

Karakteristik Fragmen Gen Penyandi Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) Hama Kepik Penghisap Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Characteristics of The Gene Encoding Cytochrome C Oxidase Subunit (COI) of Cocoa Fruit Sucking Pest (*Theobroma cacao* L.)

Muzuni

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Halu Oleo
email: muzuni71@yahoo.co.id

Abstract: The purpose of this research is to know the character of partial sequences of the COI gene form fruit-sucking pest. The gene fragments were isolated using PCR (Polymerase Chain Reaction) techniques with specific primers, HlpF and HlpR. Character of gene fragments observed were fragment size, nucleotide sequence, similarity, restriction map, and hydrophobicity. The size of the fragment was determined by electrophoresis of PCR products, similarity values were determined by aligning the nucleotide sequence of the PCR product with the nucleotides present in GenBank, the restriction map determined by the RestrictionMapper program, and the hydrophobicity profile determined by the BioEdit program. The results showed that PCR yield fragment size 552 pb. The results of alignment analysis showed that PCR fragment had similarity of 88% with *Helopeltis theivora*, 87% with *Helopeltis antonii*, 87% with *Helopeltis bradyi* and 84% with *Pacipeltis maesarum*. Based on the results of the analysis using RestrictionMapper program shows partial sequences of the COI gene form fruit-sucking pest has 25 sites of restriction enzyme cutting which is class of type II endonuclease enzyme. The results of the hydrophobicity analysis using the BioEdit program indicate that the COI protein is hydrophilic and hydrophobic which shows the integrated COI protein on the membrane.

Keywords: COI gene fragment, fruit-sucking pest, PCR, Cocoa Crop

1. Pendahuluan

Kakao merupakan salah satu komoditas andalan perkebunan yang mempunyai peranan penting dalam perekonomian nasional. Komoditas ini memiliki prospek yang cerah di masa mendatang, karena sebagai salah satu sumber devisa negara dari sektor non migas, sehingga perlu percepatan pengembangannya. Salah satu tantangan yang dihadapi perkebunan Indonesia, antara lain masih terbatasnya bahan tanam unggul yang bebas dari hama dan penyakit, demikian pula kebun-kebun benih di daerah sentra pengembangan kakao masih kurang tersedia. Dalam rangka mendukung program revitalisasi perkebunan kakao, benih merupakan salah satu sarana penting, karena sangat menentukan produktivitas tanaman dan mutu hasil. Kebutuhan benih dalam program revitalisasi perkebunan untuk 54.000 ha program peremajaan, 36.000 ha rehabilitasi dan 110.000 Ha perluasan areal tanaman adalah mencapai jumlah 168 juta benih (Ditjen Perkebunan, 2010). Kebutuhan bahan tanam yang sangat besar ini memerlukan benih dan entries yang sehat, yang bebas dari hama dan penyakit tanaman. Penggunaan bahan tanam yang terbawa hama dan penyakit tertular benih (*seedborn diseases*) akan mengakibatkan kerugian jangka panjang yang sangat besar (Baharudin *et al*, 2012). Salah satu hama utama tanaman kakao yang sudah meresahkan petani adalah kepik penghisap buah (*Helopeltis* spp.).

Akibat serangan hama tersebut menyebabkan kerugian yang sangat signifikan pada sentra-sentra produksi kakao. Di Sulawesi Tenggara, serangan kepik penghisap buah telah memberikan kerugian hingga mencapai 50-80%. Serangan berat kepik penghisap buah pada pertanaman kakao di Malaysia dapat menurunkan hasil lebih dari 50% (Wood dan Chung, 1989). Di Papua New Guinea, serangan kepik penghisap buah jenis *Helopeltis clavifer* juga dapat merusak dan mengakibatkan kehilangan hasil mencapai 80%. Oleh karena itu, serangan hama tersebut dapat memberikan ancaman besar bagi peningkatan produksi kakao di Indonesia.

