

## OPTIMASI PROTOKOL EKSTRAKSI DNA *Elaeidobius kamerunicus*

### OPTIMIZATION OF DNA EXTRACTION PROTOCOL OF *Elaeidobius kamerunicus*

Sri Wening\*, Agus Eko Prasetyo, T.A.P. Rozziansha, dan Agus Susanto

**Abstrak** Serangga penyerbuk kelapa sawit (*Elaeidobius kamerunicus* Faust) memiliki peran penting pada tingkat produktivitas perkebunan kelapa sawit di Indonesia. Hingga saat ini, belum ada penelitian yang cukup komprehensif mengenai biologi spesies tersebut pada tingkat molekuler. Padahal, pengetahuan dasar tersebut sangat berguna bagi pengembangan serangga penyerbuk kelapa sawit untuk tujuan efektivitas pembentukan *fruit set* kelapa sawit. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan protokol ekstraksi DNA *E. kamerunicus* yang sangat berguna bagi analisis sidik jari DNA spesies tersebut. Hasil menunjukkan bahwa pada penggunaan suatu kit ekstraksi DNA, material sampel yang dihancurkan terlebih dahulu dengan *micro pestle* tanpa penambahan larutan penyangga menghasilkan DNA dengan kuantitas tertinggi, sementara perlakuan lain yang menggunakan *tissue lyser* sebagai penghancur material tidak memiliki perbedaan kuantitas DNA yang nyata. DNA yang diperoleh baik dengan cara menggunakan *micro pestle* atau *tissue lyser* untuk penghancuran material menghasilkan DNA yang memadai untuk analisis sidik jari DNA menggunakan teknik AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) dan sekuensing.

**Kata kunci:** protokol, ekstraksi DNA, *Elaeidobius kamerunicus*, kelapa sawit

*Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit*

Sri Wening (✉)  
Pusat Penelitian Kelapa Sawit  
Jl. Brigjen Katamsno No. 51 Medan, Indonesia  
Email: s.wening@iopri.org

**Abstract** African pollination weevil (*Elaeidobius kamerunicus* Faust) has an important role in the productivity of Indonesian oil palm plantation. Up to now, there has not been a comprehensive biological study of the species at molecular level. The basic knowledge is very useful for exploitation of the weevil for effective oil palm fruit set development. This research aimed to obtain DNA extraction protocol of *E. kamerunicus* for DNA fingerprinting of the species. Results showed that using a DNA extraction kit, material disruption by using *micro pestle* resulted the highest quantity of DNA, while there were no significant differences of resulted DNA quantity among treatments using *tissue lyser* for material disruption. DNA extracted by using *micro pestle* or *tissue lyser* for material disruption is adequate for DNA fingerprinting using AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) and sequencing techniques.

**Keywords:** protocol, DNA extraction, *Elaeidobius kamerunicus*, oil palm

## PENDAHULUAN

Serangga penyerbuk kelapa sawit (*Elaeidobius kamerunicus*) memiliki peran penting pada tingkat produktivitas perkebunan kelapa sawit di Indonesia (Prasetyo *et al.*, 2014). Sejak diintroduksi di Indonesia, terjadi peningkatan nilai *fruit set* hingga 75%. Namun sejak tahun 2007, masalah buah landak atau buah partenokarpi (*fruit set* yang rendah) dilaporkan terjadi pada berbagai kebun kelapa sawit di Indonesia dengan dugaan penyebabnya selain karena

efek pemanasan global, penggunaan bahan tanaman yang feminim (Prasetyo dan Susanto, 2012) dan aplikasi pestisida yang tidak tepat (Purba *et al.*, 2012), faktor *inbreeding depression* pasca 30 tahun introduksi juga mempengaruhi aktivitas dan perilaku kumbang *E. kamerunicus*. Hasil penelitian Prasetyo dan Susanto (2012) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan agresivitas kumbang *E. kamerunicus* di daerah Kalimantan dan Sumatera Utara. Introduksi *E. kamerunicus* dari Sumatera Utara ke Kalimantan mampu meningkatkan nilai *fruit set* sebesar 15% yang menandakan terjadi perbaikan genetik pada keturunannya (Prasetyo *et al.*, 2015). Namun demikian, konfirmasi mengenai perbaikan genetik tersebut perlu diteliti sampai pada tingkat molekuler.

Hingga saat ini, belum ada penelitian yang cukup komprehensif mengenai biologi spesies tersebut pada tingkat molekuler. Padahal, pengetahuan dasar tersebut sangat berguna bagi karakterisasi kemungkinan perubahan genetik serangga maupun pengembangan serangga tersebut untuk tujuan efektivitas pembentukan *fruit set* kelapa sawit. Penelitian biologi molekuler, khususnya analisis sidik jari DNA memerlukan stok sampel DNA yang memiliki kualitas dan kuantitas yang cukup. Hingga saat ini, belum ada laporan mengenai analisis sidik jari DNA *E. kamerunicus* beserta protokol ekstraksi DNA-nya. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan protokol ekstraksi DNA *E. kamerunicus* yang tepat guna di PPKS, untuk analisis sidik jari DNA spesies tersebut.

