

This file has been cleaned of potential threats.

If you confirm that the file is coming from a trusted source, you can send the following SHA-256 hash value to your admin for the original file.

0fa4e881eaa224ed2da72ffa98802df1a95930fc599348afb8e350d505d4bb39

To view the reconstructed contents, please SCROLL DOWN to next page.

ISOLASI NON-DESTRUKTIF DAN DESTRUKTIF GEN COI PADA SERANGGA JENIS COLEOPTERA PEMBAWA PATOGEN *CERATOCYSTIS*

*Non-destructive and destructive method for COI gene isolation from Coleoptera as
Ceratocystis pathogen vector*

Anindya S. Ningtias¹, Istiana Prihatini¹ dan Maryatul Qiptiyah¹

¹Kontributor Utama, ¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar Km 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta, Indonesia
email penulis korespondensi: istiana.prihatini@biotifor.or.id

Tanggal diterima: 04 Maret 2021, Tanggal direvisi: 23 Maret 2021, Disetujui terbit: 16 Juni 2021

ABSTRACT

Identification of insect species using molecular approach is one of the first steps in managing *Ceratocystis*. Proper species identification of the vectors of *Ceratocystis* will provide an effective way in limiting the distribution of this pathogenic fungi. The isolation of insect DNA is a crucial step in species identification using molecular characters. The aim of this research were to obtain the most effective method for isolating the COI gene and to confirm the insect DNA using amplification of the DNA through polymerase chain reaction (PCR). Twelve unidentified Coleoptera specimen collected from *Acacia* spp. plantation in Pelalawan Riau were randomly selected for this study. The insect DNA were isolated using the CTAB buffer with four different pre-incubation treatments, involved a non destructive method, i.e. soaking (R), destructive methods, i.e. crushing (H), soaking-crushing (RH) and freezing-crushing (FH). Two sets of primer, LCO1490/HCO2196 and LCO1490/HCO2198 were used to amplify the DNA of COI gene. The results shows, the COI gene was isolated from all pre-incubation treatments, except in the non-destructive treatment. The isolated DNA of COI gene was successfully amplified using both primer sets used in this study.

Keywords: DNA extraction, insect, DNA amplification, CTAB buffer, pre-incubation

ABSTRAK

Ketepatan dalam identifikasi jenis serangga pembawa *Ceratocystis* merupakan salah satu langkah penting dalam pengendalian jamur patogen *Ceratocystis*. Isolasi DNA serangga merupakan langkah awal yang penting dalam proses identifikasi jenis secara molekuler. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode yang paling efektif dalam isolasi gen COI pada serangga. Penelitian ini menggunakan 12 spesimen Coleoptera yang belum diketahui jenisnya dikoleksi dari hutan tanaman *Acacia* spp. di Pelalawan Riau. Isolasi DNA dari sampel serangga dilakukan menggunakan larutan CTAB dengan empat perlakuan inkubasi awal yang berbeda, yaitu metode non destruktif melalui perendaman (R), metode destruktif melalui penghancuran (H), perendaman-penghancuran (RH) dan pembekuan-penghancuran (FH). Amplifikasi DNA dari gen COI dilakukan dengan menggunakan dua pasang primer yaitu LCO1490/HCO2196 dan LCO1490/HCO2198. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen COI serangga berhasil diisolasi menggunakan semua perlakuan inkubasi awal kecuali pada perlakuan non destruktif. DNA dari bagian gen COI yang telah terisolasi dapat diamplifikasi dengan baik menggunakan kedua pasang primer yang digunakan pada penelitian ini.

Kata kunci: ekstraksi DNA, serangga, amplifikasi DNA, buffer CTAB, inkubasi awal

I. PENDAHULUAN

Ceratocystis spp. merupakan kelompok jamur patogen yang mengancam tanaman baik tanaman pertanian, perkebunan maupun kehutanan khususnya di daerah tropis. Kasus *Ceratocystis* di Indonesia pertama kali dilaporkan di pulau Jawa, yaitu menyerang tanaman *Coffea arabica* (Zimmerman, 1990 dalam Tarigan et al., 2011). Spesies *Ceratocystis* juga dilaporkan mengancam tanaman kehutanan,

terutama pada jenis akasia dan eukaliptus (Rahayu et al., 2015). Jenis *Acacia mangium* dan *Acacia crassicaarpa* di Pekanbaru menunjukkan gejala layu tajuk akibat serangan jamur jenis *Ceratocystis moniliformis* (Tarigan et al., 2011). Selain itu, tanaman yang terserang *Ceratocystis* juga dapat menunjukkan gejala kanker batang, busuk akar dan buah, serta layunya pembuluh vaskuler (Rahayu et al., 2015; Roux et al., 2004).

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan adanya asosiasi beberapa jenis serangga dengan beberapa jenis *Ceratocystis* (Roux & Wingfield, 2009). Selanjutnya, serangga tersebut diduga memiliki peran strategis dalam penyebaran spora jamur penyebab penyakit *Ceratocystis*. Mekanisme terjadinya asosiasi diantara keduanya dipicu oleh aroma buah yang muncul dari adanya infeksi jamur *Ceratocystis* pada tanaman yang menarik kedatangan serangga khususnya dari kelompok Coleoptera dan Diptera (Heath et al., 2009).

