dan disimpan ke dalam freezer.

### 3. Pengekstraksian DNA *E. kamerunicus*

*E. kamerunicus* diambil sebagai sampel dan di semprot dengan alkohol 70% kemudian tunggu sampai 5 menit dan disimpam didalam mikrotube 1,5 ml. DNA kumbang *E. kamerunicus* kemudian diekstraksi menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Geneaid GT100.

### 4. Amplifikasi PCR

Sekuen DNA *Cox1* diperoleh dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) dalam 40  $\mu$ l volume reaksi *master mix* yang dijelaskan pada Tabel 2.

Tabel 2. PCR *Mix* yang digunakan untuk amplifikasi PCR

Primer yang akan diuji adalah:

No	Bahan	Reaksi
1	KAPA Ready Mix	20 $\mu$ l
2	Primer F LCO1490/Primer r1138	2 $\mu$ l
3	Primer R HCO2198/Primer f1098	2 $\mu$ l
4	ddH <sub>2</sub> O	12 $\mu$ l
5	DNA <i>Template</i>	4 $\mu$ l
	Total	40 $\mu$ l

- Primer r1138 (5'-CGCCTTCGAACCCTCAAC - 3') dan f1094 (5'-GGATCGTCCTAAGACGGACAGAAG - 3') yang menghasilkan fragmen DNA ukuran sekitar 600 bp (Marvaldi *et al.*, 2002).
- Primer LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATAT TGG-3') dan HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAA ATCA-39) yang menghasilkan fragmen DNA ukuran sekitar 658 bp (Folmer *et al.*, 1994).

Kondisi siklus amplifikasi DNA adalah denaturasi awal pada 94 °C selama 2 menit, diikuti dengan 35 siklus denaturasi 94 °C selama 30 s, suhu annealing 53 °C selama 1 menit, dan suhu extention 72 °C selama 2 menit dan 15 detik kemudian diikuti *final extention* selama 10 menit dengan suhu 72 °C (Wening *et al.*, 2013).

**5. Elektroforesis Hasil PCR**

Hasil PCR kemudian dilakukan elektroforesis untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA.

**6. Sekuensing langsung produk PCR**

Hasil produk PCR pada setiap sampel sebesar 10 µl dikirim ke 1stBASE (Malaysia).

**7. Analisis Keragaman Genetik *E. kamerunicus***

Data sekuen DNA dianalisis menggunakan MEGA 7. *Multiple alignment* dengan menggunakan Clustal W dengan bantuan Bioedit versi 7.2.5 (Hall, 1999). Dendrogram dikonstruksi menggunakan DNAdist yang terdapat juga pada Bioedit versi 7.2.5 (Hall, 1999). Untuk mengetahui tingkat keragaman genetik sampel yang dianalisis, dilakukan analisis heterozigositas pada tiap individu dan populasi.

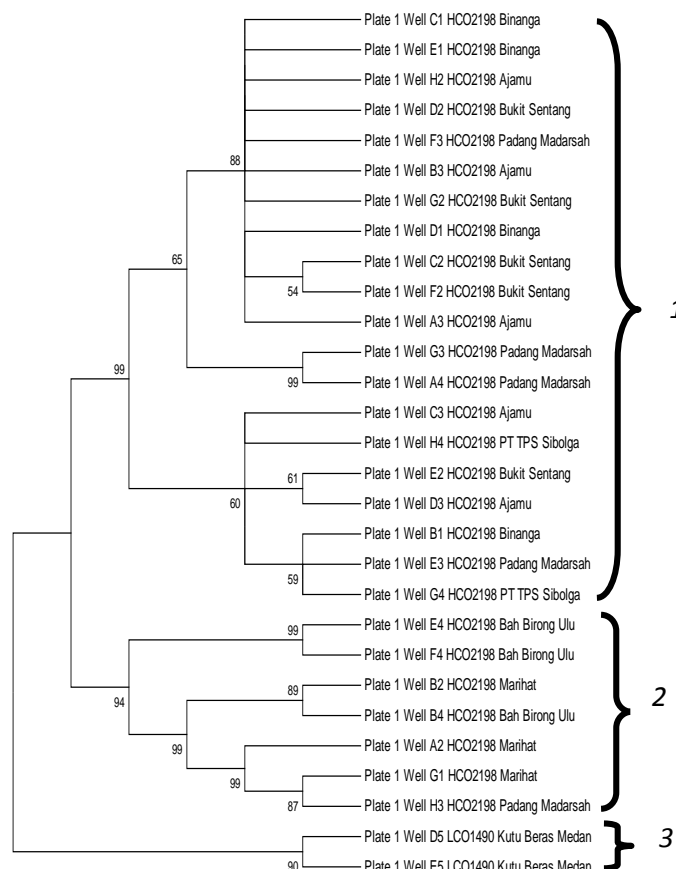
**8. Peubah Amatan**

**Filogenetik *E.***

***kamerunicus* Berdasarkan Basa Nukleotida**  
Pengamatan dilakukan dengan membandingkan tingkat keragaman *E. kamerunicus* pada 7 kabupaten di Sumatera Utara dengan menggunakan pohon filogenetik

sehingga diperoleh hubungan kekerabatan yang sesuai.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**



Gambar 1. Dendrogram *E. kamerunicus* Primer LCO1490/HCO2198 menggunakan *Neighbor-joining Tree* dan *Bootstrap* 1000.