Secara garis besar, terdapat dua tahap protokol yang harus dikerjakan dalam proses analisis sidik jari DNA, yaitu ekstraksi DNA dan *downstream analysis* atau analisis lanjutannya. Ekstraksi DNA merupakan proses mengekstrak DNA dari jaringan sampel dengan cara memisahkan dan memurnikan DNA dari senyawa-senyawa lain dalam jaringan. Ekstraksi DNA yang baik akan menghasilkan DNA dengan tingkat kemurnian yang tinggi dan kuantitas yang cukup untuk analisa DNA yang akan dilakukan. Ekstraksi DNA tanaman relatif sulit dilakukan karena adanya dinding sel yang harus dihancurkan (Manen *et al.*, 2005). Tetapi, ekstraksi DNA dari jaringan serangga juga bukan berarti tanpa ada kendala. Jaringan luar serangga yang keras menyebabkan sulitnya destruksi material. Ada kalanya terdapat senyawa fenolik atau tanin tanaman pada jaringan serangga yang menyebabkan sulitnya analisis lanjutan pada

DNA yang tidak termurnikan dari senyawa tersebut. Ukuran serangga yang kecil juga merupakan masalah tersendiri untuk memperoleh stok DNA yang diharapkan (Calderón-Cortés *et al.*, 2010).

Terdapat berbagai macam teknik atau metode ekstraksi DNA dari serangga. Pemilihan teknik tersebut berdasarkan beberapa pertimbangan, seperti: kondisi spesimen (ukuran, awetan, sampel segar, serangga vektor, dan lain sebagainya), waktu pengerjaan, biaya, dan kualitas DNA yang dibutuhkan (Asghar *et al.*, 2015). Diduga, ekstraksi DNA dari *E. kamerunicus* akan mengalami kendala karena ukuran serangga yang kecil.

## BAHAN DAN METODE

Optimasi ekstraksi DNA menggunakan sampel *Elaeidobius kamerunicus* yang ditangkap di daerah Marihat, Simalungun, Sumatera Utara. Optimasi dilakukan dengan melakukan ekstraksi DNA dari satu individu serangga ( $\pm 0,75 \mu\text{g}$ ; yang telah disimpan di freezer  $-20^\circ\text{C}$ , dan direndam sesaat pada etanol absolut (Merck) sebelum diekstraksi), menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Tissue) GT100 (Geneaid, 2016), sesuai instruksi dari pabrikan, dengan variasi protokol yang diuji sebagai berikut:

- Sampel dihancurkan dengan *micro pestle* tanpa *GT Buffer*
- Sampel dihancurkan dengan *tissue lyser* (Tissuelyser II, Qiagen) tanpa *GT Buffer*
- Sampel dihancurkan dengan *tissue lyser* (Tissuelyser II, Qiagen) dan ditambah *GT Buffer*
- Sampel dihancurkan dengan *micro pestle* lalu ditambah *GT Buffer* dilanjutkan dengan *tissue lyser* (Tissuelyser II, Qiagen)

DNA hasil ekstraksi diukur kuantitasnya menggunakan Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Perbedaan tiap perlakuan dianalisis dengan rancangan acak lengkap, dengan tiga kali pengulangan untuk tiap variasi protokol, dan analisis lanjutan LSD (*Least Significant Difference*).

DNA yang diperoleh dari protokol terpilih kemudian dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui sekuen DNA-nya, menggunakan pasangan primer LCO1490 dan HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). *Polymerase Chain*

*Reaction* (PCR) dilakukan menggunakan komponen reaksi: 0,5  $\mu\text{L}$  BIOTAQ *polymerase* (5U/ $\mu\text{L}$ ) (Bioline), 2  $\mu\text{L}$  10x bufer  $\text{NH}_4$  dan 0,3  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM) (satu paket dengan produk taq *polymerase*), 0,4  $\mu\text{L}$  dNTP mix (10 mM) (Promega), 1  $\mu\text{L}$  primer forward (10  $\mu\text{M}$ ) (IDT), 1  $\mu\text{L}$  primer reverse (10  $\mu\text{M}$ ) (IDT), 4  $\mu\text{L}$  DNA sampel (1-10 ng/reaksi), dan 10,8  $\mu\text{L}$   $\text{ddH}_2\text{O}$ , sehingga total volume reaksi mencapai 20  $\mu\text{L}$ . Amplifikasi sampel DNA dilakukan menggunakan mesin PCR C1000 Touch Cyclyer (BioRad) dengan tahapan proses sebagai berikut: denaturasi awal pada 94°C selama 2 menit, diikuti dengan 35 siklus denaturasi pada 94°C selama 30 detik, penempelan pada 53°C selama 1 menit, pemanjangan pada 72°C selama 2 menit dan 15 detik, kemudian diikuti pemanjangan akhir selama 10 menit pada suhu 72°C. Hasil amplifikasi dielektroforesis selama satu jam pada 80 volt, menggunakan *agarose* 1%. Sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan jasa komersial yang disediakan oleh 1stBASE (Malaysia). Analisis hasil sekuensing DNA dilakukan dengan bantuan Bioedit (Hall, 1999) dan FinchTV *version* 1.4.0 (Geospiza Inc.). Dilakukan juga pencarian sekuen DNA yang homolog pada *database National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dengan sekuen DNA yang diperoleh pada penelitian ini, untuk mengetahui spesies pemilikinya.

Selain itu, untuk mengetahui kualitas DNA hasil ekstraksi, dilakukan analisis *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) menggunakan kombinasi pasangan primer selektif yaitu EcoRI-ACA/Msel-CAG dan EcoRI-ACA/Msel-CTT. Protokol yang digunakan sesuai dengan protokol Vos *et al.* (1995) yang dimodifikasi, seperti yang diuraikan oleh Ningrum *et al.* (2014). Semua tahap analisis mulai dari ekstraksi DNA hingga AFLP-PCR dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Kelapa Sawit. Analisis fragmen menggunakan *capillary sequencer*, menggunakan jasa yang disediakan secara komersial oleh 1stBASE (Malaysia). Profil AFLP divisualisasikan dengan menggunakan perangkat lunak GeneMarker<sup>®</sup> v 2.4.0 (SoftGenetics LLC<sup>®</sup>).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Terdapat berbagai macam protokol ekstraksi DNA dari serangga, seperti protokol CTAB, SDS, dan beberapa kit komersial. Protokol atau metode

ekstraksi DNA yang berbeda akan mempengaruhi kuantitas dan kualitas DNA hasil ekstraksi. Sehingga, perlu dipertimbangkan pemilihan protokol ekstraksi DNA, dengan prinsip bahwa protokol tersebut adalah yang menghasilkan DNA dengan kuantitas yang optimal, minim degradasi DNA, hemat waktu, biaya, bahan dan tenaga, bisa dilakukan untuk jumlah sampel yang banyak, serta minim limbah yang berbahaya (Chen *et al.*, 2010).