Kajian asosiasi serangga dengan jenis *Ceratocystis* telah dilakukan di Afrika Selatan dan mendapatkan adanya tiga jenis serangga yang memiliki asosiasi dengan dua jenis *Ceratocystis* (Heath et al., 2009). Temuan tersebut merupakan salah satu dasar dilakukannya kajian serupa untuk tanaman budidaya yang berbeda. Langkah awal mengkaji asosiasi serangga yang diduga menjadi vektor penyebaran *Ceratocystis* spp. dapat dimulai dari identifikasi jenis serangga yang diikuti dengan deteksi adanya jamur pada badan serangga. Ketepatan informasi jenis selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk pengendalian patogen tanaman melalui pengendalian serangga vektornya (Asghar et al., 2015).

Identifikasi jenis serangga dapat dilakukan baik secara morfologi, melalui kunci determinasi maupun secara molekuler. Identifikasi secara morfologi relatif lebih murah, namun seringkali dibatasi oleh kompleksitas variasi fenotip pada spesies kriptik, morfologi siklus hidup serangga dan kelengkapan spesimen (Ball & Armstrong, 2008; Miura et al., 2017). Pendekatan molekuler dinilai lebih efektif karena lebih akurat dan dapat diselesaikan dalam waktu yang lebih singkat (Albo et al., 2019; Ball & Armstrong, 2008).

Isolasi atau ekstraksi DNA adalah salah satu tahapan penting dalam identifikasi spesies berbasis molekuler. Meski saat ini sudah banyak berkembang metode ekstraksi DNA, namun optimasi tetap perlu dilakukan untuk spesies dan

kondisi spesimen tertentu agar mendapatkan DNA yang ideal untuk proses amplifikasi (Asghar et al., 2015; Chen et al., 2010). Pengujian beberapa metode ekstraksi untuk serangga kecil yang pernah dilakukan, mendapatkan hasil bahwa ada dua metode yang paling efektif, yaitu Chelex 1 dan CTAB (Lienhard & Schäffer, 2019).

Di sisi lain, proses isolasi DNA pada umumnya menggunakan bagian tubuh organisme sebagai sumber materi genetik yang dapat diisolasi DNA-nya. Namun pada kelompok serangga, identifikasi jenis berbasis molekuler umumnya tidak menggunakan bagian tubuh serangga atau hanya menggunakan sedikit bagian specimen serangga. Proses minimalisasi penggunaan specimen ini disebabkan karena serangga tersebut biasanya masih digunakan untuk identifikasi secara morfologi (Castalanelli et al., 2010). Berbagai penelitian mengenai metode ekstraksi DNA serangga secara non-destruktif telah dilakukan, untuk melihat kaitannya dengan variasi takson, dampak kerusakan specimen yang ditimbulkan dan umur specimen (Asghar et al., 2015; Miura et al., 2017; Phillips & Simon, 1995). Variasi modifikasi teknik ekstraksi non-destruktif yang telah dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi DNA tinggi dan kualitas baik yang telah dilakukan, antara lain dengan merendam sampel serangga dalam buffer selama waktu tertentu (Asghar et al., 2015; Castalanelli et al., 2010; Phillips & Simon, 1995). Namun demikian, metode ekstraksi DNA non-destruktif belum tentu dapat diimplementasikan pada semua kelompok serangga. Penggunaan cara non-destruktif perlu diaplikasikan jika specimen serangga yang dikoleksi jumlahnya sangat terbatas, sehingga specimen diupayakan untuk tetap utuh dan dapat disimpan sebagai bahan koleksi atau untuk bahan studi lanjutan (Miura et al., 2017).

Primer COI merupakan penanda DNA yang sering digunakan untuk identifikasi berbagai jenis hewan (Yang et al., 2018). Identifikasi jenis menggunakan primer COI

telah dilakukan pada kelompok jenis hewan tertentu, misalnya ikan (Palandacic et al., 2017) dan serangga (Pentinsaari et al., 2016). Identifikasi jenis serangga pada kelompok Coleoptera lebih banyak didominasi oleh penggunaan primer COI dibandingkan primer yang lain (Albo et al., 2019).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan modifikasi terbaik untuk metode isolasi DNA baik secara destruktif atau non-destruktif yang paling efektif, sehingga mendapatkan kualitas dan kuantitas DNA yang sesuai untuk proses amplifikasi (PCR). Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendukung identifikasi serangga jenis Coleoptera yang menjadi vektor *Ceratocystis* spp. secara cepat dan akurat melalui penanda DNA. Lebih lanjut, identifikasi jenis yang tepat akan mendukung upaya pengendalian hama dan penyakit dengan lebih optimal.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan dan tempat penelitian

Spesimen serangga dari kelompok Coleoptera dikumpulkan dari sekitar tegakan *Acacia* spp. di Kabupaten Pelalawan, Provinsi Riau, Indonesia. Spesimen serangga yang belum diketahui jenisnya sebanyak 12 ekor dipilih secara acak digunakan dalam penelitian ini. Spesimen serangga tersebut diberi nomor urut 1 hingga 12 (Tabel 1). Sampel tersebut diawetkan menggunakan etanol absolut dalam *microtube* ukuran 2 ml, sesaat setelah dikoleksi di lapangan hingga dibawa ke laboratorium untuk proses isolasi dan analisa DNA. Volume etanol dikurangi selama dalam perjalanan udara menuju Yogyakarta. Kegiatan analisis DNA dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan di Yogyakarta.