Penanggulangan dini dampak hama kepik penghisap buah dalam menekan kerugian jangka panjang merupakan tindakan utama yang harus dilakukan. Salah satu strategi penanggulangan dini dampak hamatersebut adalah dengan menggunakan perangkat deteksi yang spesifik dan sensitif dalam mendeteksi hama yang terbawa pada bahan tanam (*seedborn pest*). Perkembangan teknik molekuler yang sedemikian pesat pada tiga dasawarsa terakhir memberikan peluang besar dalam pengembangan perangkat deteksi yang spesifik dan sensitif serta dapat dilakukan dalam waktu yang relatif singkat. Metode deteksi yang dapat dikembangkan adalah metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang mendeteksi fragmen DNA spesifik. Metode ini dapat diaplikasikan untuk mendeteksi hama kepik penghisap buah secara dini pada bahan tanam. Sebelum metode deteksi dini secara molekuler diaplikasikan, terlebih dahulu dilakukan desain primer spesifik untuk mengamplifikasi fragmen DNA spesifik hama kepik penghisap buah serta mengkarakterisasi fragmen tersebut dengan pendekatan bioinformatika. Primer yang dapat digunakan adalah *primer* spesifik gen *cytochrome oxidase* sub unit I(COI) yang dikode oleh mtDNA. Gen COI memiliki banyak kelebihan antara lain sekuen gen COI sedikit sekali mengalami delesi dan insersi, serta banyak bagian yang bersifat *conserve* (lestari) sehingga dapat digunakan sebagai DNA *barcoding*, yaitu penciri setiap spesies (Hebert *et al.*, 2003). Deteksi dini dapat diaplikasikan setelah amplifikasi fragmen tersebut dipastikan spesifik untuk hama tersebut.

2. Metode Penelitian

Penggunaan penuntun praktikum inkuiri terbimbing diharapkan siswa belajar secara aktif dibantu alat, bahan serta pertanyaan bimbingan dari guru, agar siswa dapat menemukan jawaban terhadap masalah melalui proses penyelidikan (Nurhayati, 2016). Observasi awal di SMAN 1 Bone, menunjukkan bahwa penuntun praktikum yang digunakan dalam melakukan kegiatan praktikum biologi masih memiliki kelemahan. Penuntun praktikum hanya berupa lembaran-lembaran tiap judul praktikum yang dibuat oleh guru, namun pada umumnya menggunakan buku paket. Selain itu penuntun praktikum hanya berupa teks acuan yang menjelaskan setiap tahapan dalam melakukan praktikum tanpa ada hal atau bagian yang lebih menarik misalnya gambar dan warna lembaran penuntun yang tidak menarik. Pemanfaatan berbagai bahan ajar selain buku paket dapat membuat pembelajaran menjadi lebih menarik (Prastowo, 2013).

3. Fokus Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah hama kepik penghisap buah kakao (*Helopeltis* sp.). Penelitian dilakukan dengan mengidentifikasi secara molekuler hama kepik penghisap buah yang meliputi desain *primer*, isolasi DNA, uji kualitas dan kuantitas DNA, reaksi amplifikasi, elektroforesis, pengurutan DNA dan analisis urutan DNA (Muzuni *et al.*, 2010).

- **Desain *primer***

Mengumpulkan sekuen gen COI dari beberapa spesies terdekat yang diperoleh dari bank data gen (*Genbank*) pada situs <http://www.ncbi.nlm.gov> dan disejajarkan menggunakan program BioEdit, kemudian menentukan daerah yang mempunyai homologi tinggi. Daerah homolog tersebut dapat digunakan sebagai *primer* spesifik dalam PCR.

- **Isolasi DNA Genom Hama Kepik Penghisap Buah**

Isolasi DNA genom hama kepik penghisap buah dilakukan dengan metode CTAB (*cetyl trimetyl ammoniumbromide*) (Sambrook *et al.*, 1989). Sebelum dilakukan

ekstraksi, terlebih dahulu *buffer* lisis disiapkan sesuai jumlah sampel yang akan diekstraksi.

Sebanyak 0,1-0,2 gr kepik penghisap buah diletakkan di dalam mortar lalu ditambahkan secukupnya pasir kuarsa kemudian digerus hingga menjadi halus. Sampel dimasukkan kedalam tabung *epENDORF* 1,5 ml yang telah berisi larutan *buffer* lisis sebanyak 600 µl.

Tabung yang telah berisi *buffer* dan sampel kemudian dibolak-balik secara perlahan hingga tercampur merata, kemudian diinkubasi di dalam *waterbath* pada suhu 65°C selama 30 menit dan tabung dibolak-balik setiap 5 menit sekali. Setelah 30 menit tabung dikeluarkan dan didiamkan pada kotak es selama 5 menit, kemudian tabung disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 8°C. Supernatan dipindahkan kedalam tabung *epENDORF* baru yang steril ukuran 1,5 ml, kemudian tabung ditambahkan 1x volume PCI (*phenol-chloroform-isoamyl alcohol*), lalu dibolak-balik perlahan sampai campuran merata dan terbentuk emulsi.