Pada penelitian ini, ekstraksi DNA *Elaeidobius kamerunicus* dilakukan menggunakan kit *DNA Genomic DNA Mini Kit (Tissue)* GT100 (Geneaid), di mana protokol saran dari pabrikan pada prinsipnya adalah menggunakan metode kolom sentrifugasi, dikombinasikan dengan penggunaan *buffer* untuk lisis, pengikatan dan elusi DNA (Geneaid, 2016). *E. kamerunicus* merupakan serangga yang berukuran kecil, sehingga kesulitan proses ekstraksi DNA yang diduga adalah kuantitas DNA hasil ekstraksi yang sangat sedikit. Hal ini akan diatasi dengan variasi modifikasi pada tahap awal proses ekstraksi, yaitu pada tahap penghancuran material secara mekanis. Proses penghancuran harus dapat dilakukan secara seksama, sehingga material dapat hancur dan larut pada larutan penyangga dengan baik. Di lain pihak, proses penghancuran tersebut juga harus dapat dilakukan secara mudah dan cepat, hal yang sangat penting terutama jika sampel yang diekstraksi dalam jumlah yang banyak.

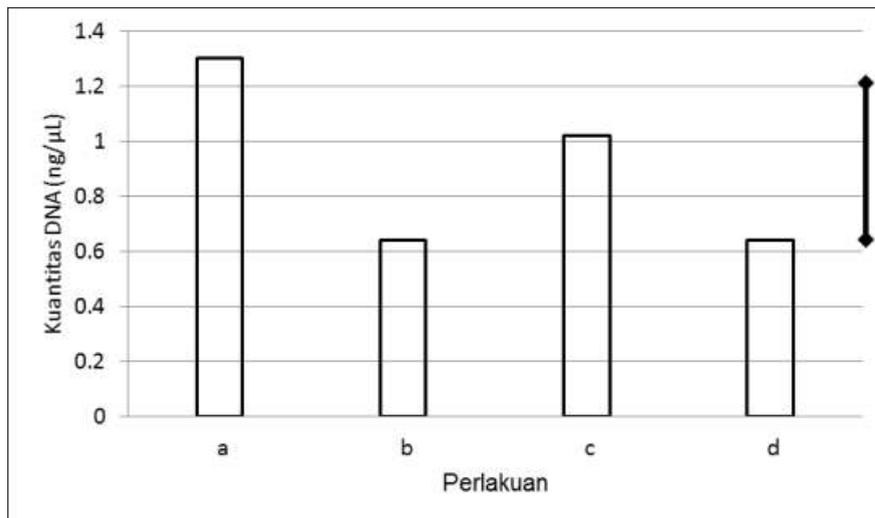
Hasil menunjukkan bahwa perlakuan a (sampel dihancurkan dengan *micro pestle* tanpa *GT Buffer*) menghasilkan DNA hasil ekstraksi dengan kuantitas tertinggi (rerata kuantitas DNA: 1,3 ng/ $\mu\text{L}$ ) secara nyata dibandingkan dengan tiga perlakuan lainnya yang menggunakan *tissue lyser* (Gambar 1). Tidak terdapat perbedaan kuantitas DNA yang nyata yang dihasilkan oleh protokol b, c, dan d (rerata kuantitas DNA berturut-turut: 0,64 ng/ $\mu\text{L}$ ; 1,02 ng/ $\mu\text{L}$ ; 0,64 ng/ $\mu\text{L}$ ) yang menggunakan *tissue lyser*, walaupun dapat diamati pada Gambar 1 bahwa perlakuan c (sampel dihancurkan dengan *tissue lyser* dan ditambah *GT Buffer*) memiliki kuantitas DNA yang tertinggi.

Protokol a menghasilkan kuantitas DNA yang tertinggi secara nyata jika dibandingkan dengan protokol lain yang dicoba pada penelitian ini. Namun demikian, protokol a memerlukan waktu dan tenaga yang lebih jika dibandingkan dengan protokol b dan c,

karena diperlukan penghancuran material dengan menggunakan *micro pestle*, secara manual. Pada protokol b dan c, material dihancurkan secara otomatis dengan hanya menggunakan *tissue lyser*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa protokol a disarankan untuk dilakukan jika jumlah yang diekstraksi sedikit. Pada pengerjaan ekstraksi DNA *E. kamerunicus* yang banyak, protokol c lebih disarankan.

Untuk mengetahui kualitas DNA hasil ekstraksi, dilakukan analisis lanjutan berupa sekuensing DNA dan AFLP. Sampel DNA yang digunakan adalah sampel DNA hasil protokol a yang memang telah terbukti menghasilkan kuantitas DNA tertinggi, serta sampel DNA protokol d yang menghasilkan kuantitas DNA terendah. Kedua protokol tersebut digunakan masing-masing untuk mengekstraksi DNA dari satu individu *E. kamerunicus*. Protokol a juga digunakan untuk mengekstraksi DNA dari 5 individu *E. kamerunicus*.