B. Isolasi DNA

DNA serangga kelompok Coleoptera diisolasi dengan menggunakan buffer 2X CTAB (Doyle & Doyle, 1987) dengan mengikuti

prosedur dari Lynne Forster (tidak dipublikasikan). Pada penelitian ini dilakukan modifikasi pada tahap inkubasi awal (inkubasi sebelum homogenisasi spesimen). Empat modifikasi perlakuan inkubasi awal yaitu terdiri dari perendaman (R), penghancuran (H), perendaman-penghancuran (RH) dan pembekuan-penghancuran (FH), masing-masing dengan tiga kali ulangan (Tabel 1). Dalam penelitian ini hanya satu perlakuan yang tidak melibatkan penghancuran badan serangga (non-destruktif) yaitu perlakuan R, sedangkan tiga perlakuan lainnya merupakan metode destruktif yaitu dengan menghancurkan seluruh spesimen serangga.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan dalam proses isolasi DNA serangga dari kelompok Coleoptera

Perlakuan inkubasi	Perendaman	Penghancuran	No urut spesimen
R	Ya	Tidak	1,2,3
H	Tidak	Ya	4,5,6
RH	Ya	Ya	7,8,9
FH	Ya	Ya	10,11,12

Keterangan: R: perendaman, H: penghancuran, RH: perendaman dan penghancuran, FH: pembekuan dan penghancuran.

Pada perlakuan H, RH dan FH, spesimen serangga diambil dari larutan etanol dan dipindahkan ke *microtube* baru ukuran 2 ml. Ekstraksi DNA menggunakan larutan CTAB sebanyak 600 µl dan 15µl Proteinase K (20mg/ml) kemudian ditambahkan ke dalam *microtube* tersebut. Spesimen dengan perlakuan perendaman R dan RH, disimpan semalam pada suhu ruang, sedangkan perlakuan FH disimpan dalam kondisi beku (suhu -20°C). Spesimen dengan perlakuan H dikeluarkan dari larutan ethanol dan dipindahkan ke dalam *microtube* berisi CTAB dan Proteinase K, sesaat sebelum dilakukan tahapan penghancuran jaringan serangga. Penghancuran jaringan dilakukan dengan menggunakan mesin *mini bead-beater* (Biospec) dengan bantuan tiga buah *steel bead* ukuran 2.3 mm yang dimasukkan pada setiap

microtube yang berisi spesimen. Proses lisis sel-serangga oleh proteinase K dipercepat dengan inkubasi pada suhu 55°C selama ± 1 jam.

Proses isolasi DNA mengikuti prosedur yang telah dikembangkan oleh Doyle dan Doyle (1987) dengan modifikasi. Pemisahan DNA dari serpihan sel dilakukan dengan menambahkan kloroform isoamil alkohol dingin dan dilanjutkan dengan proses sentrifugasi menggunakan mesin *centrifuge* 5417R (Eppendorf) dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit. Kloroform isoamil alkohol berfungsi untuk melarutkan lemak, protein dan materi lain dari dinding sel dan memisahkannya dari DNA (Greco et al., 2014). Lapisan atas yang mengandung DNA yang terbentuk dari proses pemisahan tersebut dipindahkan sebanyak 600 μ l ke dalam *microtube* baru dan dibersihkan kembali dengan 600 μ l kloroform-isoamil alkohol dingin dan sentrifugasi dengan kecepatan 14.000rpm selama 15 menit hingga diperoleh larutan atas yang jernih.

Proses presipitasi atau pengendapan DNA dilakukan dengan memindahkan larutan atas yang telah jernih hasil dari proses pemisahan DNA dengan komponen-komponen sel yang tidak diinginkan sebanyak 600 μ l pada *microtube* baru. Penambahan isopropanol dingin, diikuti dengan mencampurkan larutan (membalik *microtube* secara perlahan beberapa kali), akan mengendapkan DNA pada bagian bawah *microtube* (Doyle & Doyle, 1987) dan setelah dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 14.000rpm selama 20 menit membentuk pelet DNA. Larutan yang terpisah dari pelet DNA dibuang dan pelet DNA yang dihasilkan dicuci dengan 150 μ l etanol absolut. Pelet DNA dikeringkan dengan alat desikator, Setelah kering, pellet DNA dilarutkan dalam TE sebanyak 80 μ l dan disimpan dalam suhu -20°C sebelum digunakan dalam proses PCR.

C. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA target dilakukan melalui proses PCR dengan menggunakan dua pasang primer COI, yaitu primer

LCO1490/HCO2196 dan primer LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994). Total volume reaktan dalam proses PCR adalah sebesar 25 μ l, setiap reaktan terdiri 5 \times MyTaq Reaction Buffer (Bioline) sebanyak 5 μ l, MyTAQ Polymerase enzyme (Bioline) sebanyak 0.125 μ l, *Bovine Serum Albumin* konsentrasi 10 mg/ml sebanyak 0.2 μ g/ μ l (Thermo Fisher) sebanyak 0.5 μ l, larutan primer konsentrasi 25 μ M masing-masing sebanyak 0.4 μ l, *template* DNA yang diencerkan 10 kali sebanyak 5 μ l dan air steril ditambahkan hingga volume reaktan mencapai 25 μ l.