Keterangan :

- plate merupakan tempat DNA diletakkan
- HCO2198 dan LCO1490 merupakan primer yang digunakan
- Angka pada kladogram merupakan nilai *Bootstrap*
- Kutu beras merupakan Outgrup
- Binanga, Marihat, Ajamu, Bukit Sentang, Padang Madarsah, Bah Birong Ulu dan PT TPS Sibolga merupakan sampel dalam penelitian





Species/Abbiv	Group Name	*	*	*
1.Plate_1_Well_B1_HCO2198_Binanga		T	A	T
2.Plate_1_Well_C1_HCO2198_Binanga		T	A	T
3.Plate_1_Well_D1_HCO2198_Binanga		T	A	T
4.Plate_1_Well_E1_HCO2198_Binanga		T	A	T
5.Plate_1_Well_G1_HCO2198_Marihat		T	A	T
6.Plate_1_Well_A2_HCO2198_Marihat		T	A	T
7.Plate_1_Well_B2_HCO2198_Marihat		T	A	T
8.Plate_1_Well_C2_HCO2198_Bukit_Sentang		T	A	T
9.Plate_1_Well_D2_HCO2198_Bukit_Sentang		T	A	T
10.Plate_1_Well_E2_HCO2198_Bukit_Sentang		T	A	T
11.Plate_1_Well_F2_HCO2198_Bukit_Sentang		T	A	T
12.Plate_1_Well_G2_HCO2198_Bukit_Sentang		T	A	T
13.Plate_1_Well_H2_HCO2198_Ajumu		T	A	T
14.Plate_1_Well_A3_HCO2198_Ajumu		T	A	T
15.Plate_1_Well_B3_HCO2198_Ajumu		T	A	T
16.Plate_1_Well_C3_HCO2198_Ajumu		T	A	T
17.Plate_1_Well_D3_HCO2198_Ajumu		T	A	T
18.Plate_1_Well_E3_HCO2198_Padang_Madarsah		T	A	T
19.Plate_1_Well_F3_HCO2198_Padang_Madarsah		T	A	T
20.Plate_1_Well_G3_HCO2198_Padang_Madarsah		T	A	T
21.Plate_1_Well_H3_HCO2198_Padang_Madarsah		T	A	T
22.Plate_1_Well_A4_HCO2198_Padang_Madarsah		T	A	T
23.Plate_1_Well_B4_HCO2198_Bah_Birong_Ulu		T	A	T
24.Plate_1_Well_C4_LCO1490_Bah_Birong_Ulu		T	A	T
25.Plate_1_Well_E4_HCO2198_Bah_Birong_Ulu		T	A	T
26.Plate_1_Well_F4_HCO2198_Bah_Birong_Ulu		T	A	T
27.Plate_1_Well_G4_HCO2198_PT_TPS_Sibolga		T	A	T
28.Plate_1_Well_H4_HCO2198_PT_TPS_Sibolga		T	A	T
29.Plate_1_Well_A5_HCO2198_PT_TPS_Sibolga		T	A	T
30.Plate_1_Well_D5_LCO1490_Kutu_Beras_Meda		T	A	T
31.Plate_1_Well_E5_LCO1490_Kutu_Beras_Meda		T	A	T

Gambar 4. Proses penjajaran dengan program ClustalW. Tanda (\*) menunjukkan tingkat homologi

Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa *E. kamerunicus* yang menggunakan Primer LCO1490/HCO2198 terbagi menjadi 2 kelompok besar yaitu kelompok 1 yang terdiri dari Binanga(4 sampel), Bukit Sentang (5 sampel), Ajamu (5 sampel), PT TPS Sibolga (2 sampel) dan Padang Madarsah (4 sampel) dengan nilai *bootstrap* sebesar 99 sedangkan pada kelompok 2 yang terdiri dari Marihat (3 sampel) dan Bah Birong Ulu (3 sampel) dengan nilai *bootstrap* sebesar 94.

Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa *E. kamerunicus* yang menggunakan Primer r1138/f1094 terbagi menjadi 2 kelompok besar yaitu kelompok 1 yang terdiri dari Bah Birong Ulu (5 sampel) dan PT TPS Sibolga (5 sampel) dengan nilai *bootstrap* sebesar 98 sedangkan

pada kelompok 2 yang terdiri dari Marihat (5 sampel), Binanga (5 sampel), Bukit Sentang (5 sampel), Ajamu (4 sampel) dan Padang Madarsah (4 sampel) dengan nilai *bootstrap* sebesar 50. Menurut Hillis *et al.* (1996); Nei dan Kumar (2000); Hall (2001) nilai *bootstrap* dijadikan tolak ukur penentu tingkatkepercayaan pohon. Semakin besar nilai *bootstrap* maka semakin tinggi pula tingkat kepercayaan topologi pohon hasil rekonstruksi.

Berdasarkan hasil penelitian terdapat kutu beras yang digunakan sebagai *outgroup* yang berguna untuk mengetahui keakuratan hubungan kekerabatan *E. kamerunicus* pada setiap daerah sehingga dengan adanya kutu beras sebagai *outgroup* yang telah diketahui memiliki hubungan yang jauh dengan *E. kamerunicus* maka hasil filogenetik akan dapat dipercaya.

Pada penelitian ini dipilih kutu beras sebagai *outgroup* disebabkan karena kutu beras memiliki ukuran yang hampir sama dengan *E. kamerunicus*, mudah dicari dan memiliki hubungan kekerabatan yang jauh dari *E. kamerunicus* pada tingkat spesies. Menurut Swofford *et al.* (1996) untuk mendapatkan hasil yang meyakinkan maka ditambahkan *outgroup* pada hasil akhir yang sudah diketahui hubungannya yang jauh dengan sempel.

Dari hasil penjajaran urutan basa DNA pada Gambar 2 dan Gambar 4 dapat dinyatakan bahwa sekuen masing-masing *E. kamerunicus* tidak terlalu berbeda dan masih dalam satu spesies. Walaupun terdapat sekuen yang berbeda tetapi masih ada kemiripan. Menurut Mirza dan Kurniasih (2002) urutan nukleotida dari spesies yang sama tidak menunjukkan perbedaan tetapi spesies yang berbeda memiliki urutan yang berbeda.

## SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan pada primer LCO1490/HCO2198 terdapat 2 kelompok besar yaitu kelompok 1 terdiri dari *E. kamerunicus* dari Ajamu, Binanga, Bukit Sentang, Padang Madarsah dan PT TPS Sibolga dan kelompok 2 terdiri dari *E. kamerunicus* dari Marihat dan Bah Birong Ulu.

Pada primer r1138/f1094 terdapat 2 kelompok besar yaitu kelompok 1 terdiri dari *E. kamerunicus* dari Bah Birong Ulu dan PT TPS Sibolga dan kelompok 2 terdiri dari *E. kamerunicus* dari Marihat, Ajamu, Binangan, Padang Madarsah dan Bukit Sentang.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. *Mol. Mar. Bio. Biotech.* 3: 294–299.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hall BG. 2001. *Phylogenetic trees made easy: A how-to manual for molecular biologists.* Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Hajibabaei M, deWaard JR, Ivanova NV, Ratnasingham S, Dooh RT and Kirk SL. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philos Trans R Soc Ser B Biol Sci* 360:1959 – 1967.
- Hendrik PW and Kalinowski ST. 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecological Systematic* 31:139–62.
- Hillis DM, Marble and Moritz C. 1996. Applications of Molecular Systematics: The State of The Field and A Look to The Future. In: Hillis, D.M.C. Moritz And B.K. Mable(Eds.). 1996. *Molecular systematics.* 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. pp. 515-543.
- Mangoensoekarjo S dan Semangun H. 2003. Manajemen Agrobisnis Kelapa Sawit. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Marvaldi AE, Sequeira AS, O'brien CW and Farrell BD. 2002. Molecular and Morphological Phylogenetics of Weevils (Coleoptera, Curculionoidea): Do Niche Shifts Accompany Diversification?. *Syst. Biol.* 51(5):761–785.
- Mirza I dan Kurniasih. 2002. Identifikasi Molekuler *Eurytrema* sp. pada Sapi di Indonesia. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* Vol. 7 No. 1. pp 25 – 31.
- Nei M and Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press, New York.
- Prasetyo AE, Susanto A dan Sutarta ES. 2014. Status of *Elaeodobius kamerunicus* towards 30 years in Indonesia. *Proceeding of IOPC 2014, 17-19 Mei 2014, Bali, Indonesia.*
- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ And Hills DM. 1996. Phylogenetic Inference. In: *Molecular systematics,* 2nd Edition. Hills DM., Moritz C And Mable BK (Eds.) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Chap. 5 Pp. 407 – 514.
- Wening S, Prasetyo AE, Susanto A, Rahmadi HY, Yenni Y dan Purba AR. 2013. Keragaman Sekuen Gen Kitinase: Identifikasi Penanda Toleransi Kelapa Sawit terhadap *Ganoderma*. *Prosiding Pertemuan Teknis Kelapa Sawit* 2013.