Hasil AFLP menunjukkan bahwa pada dua kombinasi primer selektif yang digunakan, DNA yang diekstraksi menggunakan protokol a dan d pada satu individu serangga maupun protokol a pada 5 individu serangga menghasilkan profil AFLP yang mudah terbaca (Gambar 2 dan 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa DNA yang diekstraksi menggunakan protokol a dan d memiliki kualitas yang bagus (DNA yang tidak murni tidak akan dapat terpotong oleh enzim restriksi dan tidak dapat diamplifikasi pada proses AFLP). Profil DNA yang diekstraksi dari 5 individu serangga cukup dapat terbaca seperti pada profil DNA yang diekstraksi dari 1 individu serangga (Gambar 2 dan 3). Analisis sidik jari DNA untuk menguji kualitas DNA hasil optimasi protokol ekstraksinya pernah dilaporkan oleh Mega dan Revers (2011) dengan menggunakan AFLP, serta Tian dan Yu (2013) dengan menggunakan SSR (*Simple Sequence Repeat*).



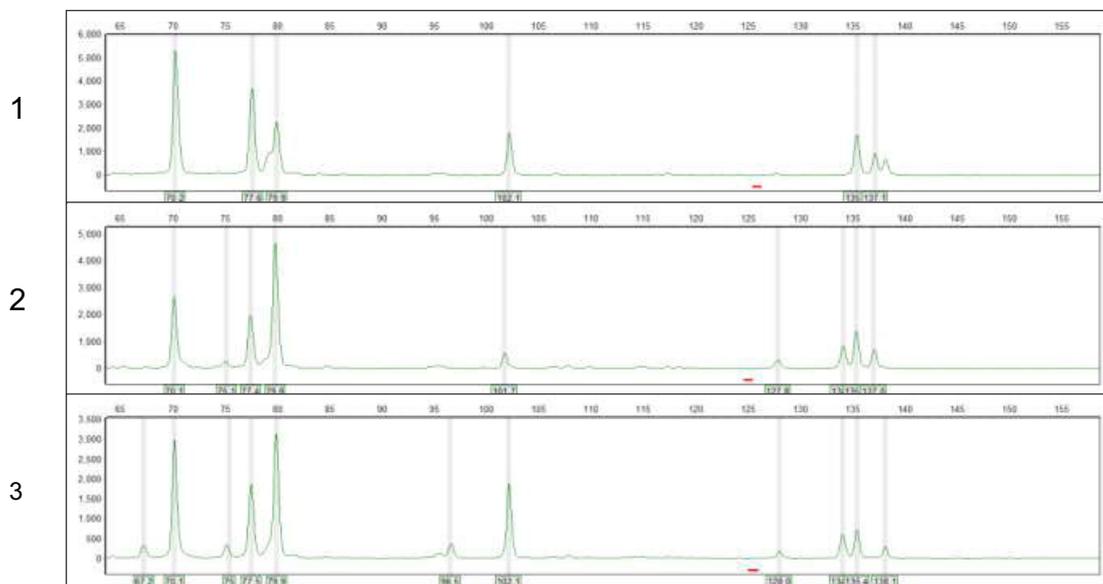
Gambar 1. Rerata kuantitas DNA yang diperoleh dengan protokol a (sampel dihancurkan dengan *micro pestle* tanpa *GT Buffer*), b (sampel dihancurkan dengan *tissue lyser* tanpa *GT Buffer*), c (sampel dihancurkan dengan *tissue lyser* dan ditambah *GT Buffer*, dan d (sampel dihancurkan dengan *micro pestle* lalu ditambah *GT Buffer* dilanjutkan dengan *tissue lyser*).  $LSD=0,54$  (tanda garis paling kanan).

Picture 1. Mean of DNA quantity obtained by protocol a (material is disrupted by using *micro pestle* without *GT Buffer*), b (material is disrupted by using *tissue lyser* without *GT Buffer*), c (sample is disrupted by using *tissue lyser* with *GT Buffer*) and d (material is disrupted by using *micro pestle* with *GT Buffer* and continued by using *tissue lyser*).  $LS=0.54$  (bar).

Hasil amplifikasi DNA *E. kamerunicus* menggunakan pasangan primer LCO1490 dan HCO2198 menghasilkan fragmen DNA berukuran sekitar 700 pasangan basa (Gambar 4). Telah dilaporkan bahwa pasangan primer ini mengamplifikasi Curculionidae dan menghasilkan fragmen DNA sepanjang 658 pasangan basa (Folmer *et al.*, 1994). Keberhasilan pasangan primer tersebut dalam mengamplifikasi DNA menunjukkan bahwa kualitas DNA genom yang diperoleh cukup bagus. Stok DNA yang diperoleh mencakup DNA mitokondria, karena pasangan primer yang digunakan didesain untuk mengamplifikasi daerah *mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1*, yang sering digunakan untuk *barcoding* spesies hewan (Derycke *et al.*, 2010; Arif *et al.*, 2011; Gutiérrez-López *et al.*, 2015).