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin *thermocycler* GeneAmp 9700 (*Applied Biosystems*). Proses PCR diawali dengan proses pra-denaturasi selama 3 menit pada suhu 95°C dilanjutkan dengan proses amplifikasi sebanyak 35 siklus, yang terdiri dari: denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, penempelan primer pada suhu 40°C selama 1 menit dan perpanjangan DNA (*extension*) pada 72°C selama 1,5 menit. Proses amplifikasi diakhiri dengan perpanjangan (*final extension*) selama 7 menit pada suhu 72°C dengan modifikasi dari Folmer et al. (1994).

Elektroforesis hasil PCR dilakukan menggunakan gel agarose 1% (Invitrogen) dengan penambahan *Etidium Bromide* (EtBr). Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan listrik 120 Voltage selama 45 menit. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan menggunakan mesin *imaging document gel* (BIORAD) dengan perangkat lunak *Quantity One* (BIORAD).

D. Analisis Data

Hasil amplifikasi DNA pada setiap perlakuan diamati melalui munculnya pita DNA pada gel elektroforesis. Munculnya pita DNA pada gel elektroforesis membuktikan adanya amplifikasi DNA COI serangga. Data berupa muncul atau tidaknya pita DNA dari setiap sampel serangga dengan empat perlakuan yang berbeda dimasukkan dalam tabel pengamatan.

Konfirmasi amplifikasi gen COI pada setiap perlakuan sebelum ekstraksi dan ulangan

dilakukan untuk memastikan bahwa pita yang terdapat dalam gel elektroforesis merupakan DNA serangga. Konfirmasi dilakukan melalui analisis sekuensing DNA dengan mengirimkan hasil PCR ke perusahaan sequencing first (1st) Base (Singapura). Hasil urutan basa DNA kemudian dicocokkan dengan urutan DNA pada *database* Genbank menggunakan *software* BLAST.

Amplifikasi DNA target dilakukan melalui proses PCR dengan menggunakan dua pasang primer COI, yaitu primer LCO1490/HCO2196 dan primer LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994). Total volume reaktan dalam proses PCR adalah sebesar 25 μ l, setiap reaktan terdiri 5 \times MyTaq Reaction Buffer (Bioline) sebanyak 5 μ l, MyTAQ Polymerase enzyme (Bioline) sebanyak 0.125 μ l, *Bovine Serum Albumin* konsentrasi 10 mg/ml sebanyak 0.2 μ g/ μ l (Thermo Fisher) sebanyak 0.5 μ l, larutan primer konsentrasi 25 μ M masing-masing sebanyak 0.4 μ l, *template* DNA yang diencerkan 10 kali sebanyak 5 μ l dan air steril ditambahkan hingga volume reaktan mencapai 25 μ l.

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin *thermocycler* GeneAmp 9700 (*Applied Biosystems*). Proses PCR diawali dengan proses pra-denaturasi selama 3 menit pada suhu 95 $^{\circ}$ C dilanjutkan dengan proses amplifikasi sebanyak 35 siklus, yang terdiri dari: denaturasi pada suhu 95 $^{\circ}$ C selama 1 menit, penempelan primer pada suhu 40 $^{\circ}$ C selama 1 menit dan perpanjangan DNA (*extension*) pada 72 $^{\circ}$ C selama 1,5 menit. Proses amplifikasi diakhiri dengan perpanjangan (*final extension*) selama 7 menit pada suhu 72 $^{\circ}$ C dengan modifikasi dari Folmer et al. (1994).

Elektroforesis hasil PCR dilakukan menggunakan gel agarose 1% (Invitrogen) dengan penambahan *Etidium Bromide* (EtBr). Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan listrik 120 Voltage selama 45 menit. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan menggunakan mesin *imaging document gel* (BIORAD) dengan perangkat lunak *Quantity One* (BIORAD).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Amplifikasi DNA COI serangga

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara umum DNA serangga berhasil diperoleh dalam proses isolasi DNA dan telah dipastikan dengan adanya hasil amplifikasi DNA menggunakan primer COI (Gambar 1). Pada kegiatan sebelumnya, upaya ekstraksi DNA serangga telah dilakukan menggunakan metode SDS maupun CTAB, namun tidak berhasil mendapatkan DNA serangga (data tidak ditampilkan). Pada penelitian ini ekstraksi DNA dilakukan dengan metode CTAB dengan penambahan proteinase K. Keberhasilan isolasi DNA serangga dalam penelitian ini sangat mungkin dipengaruhi oleh adanya penambahan proteinase K. Enzim ini selain berfungsi untuk merusak protein sel pada proses lisis (Qamar et al., 2017) juga berfungsi sebagai inhibitor enzim nuklease saat ekstraksi sehingga degradasi DNA bisa diminimalisir (Cabral et al., 2000; Halos et al., 2004).