Tabung kemudian disentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dipindahkan kedalam tabung *epENDORF* baru yang steril ukuran 1,5 ml, lalu ditambahkan 0,1x volume sodium asetat (NaOAc) 3 M pH 5,2 dan ditambah dengan 2x volume etanol absolut dingin. Tabung dibolak-balik perlahan dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 1 jam. Tabung kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C.

Pelet yang terbentuk dicuci dengan 0,5 ml etanol 70%. Etanol 70% kemudian dibuang secara perlahan dan tabung yang berisi pelet (mengandung DNA genom) kemudian dikeringkan. Setelah kering, tabung berisi pelet kemudian ditambahkan dH₂O 20-50 µl. Untuk menghilangkan RNA, larutan ditambahkan 100 µg/µl RNAase, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 12 jam. Hasil isolasi DNA genom selanjutnya disimpan pada suhu -20°C.

• Uji Kualitas dan Kuantitas DNA

Untuk memastikan apakah DNA yang digunakan pada proses PCR berkualitas baik, dapat diuji dengan elektroforesis dan spektrofotometer.

Kualitas DNA ditetapkan berdasarkan nilai rasio A_{260}/A_{280} sekitar 1,8 - 2,0. Kuantitas DNA ditetapkan berdasarkan asumsi bahwa 1 DO = 50 µg/ml DNA utas ganda dengan rumus:

$$[DNA] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times FP$$

Keterangan :

[DNA] = Konsentrasi DNA

A_{260} = Absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

50 µg/m = Konstanta untuk DNA

FP = Faktor pengenceran

• Polymerase Chain Reaction (PCR) dan elektroforesis

Reaksi PCR menggunakan *PCR kit Go Taq Green Master Mix 2x*. Komposisi reaksi PCR adalah 2 µl DNA *template* (100 ng), 0,5 µl *primer forward* (0,5 µM), 0,5 µl *primer reverse* (0,5 µM), 5 µl *Taq Green Master Mix 2x* dan 2 µl dH₂O. Reagen PCR tersebut kemudian disatukan kedalam tabung PCR kemudian divortex dan *dispindown*, lalu dimasukkan kedalam mesin PCR. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan kondisi sebagai berikut: *Pre-PCR*, selama 5 menit pada suhu 94°C; *Denaturasi*, selama 1,5 menit pada suhu 94°C; *Annealing*, selama 1 menit pada suhu

55°C; dan *Extension*, selama 1,5 menit pada suhu 72°C; serta *Post- PCR*, selama 5 menit pada suhu 72°C.

Reaksi amplifikasi ini membutuhkan waktu selama $\pm 2,20$ jam. Hasil amplifikasi selanjutnya dielektroforesis dengan agarose 1% (0,3 g agarosa dan 30 ml TAE 1x dan juga ditambahkan 7,5 μ l EtBr) pada voltase konstan 100 volt dan 80 A selama 30 menit lalu divisualisasikan di atas *ultra violettransilluminator* kemudian dilakukan pemotretan dengan *photoforesis*.

- **Pengurutan DNA**

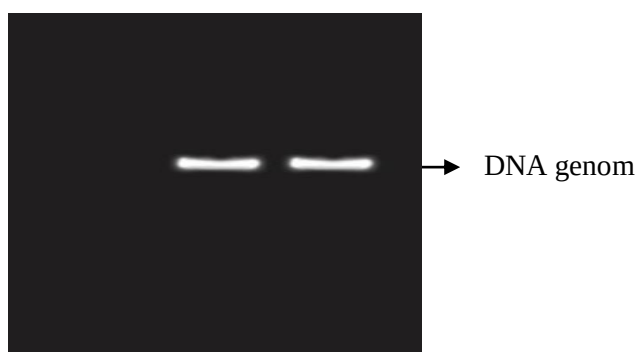
Pengurutan DNA hasil amplifikasi menggunakan alat DNA *sequencer ABI Prism 310*. Analisis dilakukan dengan menggunakan 1 sampel dengan kombinasi *primerforward* dan *primerreverse*. Pengurutan dilakukan dengan metode Sanger, menggunakan *terminator dye* berupa *fluorescent dye rhodamin (PRISM reaction dyedoaxy terminator cycle sequencing kit)*. Setelah mendapatkan hasil pengurutan, urutan kemudian disejajarkan dengan menggunakan program NCBI BLAST.