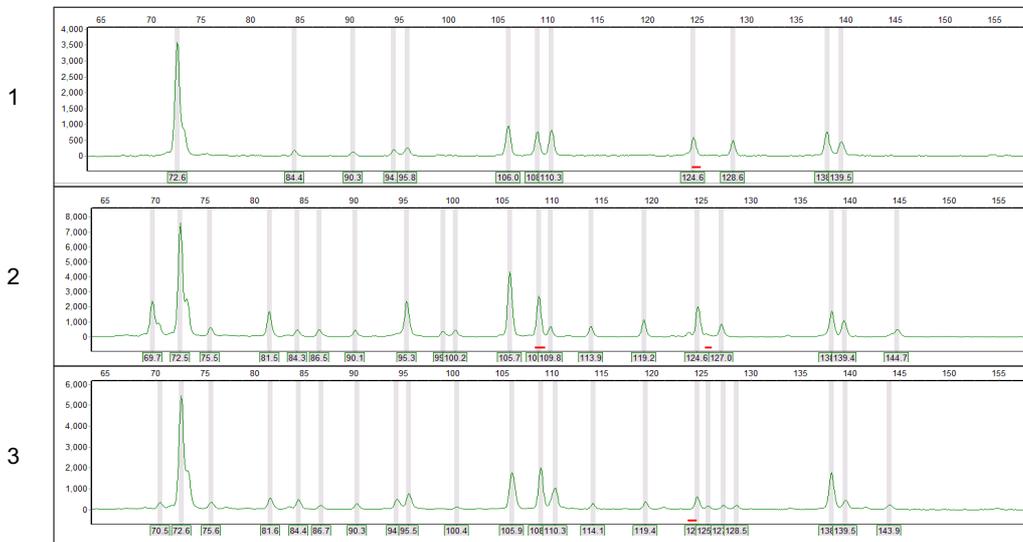
Hasil sekuensing DNA pada fragmen hasil amplifikasi satu individu *E. kamerunicus* menggunakan pasangan primer tersebut cukup jelas terbaca, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5. Sekuensing dua arah pada fragmen DNA tersebut menunjukkan beberapa

lokus heterozigot (Gambar 6). Hal tersebut menunjukkan bahwa analisis heterozigositas sekuen DNA dapat dilakukan pada DNA hasil ekstraksi menggunakan protokol dan teknik sekuensing yang telah dilakukan tersebut. Di lain pihak, sekuensing fragmen hasil amplifikasi DNA 5 individu *E. kamerunicus* menggunakan pasangan primer tersebut menghasilkan profil DNA yang sulit terbaca, yang dapat dipahami karena adanya variasi sekuen DNA di antara kelima individu *E. kamerunicus* yang diekstraksi DNA-nya (Gambar 7). Hal tersebut menunjukkan bahwa analisis sekuensing DNA hanya dapat dilakukan pada DNA individu tunggal dan bukan pada DNA gabungan dari beberapa individu. Untuk lebih meyakinkan bahwa hasil sekuensing yang sulit dibaca tersebut adalah karena variasi sekuen pada beberapa individu dan bukan karena DNA kontaminan dari spesies lain atau karena amplifikasi yang tidak spesifik, maka perlu dilakukan kajian lebih lanjut dengan merubah kondisi PCR. Suhu penempelan primer yang ditinggikan atau konsentrasi  $MgCl_2$  yang



Gambar 2. Profil AFLP menggunakan kombinasi primer selektif EcoRI-ACA/MseI-CAG pada 1 (protokol a, ekstraksi 1 individu), 2 (protokol d, ekstraksi 1 individu), 3 (protokol a, ekstraksi 5 individu)

Picture 2. AFLP profile by EcoRI-ACA/MseI-CAG selective combination primer with 1 (protocol a, DNA extraction of 1 individual), 2 (protocol d, DNA extraction of 1 individual), 3 (protocol a, DNA extraction of 5 individual)



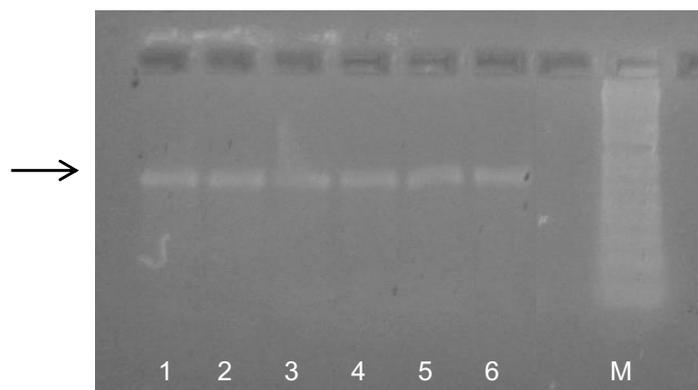
Gambar 3. Profil AFLP menggunakan kombinasi primer selektif EcoRI-ACA/MseI-CTT pada 1 (protokol a, ekstraksi 1 individu), 2 (protokol d, ekstraksi 1 individu), 3 (protokol a, ekstraksi 5 individu).

Picture 3. AFLP profile by EcoRI-ACA/MseI-CTT selective combination primer with 1 (protocol a, DNA extraction of 1 individual), 2 (protocol d, DNA extraction of 1 individual), 3 (protocol a, DNA extraction of 5 individual).

diturunkan akan meningkatkan spesifisitas primer pada proses amplifikasi (Moreau, 2014).

Untuk mengecek apakah fragmen DNA hasil amplifikasi merupakan DNA *E. kamerunicus*, dilakukan pencarian fragmen DNA yang telah terdokumentasi pada database NCBI melalui aplikasi BLAST. Setelah sekuen DNA sampel 1 dijadikan query pada BLAST terhadap database DNA NCBI, diketahui

bahwa spesies pada database NCBI yang memiliki kesamaan sekuen DNA tertinggi adalah *Coloracalles humerosus*, yang merupakan spesies yang termasuk Curculionidae. Hal ini dapat terjadi karena *E. kamerunicus* termasuk pada Curculionidae (Tuo *et al.*, 2011). Tingkat identitas yang tidak tinggi (85% - Gambar 8) menunjukkan bahwa sekuen tersebut adalah sekuen *cox1* spesies yang termasuk