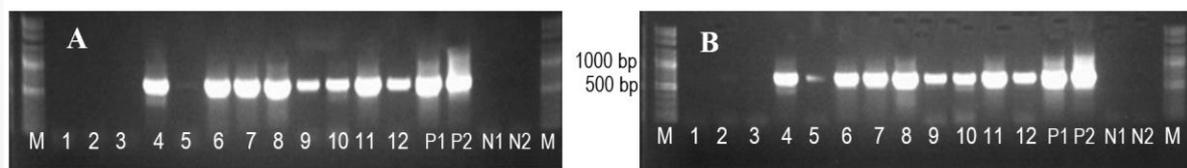
Empat perlakuan (R, H, RH dan FH) yang digunakan pada penelitian ini memberikan hasil yang berbeda. Pada isolasi DNA serangga dengan perlakuan R (perendaman spesimen selama satu malam, tanpa dihancurkan), DNA tidak berhasil diperoleh dari tiga spesimen yang digunakan. Pada perlakuan yang lain (H, RH dan FH), DNA berhasil diisolasi dari tiga sampel yang digunakan, kecuali pada perlakuan H (penghancuran jaringan serangga, tanpa melalui proses inkubasi pada larutan CTAB). Pada perlakuan H, satu spesimen (no 5) tidak menghasilkan amplicon DNA COI pada penggunaan primer LCO1490/HCO2196 (Gambar 1.A), namun spesimen ini menghasilkan amplicon DNA COI pada penggunaan primer LCO1490/HCO2198 meskipun pita DNA yang ditunjukkan lebih tipis dibandingkan dengan spesimen yang lain (Gambar 1B).

DNA yang dihasilkan dari proses isolasi non-destruktif (R) pada penelitian ini tidak dapat diamplifikasi oleh primer COI. Hal ini karena

dalam proses perendaman sampel dalam buffer tidak menyebabkan terjadinya lisis DNA tanpa didahului upaya destruktif sampel. Secara teori, lisis DNA serangga sebenarnya dapat melalui mulut, spirakel anus, kutikula di antara sklerit, kelenjar ektodermal dan setae (Gilbert et al., 2007). Namun demikian, hasil isolasi DNA dengan metode non-destruktif pada penelitian ini tidak sesuai dengan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya yang berhasil mendapatkan DNA tanpa proses penghancuran spesimen, misalnya isolasi DNA dari awetan serangga yang disimpan di museum (Gilbert et al., 2007). Awetan serangga yang disimpan di museum umumnya memiliki pelukaan jaringan akibat penggunaan jarum untuk menempelkan serangga pada kotak penyimpanan. Pelukaan jaringan pada proses penyimpanan spesimen serangga tersebut dapat menyebabkan *buffer* lisis menjangkau bagian dalam tubuh serangga sehingga lisis sel dapat terjadi (Gilbert et al., 2007). Beberapa penelitian lain melaporkan bahwa keberhasilan dalam isolasi DNA menggunakan metode non-destruktif pada serangga, masih melibatkan proses perusakan fisik pada spesimen serangga misalnya dengan membuat sayatan pada bagian perut serangga sehingga larutan lisis dapat masuk ke dalam

tubuh serangga (Favret, 2005) dan penggunaan larutan lisis yang bersifat korosif (Castalanelli et al., 2010). Pada proses perendaman spesimen di dalam larutan lisis terjadi perubahan fisik pada spesimen serangga yang bertubuh lunak, misalnya *Encarsia formosa* (Miura et al., 2017). Pada penelitian ini, DNA tidak berhasil diisolasi karena tidak ada proses pelukaan pada tubuh serangga sehingga *buffer* sulit menjangkau ke bagian dalam sel. Kesulitan proses lisis tersebut disebabkan oleh anatomi sel serangga didominasi oleh kitin yang memiliki struktur padat dan sulit larut dalam cairan (Liu et al., 2012).

Keberhasilan isolasi DNA menggunakan metode non-destruktif masih menarik untuk dilakukan terutama jika jumlah spesimen yang dikoleksi terbatas dan masih diperlukan untuk keperluan studi taksonomi lebih lanjut maupun pada jenis-jenis serangga langka. Pada studi asosiasi serangga dengan jamur patogen *Ceratocystis*, memungkinkan adanya sampel yang ditemukan dalam jumlah sangat terbatas sehingga keberhasilan metode non-destruktif akan memberikan peluang untuk koleksi spesimen serangga bagi keperluan studi lebih lanjut.



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen COI 12 sampel serangga kelompok *Coleoptera* menggunakan primer LCO1490/HCO2196 (A); primer LCO1490/HCO2198 (B), dengan perlakuan R (1-3), H (4-6), RH (7-9), FH (10-12), dibandingkan dengan kontrol positif DNA serangga *Prostomis atkinsoni* yang disediakan oleh Lynne Forster (P1,P2) dan kontrol negatif (N1,-N20). M adalah DNA ladder 100bp

Keberhasilan isolasi DNA dalam penelitian ini diperoleh melalui metode destruktif yaitu dengan menghancurkan seluruh spesimen serangga dan melarutkannya dalam larutan lisis sel. Proses penghancuran tersebut menghasilkan DNA yang sesuai untuk proses amplifikasi menggunakan mesin PCR (Gambar 1; Tabel 2). Keberhasilan amplifikasi

menggunakan isolasi DNA secara destruktif serupa dengan hasil penelitian sebelumnya pada kelompok kutu Arachnida. Proses ekstraksi DNA terbaik pada kelompok Arachnida menggunakan kombinasi antara penghancuran mekanis dan enzimatis pada proses lisis dengan memutus rantai polimer kitin (Halos et al., 2004). Amplikon DNA COI serangga yang

diperoleh pada penelitian ini diuji lebih lanjut melalui proses sekuensing ampikon DNA yang dihasilkan tersebut.

Tabel 2. Keberhasilan amplifikasi gen COI pada beberapa perlakuan inkubasi awal yang berbeda pada proses isolasi DNA.