- **Analisis Data**

Identifikasi urutan nukleotida dilakukan dengan beberapa analisis. Analisis kesejajaran lokal (*local alignment*) hasil pengurutan DNA dengan data yang ada di *GeneBank* dilakukan dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) yang disediakan NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Selanjutnya, urutan nukleotida hasil isolasi dikelompokkan dengan menggunakan pohon filogenetik dengan program *CLCsequen*. Analisis hidrofobisitas menggunakan program BioEdit. Analisis situs retriksi menggunakan program *NEBcutter 2.0* (Muzuni *et al.*, 2010) dan *RestrictionMapper*. Analisis asam amino menggunakan program *Expasi*. Akhirnya organisme yang dianalisis dapat ditentukan spesiesnya.

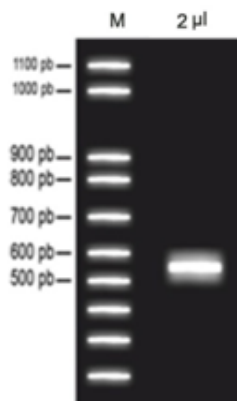
4. Hasil Penelitian

Isolasi DNA genom dari individu utuh kepik penghisap buah merupakan tahap awal dari identifikasi gen *cytochrome coxidase* sub unit I (COI). Hasil isolasi DNA genom menunjukkan perbandingan A_{260}/A_{280} mencapai 1,85. Konsentrasi DNA hasil isolasi mencapai 1590 μ g/ml. Hasil elektroforesis DNA genom ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA genom Kepik penghisap buah

Hasil isolasi DNA genom digunakan sebagai cetakan dalam PCR dengan primer spesifik hama kepik penghisap buah. Hasil PCR menunjukkan pita berukuran sekitar 550 pb (Gambar 2). Selanjutnya, hasil PCR diurutkan nukleotidanya dan memberikan hasil seperti ditunjukkan pada Gambar 3. Berdasarkan hasil pengurutan DNA, fragmen DNA hasil PCR berukuran 552 pb.



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk PCR dengan *primerHlpF* dan *primerHlpR* pada gel agarosa 1% M: marker.

```

GAACTTGGAACCTACAGGACCATTATCGGGGATGATCAAACATACAACGTAATCGTTACCTCTCAC
GCATTCATTATAATCTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATCGGAGGATTTGGTAATTGATTAGTA
CCATTAATAATCGGAGCCCCGTGATATAGCATTTCCACGAATAAACAATATAAGATTTTGACTATTA
CCCCCATCTTTAATACTTCTTACCACTAGTATATTTGTAGAAAGAGGTGCTGGTACAGGATGAACT
GTATACCTCCACTATCAGCCAATATTAGACACTCAGGGGCATCCGTAGATTTAGTAATTTTCTCT
TTACACATAGCAGGTATTTTCTCAATCTTAGGAGCAATTAACTTTATTTCAACAATCATTAAATATA
CGGCCAAAAGGTATATTAATAGAAATAATACCTTTATTTGTATGATCAGTATTAATCACTGCAATT
CTTTTACTTTTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGCAATTACCATGCTACTAACTGATCGAAATTTT
AATACATCATCTTCGACCCATCA

```

Gambar 3. Sekuen fragmen gen COI Kepik penghisap buah hasil pengurutan DNA

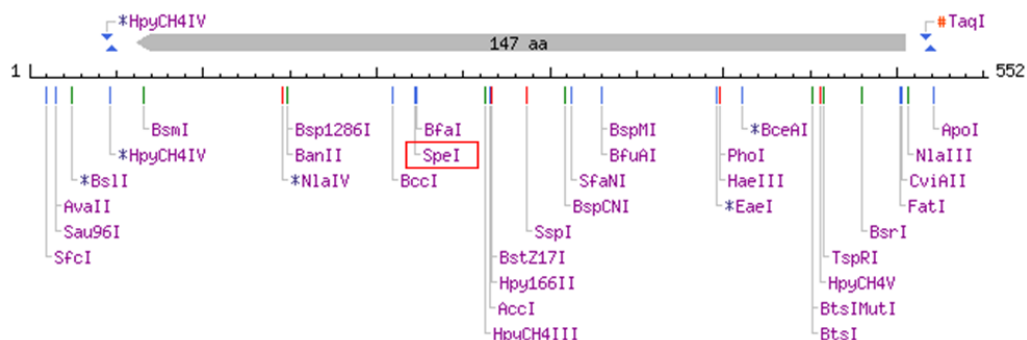
Berdasarkan analisis BLASTN sekuen gen parsial COI kepik penghisap buah memiliki kemiripan 88% dengan sekuen gen parsial COI *Helopeltis theivora*, 87% dengan *Helopeltis antonii*, 87% dengan *Helopeltis bradyi*, dan 84% dengan *Pachypeltis maesarum* (Tabel 1).