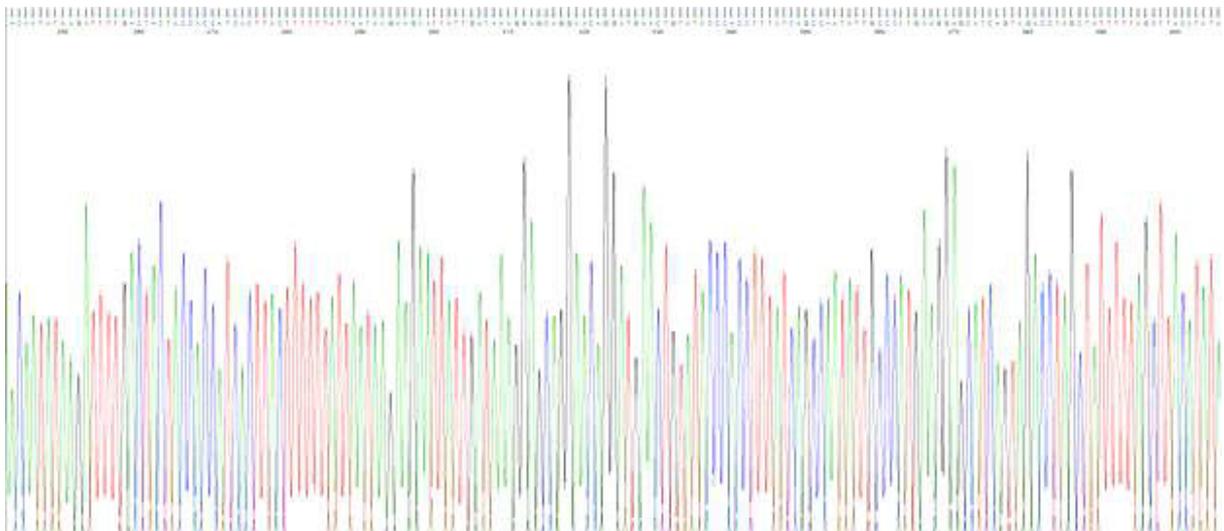
Gambar 4. Hasil elektroforesis DNA *E. kamerunicus* yang diamplifikasi menggunakan pasangan primer LCO1490 dan HCO2198 (sumur 1 hingga 6). M= 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Picture 4. Result of electrophoresis of *E. kamerunicus* DNA amplified by using LCO1490 and HCO2198 primer pair (well 1 to 6). M= 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Curculionidae, tetapi bukan *Coloracalles humerosus*. Tidak ditemukannya sekuen *cox1 E. kamerunicus* pada database NCBI, menguatkan pendapat tersebut. Hal ini juga merupakan indikasi minimnya hasil penelitian DNA *E. kamerunicus* yang didokumentasikan di NCBI.

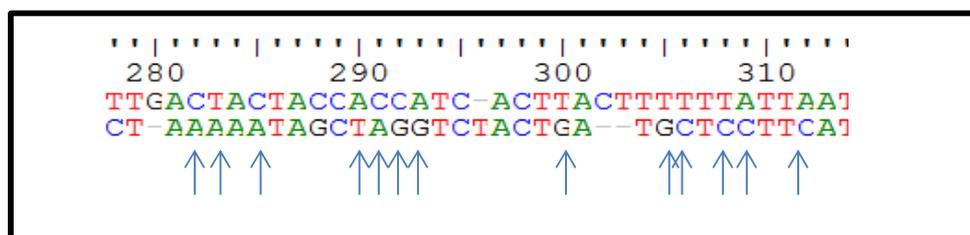
Penelitian ini menghasilkan kesimpulan bahwa ekstraksi DNA *E. kamerunicus* dengan menggunakan kit DNA Genomic DNA Mini Kit (Tissue) GT100 (Geneaid) dengan perlakuan material sampel yang dihancurkan terlebih dahulu dengan *micro pestle* tanpa penambahan larutan penyangga menghasilkan DNA dengan kuantitas tertinggi secara nyata. Perlakuan tersebut disarankan

jika jumlah sampel yang diekstraksi tidak banyak. Sementara itu, perlakuan-perlakuan lain yang menggunakan *tissue lyser* sebagai penghancur material tidak menghasilkan DNA dengan kuantitas yang berbeda nyata. DNA yang diperoleh baik dengan cara menggunakan *micro pestle* atau *tissue lyser* untuk penghancuran material menghasilkan DNA yang memadai untuk analisis sidik jari DNA menggunakan teknik AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) dan sekuensing. Protokol dengan perlakuan sampel dihancurkan dengan *tissue lyser* dan ditambah *GT Buffer* disarankan jika jumlah sampel *E. kamerunicus* yang akan diekstraksi dalam jumlah besar.



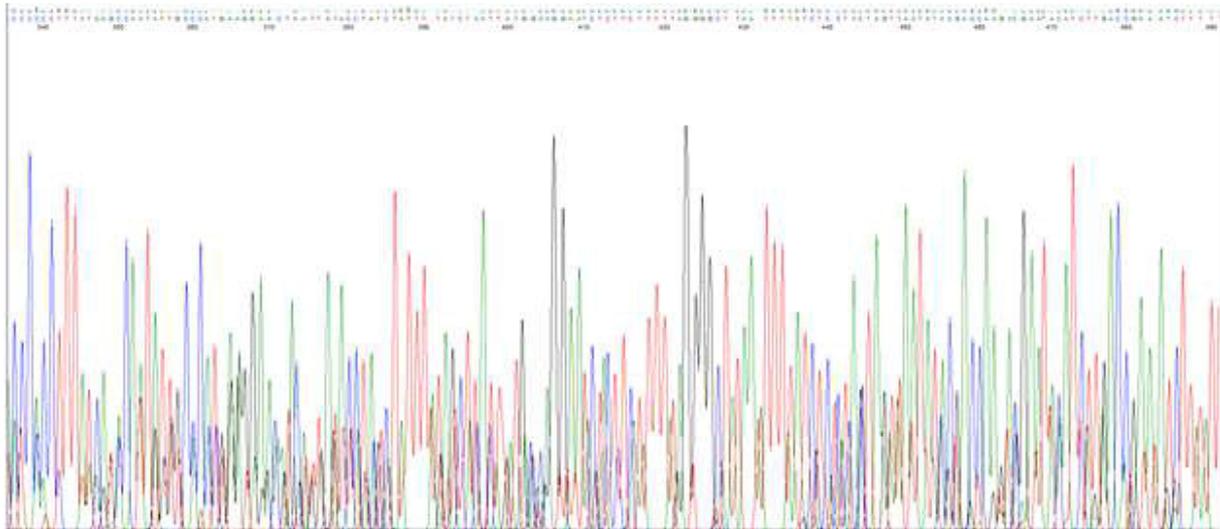
Gambar 5. Hasil sekuensing DNA pada fragmen hasil amplifikasi satu individu *E. kamerunicus* menggunakan pasangan primer LCO1490 dan HCO2198.