Perlakuan inkubasi	Jumlah amplifikasi DNA pada 3 ulangan	
	LCO1490/HCO2196	LCO1490/HCO2198
R	0/3	0/3
H	2/3	3/3
RH	3/3	3/3
FH	3/3	3/3

Hasil penelitian ini (Tabel 2), menunjukkan bahwa metode isolasi DNA secara destruktif tanpa melalui perendaman spesimen memiliki tingkat keberhasilan yang lebih rendah dibandingkan dengan teknik desktruktif yang melibatkan proses perendaman dalam *buffer* CTAB pada suhu ruang maupun pada suhu dingin / beku (-20°C). Hal ini dapat disebabkan karena proses lisis DNA oleh *buffer* lisis tidak bekerja secara maksimal pada waktu yang sangat terbatas. Jumlah sel yang berhasil dilisis akan berpengaruh pada jumlah DNA yang didapatkan (Rohland & Hofreiter, 2007). Selain lama waktu proses lisis, kondisi spesimen serangga juga memberikan pengaruh dalam peningkatan keberhasilan proses isolasi DNA.

Semakin halus material spesimen serangga, maka luas permukaan semakin besar, sehingga semakin banyak permukaan sel yang bersentuhan dengan *buffer* lisis maka peluang pelepasan DNA menjadi semakin tinggi (Rohland & Hofreiter, 2007).

Penggunaan primer COI, terutama pasangan primer LCO1490 dan HCO2198 yang merupakan primer COI universal pada hewan telah digunakan pada berbagai jenis hewan (Albo et al., 2019; Ball & Armstrong, 2008; Lobo et al., 2013). Dalam penelitian ini pasangan primer yang berbeda menunjukkan tingkat keberhasilan yang berbeda. Penggunaan primer LCO1490/HCO2198 berhasil mendapatkan ampikon DNA pada semua spesimen dengan perlakuan H, RH dan FH. Pada penggunaan primer LCO1490/HCO2196 ada satu spesimen dengan perlakuan H yang tidak berhasil mendapatkan ampikon DNA COI (Tabel 2).

B. Sekuensing DNA COI serangga

Ampikon DNA dari 9 spesimen (4-12) yang dihasilkan dari proses amplifikasi menggunakan primer LCO1490/ HCO2198 digunakan dalam proses sekuensing untuk memastikan jenisnya. Hasil sekuensing DNA yang berukuran sekitar 680 bp (Gambar 2) dihasilkan oleh 8 spesimen dari 9 spesimen yang diuji (Tabel 3).

Tabel 3. Identifikasi serangga berdasarkan kesesuaian urutan DNA pada gen COI yang diisolasi menggunakan perlakuan destruktif dengan *database* Genbank menggunakan aplikasi BLAST *online*.

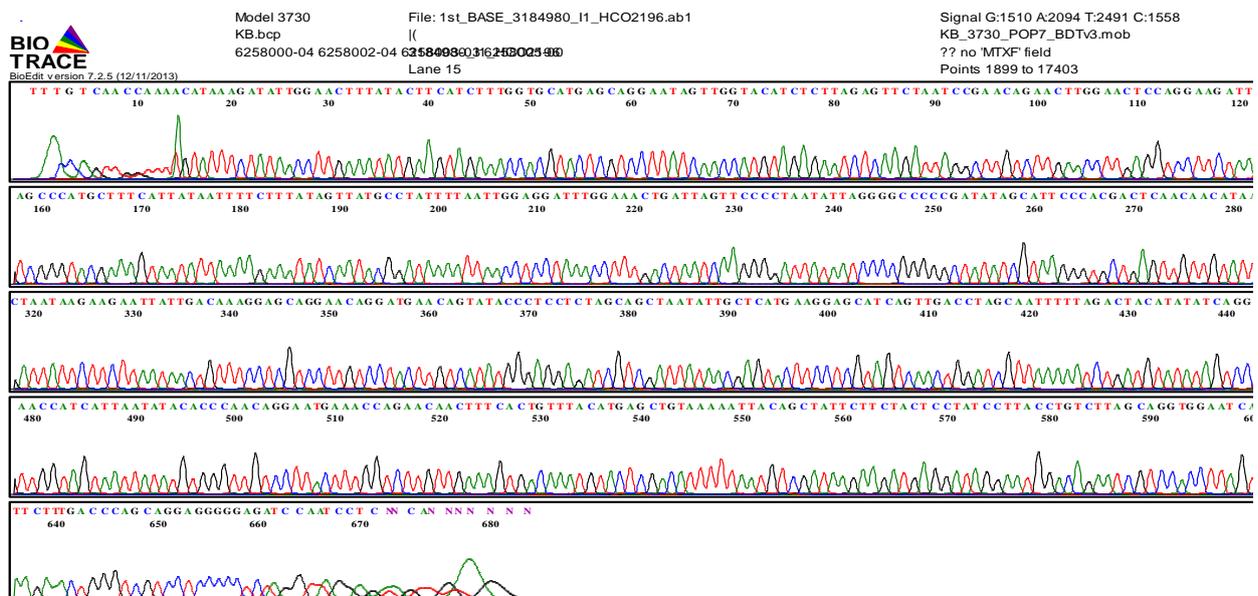
Perlakuan	No spesimen	Kesesuaian dengan <i>database</i> Genbank
H	4	99% sesuai dengan <i>Xylosandrus compactus</i>
	5	Tidak tersedia
	6	98-100% sesuai dengan beberapa <i>Euwallacea fornicatus</i>
RH	7	99% sesuai dengan beberapa spesimen <i>Euwallacea fornicatus</i>
	8	Seperti spesimen no 7
	9	Seperti spesimen no 7
FH	10	99% sesuai dengan <i>Tribolium castaneum</i>
	11	99% sesuai dengan <i>Euwallacea simili</i>
	12	99% sesuai dengan <i>Rhyzopertha dominica</i>

Hasil pencocokkan sekuens DNA spesimen yang diuji menunjukkan bahwa terdapat empat jenis serangga yang teridentifikasi dari ordo Coleoptera yang dikoleksi di sekitar tanaman *Acacia* spp di Pelalawan Riau. Jenis tersebut adalah *Euwallaceae fornicatus*, *Xylosandrus compactus*, *Rhyzopertha dominica* dan *Tribolium castaneum*. Hal ini membuktikan bahwa metode isolasi DNA dalam penelitian ini efektif untuk digunakan dalam kegiatan analisis DNA serangga Coleoptera.

Jenis serangga yang teridentifikasi dalam penelitian ini merupakan spesies yang memiliki habitat di hutan alam, hutan tanaman maupun lahan pertanian (Edde, 2012; Li et al., 2016; Setiawan et al., 2018; Tarno et al., 2016). Penelitian yang lain menunjukkan bahwa dua

dari empat jenis tersebut (*X. compactus* dan *E fornicatus*) diketahui memiliki asosiasi dengan jamur patogen dan berpotensi merusak tanaman (Li et al., 2016; Setiawan et al., 2018; Tarno et al., 2016).

Serangga *X. compactus* merupakan serangga hama pada berbagai spesies tanaman inang *Acacia* sp dengan cara merusak percabangan tanaman (Hara & Beardsley, 1979; Nair, 2000). Adapun spesies serangga hama lainnya adalah *E. fornicatus*, yang merusak tanaman kayu melalui kemampuannya dalam menginokulasi simbion jamur patogen ke dalam jaringan tanaman (Li et al., 2016). Serangga *R. dominica* tidak dilaporkan sebagai hama dan memiliki asosiasi dengan fungi (Edde, 2012).



Gambar 2. Hasil sekuensing DNA dari spesimen serangga nomor 1 yang diamati menggunakan software Bioedit

IV. KESIMPULAN

Metode non-destruktif yang digunakan pada penelitian ini belum mampu menghasilkan DNA yang sesuai untuk pengujian DNA pada kegiatan identifikasi serangga menggunakan penanda DNA. Metode isolasi DNA secara destruktif serangga dan jamur *Ceratocystis*. Hasil penelitian ini akan bermanfaat bagi upaya identifikasi jenis serangga berbasis molekuler,

yang dikombinasikan dengan perlakuan perendaman dan pembekuan merupakan metode yang efektif, dengan hasil amplifikasi dan sekuens DNA yang mudah dibaca. Metode isolasi DNA *Coleoptera* pada penelitian ini dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya misalnya untuk melihat asosiasi spesies terutama serangga yang menjadi hama pada tanaman kehutanan. Identifikasi jenis hama yang lebih cepat dilakukan akan berdampak pada

kecepatan pengendalian hama sehingga akan mengurangi dampak kerugian secara ekonomi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari proyek ACIAR FST/214/068 *Management strategies for Acacia plantation diseases in Indonesia and Vietnam*. Spesimen serangga yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil koleksi dari Dr. Wagner Morais. Adapun DNA serangga *Prostomis atkinsoni* yang digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini disediakan oleh Lynne Forster. Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan berbagai bentuk bantuan dan dukungan dalam kegiatan penelitian ini. Semua penulis memiliki kontribusi yang seimbang pada penyusunan naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Albo, J. E., Marelli, J. P., & Puig, A. S. (2019). Rapid molecular identification of Scolytinae (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235944>
- Asghar, U., Malik, M. F., Anwar, F., Javed, A., & Raza, A. (2015). DNA Extraction from insects by using different techniques: A review. *Advances in Entomology*, 03(04), 132–138. <https://doi.org/10.4236/ae.2015.34016>
- Ball, S. L., & Armstrong, K. F. (2008). Rapid, one-step DNA extraction for insect pest identification by using DNA barcodes. *Journal of Economic Entomology*, 101(2), 523–532. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2008\)101\[523:RODEFI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[523:RODEFI]2.0.CO;2)
- Cabral, H., Ruiz, M. T., Carareto, C. M. A., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2000). A plant proteinase, extracted from *Bromelia fastuosa*, as an alternative to proteinase K for DNA extraction. *Drosophila Information Service*, 83, 178–185.
- Castalanelli, M. A., Severtson, D. L., Brumley, C. J., Szito, A., Footitt, R. G., Grimm, M., Munyard, K., & Groth, D. M. (2010). A rapid non-destructive DNA extraction method for insects and other arthropods. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(3), 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.04.003>
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S. Y., Wang, H., & Siegfried, B. D. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11–15.
- Edde, P. A. (2012). A review of the biology and control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the lesser grain borer. *Journal of Stored Products Research*, 48, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.08.007>
- Favret, C. (2005). A new non-destructive DNA extraction and specimen clearing technique for aphids (Hemiptera). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 107(2), 469–470.
- 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. <https://doi.org/10.1071/ZO9660275>
- Gilbert, M. T. P., Moore, W., Melchior, L., & Worebey, M. (2007). DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS ONE*, 2(3), 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000272>
- Greco, M., Sáez, C. A., Brown, M. T., & Bitonti, M. B. (2014). A simple and effective method for high quality co-extraction of genomic DNA and total RNA from low biomass *Ectocarpus siliculosus*, the model brown alga. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096470>
- Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Menach, A. L., Boulouis, H. J., & Vayssier-Taussat, M. (2004). Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Veterinary Research*, 35(6), 709–713. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Hara, A. H., & Beardsley, J. W. J. (1979). The biology of the black twig borer, *Xylosandrus compactus* (Eichhoff), in Hawaii. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, XIII(1), 55–70.
- Heath, R. N., Wingfield, M. J., Van Wyk, M., & Roux, J. (2009). Insect associates of *Ceratocystis albifundus* and patterns of association in a native savanna ecosystem in South Africa. *Environmental Entomology*, 38(2), 356–364. <https://doi.org/10.1603/022.038.0207>