Picture 5. DNA sequencing result of amplification result fragment of one individual *E. kamerunicus* by using LCO1490 dan HCO2198 primer pair.



Gambar 6. Sekuen DNA dua arah pada fragmen hasil amplifikasi satu individu *E. kamerunicus* menggunakan pasangan primer LCO1490 dan HCO2198. Tanda panah menunjukkan lokus heterozigot.

Picture 6. Two direction of DNA sequence of amplification result of one individual of *E. kamerunicus* by using LCO1490 dan HCO2198 primer pair. Arrows show heterozygote loci.



Gambar 7. Hasil sekuensing DNA pada fragmen hasil amplifikasi lima individu *E. kamerunicus* menggunakan pasangan primer LCO1490 dan HCO2198.

Picture 7. DNA sequencing result of amplification result of five individuals of *E. kamerunicus* by using LCO1490 dan HCO2198 primer pair.

Tingkat kemurnian DNA hasil ekstraksi akan mempengaruhi daya simpan DNA. Senyawa oksidan yang tidak terpisahkan dengan baik dengan DNA akan mengakibatkan degradasi DNA, sejalan dengan waktu penyimpanan. Walaupun kemurnian DNA *E. kamerunicus* yang diperoleh cukup baik, terbukti dengan keberhasilan amplifikasi dan pemotongan DNA oleh enzim restriksi, tetapi masih tidak tertutup kemungkinan adanya senyawa oksidan tanaman dalam jumlah yang sangat kecil. *E. kamerunicus*

mengonsumsi nektar bunga kelapa sawit, sehingga nektar tersebut kemungkinan besar terikut dalam proses ekstraksi DNA. Hal ini menyarankan perlunya penelitian lebih lanjut mengenai tingkat kemurnian DNA dan daya simpan DNA yang diekstraksi dengan protokol yang disarankan tersebut.

Terdapat kelebihan dan kekurangan masing-masing protokol ekstraksi DNA. Protokol *home made* (seperti protokol CTAB dan SDS) merupakan alternatif

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Coloracalles humerosus bio-material ZFMK-DNA JJ0545 cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial</a>	673	673	95%	0.0	85%	<a href="#">GU967952.1</a>
<a href="#">Coloracalles humerosus isolate ZFMK-DNA JJ0079 cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial</a>	673	673	95%	0.0	85%	<a href="#">EU286460.1</a>
<a href="#">Acalyptus carpini voucher BC ZSM CQI 00219 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial</a>	656	656	94%	0.0	85%	<a href="#">KM448779.1</a>
<a href="#">Acalyptus carpini voucher ZMUQ:FIN:001679 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial</a>	656	656	94%	0.0	85%	<a href="#">KJ963255.1</a>
<a href="#">Elleiscus bipunctatus voucher ZMUQ:FIN:004794 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial</a>	656	656	94%	0.0	85%	<a href="#">KJ962308.1</a>
<a href="#">Metatma balsaminae cytochrome c oxidase 1 (cox1) gene, partial cds, mitochondrial</a>	651	651	95%	0.0	85%	<a href="#">KJ850232.1</a>
<a href="#">Coloracalles humerosus bio-material ZFMK-DNA JJ0548 cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial</a>	649	649	90%	0.0	86%	<a href="#">GU967955.1</a>
<a href="#">Scellanoma elydimorpha cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial</a>	640	640	98%	2e-179	84%	<a href="#">HQ891478.1</a>
<a href="#">Eustylus hybridus cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial</a>	640	640	98%	2e-179	84%	<a href="#">HQ891445.1</a>

Gambar 8. Hasil BLAST pada sekuen hasil amplifikasi DNA *E. kamerunicus* dengan pasangan primer LCO1490 dan HCO2198.

Picture 8. BLAST result of amplification result of *E. kamerunicus* DNA by using LCO1490 dan HCO2198 primer pair.

protokol yang murah, tetapi perlu waktu untuk persiapan reagen dan optimasi untuk menghasilkan DNA yang berkualitas. Kit komersial dapat melakukan ekstraksi DNA dengan cepat, tidak menggunakan kloroform atau fenol yang berbahaya, tetapi harganya lebih mahal jika dibandingkan dengan protokol *home made* (Mega dan Revers, 2011). Perbandingan hasil ekstraksi DNA menggunakan beberapa protokol dari kit komersial atau protokol *home made* merupakan kajian menarik yang dapat dilakukan lebih lanjut.