- Li, Y., Gu, X., Kasson, M. T., Bateman, C. C., Guo, J., Huang, Y., Li, Q., Rabaglia, R. J., & Hulcr, J. (2016). Distribution, host records, and symbiotic fungi of *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in China. *Florida Entomologist*, 99(4), 801–804. <https://doi.org/10.1653/024.099.0441>
- Lienhard, A., & Schäffer, S. (2019). Extracting the invisible: Obtaining high quality DNA is a challenging task in small arthropods. *PeerJ*, 2019(4). <https://doi.org/10.7717/peerj.6753>
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C., & Yang, Q. (2012). Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules*, 17(4), 4604–4611. <https://doi.org/10.3390/molecules17044604>
- Lobo, J., Costa, P. M., Teixeira, M. A. L., Ferreira, M. S. G., Costa, M. H., & Costa, F. O. (2013). Enhanced primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans. *BMC Ecology*, 13, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-13-34>
- Miura, K., Higashiura, Y., & Maeto, K. (2017). Evaluation of easy, non-destructive methods of DNA extraction from minute insects. *Applied Entomology and Zoology*, 52(2), 349–352. <https://doi.org/10.1007/s13355-017-0481-4>
- Nair, K. S. S. (2000). Insect pests and diseases in Indonesian forest: an assessment of the major threats, research efforts and literature. In K. S. S. Nair (Ed.), *Insect pests and diseases in Indonesian forest: an assessment of the major threats, research efforts and literature*. <https://doi.org/10.17528/cifor/000700>
- Palandačić, A., Naseka, A., Ramler, D., & Ahnelt, H. (2017). Contrasting morphology with molecular data: an approach to revision of species complexes based on the example of European *Phoxinus* (Cyprinidae). *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1032-x>
- Pentinsaari, M., Salmela, H., Mutanen, M., & Roslin, T. (2016). Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. *Scientific Reports*, 6(March), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35275>
- Phillips, A. J., & Simon, C. (1995). Simple, efficient, and nondestructive DNA extraction protocol for arthropods. *Annals of the Entomological Society of America*, 88(3), 281–283. <https://doi.org/10.1093/aesa/88.3.281>
- Qamar, W., Khan, M. R., & Arafah, A. (2017). Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), 1465–1469. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.016>
- Rahayu, S., Nurjanto, H. H., & Pratama, R. G. (2015). Karakter jamur *Ceratocystis* sp. penyebab penyakit busuk batang pada *Acacia decurrens* dan status penyakitnya di Taman Nasional Gunung Merapi. *Jurnal Ilmu Kehutanan*, 9(2), 94–104.
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*, 42(3), 343–352. <https://doi.org/10.2144/000112383>
- Roux, J., Van Wyk, M., Hatting, H., & Wingfield, M. J. (2004). *Ceratocystis* species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. *Plant Pathology*, 53(4), 414–421. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2004.01014.x>
- Roux, J., & Wingfield, M. J. (2009). *Ceratocystis* species: Emerging pathogens of non-native plantation *Eucalyptus* and *Acacia* species. *Southern Forests*, 71(2), 115–120. <https://doi.org/10.2989/SF.2009.71.2.5.820>
- Setiawan, Y., Rachmawati, R., & Tarno, H. (2018). Diversity of ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae) on teak forest in Malang District, East Java, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 19(5), 1791–1797. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d190528>
- Tarigan, M., Roux, J., Wyk, M. Van, Tjahjono, B., & Wingfield, M. J. (2011). A new wilt and die-back disease of *Acacia mangium* associated with a new wilt and die-back disease of *Acacia mangium* associated with *Ceratocystis manginecans* and *C. acaciivora* sp. nov. in Indonesia. *South African Journal of Botany*, 77, 292–304. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.08.006>
- Tarno, H., Septia, E. D., & Aini, L. Q. (2016). Microbial community associated with ambrosia beetle, *Euplatypus parallelus* on sonokembang, *Pterocarpus indicus* in Malang. *Agrivita*, 38(3), 312–320. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v38i3.628>
- Yang, F., Ding, F., Chen, H., He, M., Zhu, S., Ma, X., Jiang, L., & Li, H. (2018). DNA barcoding for the identification and authentication of animal species in traditional medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5160254>