## KESIMPULAN

Penelitian ini menghasilkan kesimpulan bahwa Ekstraksi DNA *E. kamerunicus* dengan menggunakan kit *DNA Genomic DNA Mini Kit (Tissue)* GT100 (*Geneaid*) dengan perlakuan:

1. material sampel yang dihancurkan terlebih dahulu dengan *micro pestle* tanpa penambahan larutan penyangga menghasilkan DNA dengan kuantitas tertinggi secara nyata. Perlakuan tersebut disarankan jika jumlah sampel yang diekstraksi tidak banyak.
2. material sampel dihancurkan dengan *tissue lyser* dan ditambah *GT Buffer* disarankan jika jumlah sampel *E. kamerunicus* yang akan diekstraksi dalam jumlah besar.

Selain itu, DNA yang diperoleh baik dengan cara menggunakan *micro pestle* atau *tissue lyser* untuk penghancuran material menghasilkan DNA yang memadai untuk analisis sidik jari DNA menggunakan teknik AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) dan sekuensing.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kelompok Peneliti Proteksi Tanaman serta Kelompok Peneliti Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman PPKS atas bantuannya saat pelaksanaan penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

Arif, I.A., H.A. Khan, M. Shobrak dan J. Williams. 2011. Cytochrome c oxidase subunit I barcoding of the green bee-eater (*Merops orientalis*). *Genetics and Molecular Research* 10. p3992-3998.

Asghar, U., M.F. Malik, F. Anwar, A. Javed dan A. Raza. 2015. DNA extraction from insects by using different techniques: a review. *Advances in Entomology* 3. p132-138.

Calderón-Cortés, N., M. Quesada, H. Cano-Camacho dan G. Zavala-Páramo. 2010. A simple and rapid method for DNA isolation from Xylophagous insects. *International Journal of Molecular Sciences* 11. p5056-5064.

Chen, H., M. Rangasamy, S.Y. Tan, H. Wang dan B.D. Siegfried. 2010. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *PLoS ONE* 5. pe11963.

Derycke, S., J. Vanaverbeke, A. Rigaux, T. Bäckeljau dan T. Moens. 2010. Exploring the Use of Cytochrome Oxidase c Subunit 1 (COI) for DNA Barcoding of Free-Living Marine Nematodes. *PLoS ONE* 5. pe13716.

Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz dan R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3. p294–299.

Geneaid. 2016. Geneaid™ DNA Mini Kit (Tissue). Ver. 07.16.15. <http://www.geneaid.com/>.

Gutiérrez-López, R., J. Martínez-de la Puente, L. Gangoso, R.C. Soriguer dan J. Figuerola. 2015. Comparison of manual and semi-automatic DNA extraction protocols for the barcoding characterization of hematophagous louse flies (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of Vector Ecology* 40. p11-15.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41. p95-98.

Manen, J.-F., O. Sinitsyna, L. Aeschbach, A.V. Markov dan A. Sinitsyn. 2005. A fully automatable enzymatic method for DNA extraction from plant tissues. *BMC Plant Biology* 5. p23.

Mega, N.O. dan L.F. Revers. 2011. Developing a rapid, efficient and low cost method for rapid DNA extraction from arthropods. *Ciência Rural, Santa Maria*, on line.



- Moreau, C.S. 2014. A practical guide to DNA extraction, PCR, and gene-based DNA sequencing in insects. HALTERES 5. p32-42.
- Ningrum, D.A., S. Wening dan S. Hanum. 2014. Screening of AFLP Primers for Molecular Variability Test in Wild Type Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from Cameroon. 2014 International Oil Palm Conference, Nusa Dua, Bali. IOPRI
- Prasetyo, A.E., H. Priwiratama dan A. Susanto. 2015. Peningkatan Fruit Set Kelapa Sawit di Kalimantan dengan Introduksi *Elaeidobius kamerunicus* Faust dari Sumatera Utara. Prosiding Pertemuan Teknis Kelapa Sawit 19-21 Mei 2015, Yogyakarta.
- Prasetyo, A.E., W.O. Purba dan A. Susanto. 2014. *Elaeidobius kamerunicus*: application of hatch and carry technique for increasing oil palm fruit set. Journal of Oil Palm Research 26. p195-202.
- Prasetyo, A.E. dan A. Susanto. 2012. Meningkatkan fruit set kelapa sawit dengan teknik hatch & carry *Elaeidobius kamerunicus*. Seri Buku Kelapa Sawit Populer 11 Medan: Pusat Penelitian Kelapa Sawit.
- Prasetyo, A.E. dan A. Susanto. 2012. Serangga penyerbuk kelapa sawit *Elaeidobius kamerunicus* Faust: agresivitas dan dinamika populasi di Kalimantan Tengah. Jurnal Penelitian Kelapa Sawit 20. p103-113.
- Purba, R.Y., T.A.P. Rozziansha dan Y. Pangaribuan. 2012. Strategies to improve effectiveness of pollination and productivity on early mature oil palm. Proceeding of Fourth IOPRI-MPOB International Seminar: Existing and Emerging of Oil Palm Pests and Diseases – Advance in Research and Management, Bandung.
- Tian, E.-W. dan H. Yu. 2013. A simple and rapid DNA extraction protocol of small insects for PCR amplification. Entomological News 123. p303-310.
- Tuo, Y., H.K. Koua dan N. Hala. 2011. Biology of *Elaeidobius kamerunicus* and *Elaeidobius plagiatus* (Coleoptera: Curculionidae) Main Pollinators of Oil Palm in West Africa. European Journal of Scientific Research 49. p426-432.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper dan M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23. p4407-4414.
- Wening, S., A.E. Prasetyo, A. Susanto, H.Y. Rahmadi, Y. Yenni dan A.R. Purba. 2013. Keragaman sekuen gen kitinase: Identifikasi penanda toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*. Pertemuan Teknis Kelapa Sawit 2013, Jakarta. PPKS.