Tabel 1. Similaritas level nukleotida sekuen DNA ampikon

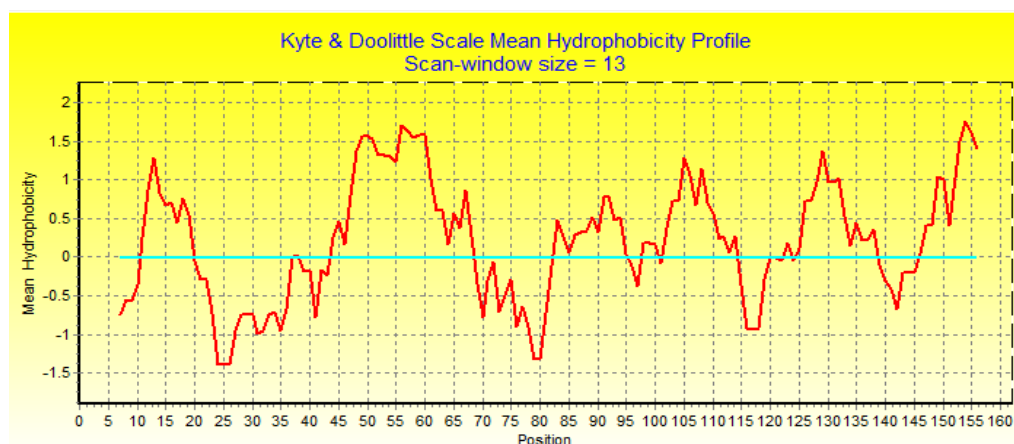
	ContiqSampel	<i>H. antonii</i>	<i>H. theivora</i>	<i>H. bradyi</i>	<i>P. maesarum</i>
Contiq Sampel	100%				
<i>H. antonii</i>	87%	100%			
<i>H. theivora</i>	88%	89-90%	100%		
<i>H. bradyi</i>	87%	92%	89%	100%	
<i>P. maesarum</i>	84%	85%	85%	84%	100%

Hasil analisis dengan menggunakan program *Restriction Mapper* memperlihatkan sekuen gen parsial COI sampel kepik penghisap buah memiliki 25 situs pemotongan enzim restriksi yang merupakan golongan enzim endonuklease tipe II (Data tidak ditunjukkan). Peta restriksi yang dianalisis dengan menggunakan program *Nebcutter* ditunjukkan pada Gambar 4.

Secara umum profil hidrofobisitas *Kyte and Doolittle* dibagi menjadi 2 yaitu hidrofilik apabila kurvaberadapada skala negatif (di bawah 0) dan hidrofobik apabila kurvaberada pada skala positif (di atas 0). Berdasarkan analisis hidrofobisitas menggunakan program *Kyte and Doolittle*, gen parsial COI kepik penghisap buah berada pada daerah hidrofilik dan hidrofobik (Gambar 5).



Gambar 4. Peta situs pemotongan enzim restriksi linear sekuen gen parsial COI Kepik penghisap buah berdasarkan program *Nebcutter*. Enzim *SpeI* spesifik untuk Kepik penghisap buah.



Gambar 5. Profil hidrofobisitas gen parsial COI Kepik penghisap buah.

5. Pembahasan

Kualitas DNA dapat diketahui melalui perbandingan nilai absorbansi pada panjang gelombang (λ) 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280}). Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada λ 260 nm, sedang kontaminan protein atau phenol dapat menyerap cahaya pada λ 280 nm (Fatchiyah, 2011). Molekul DNA dikatakan murni jika rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8–2,0. Jika nilai rasio lebih besar dari 2,0 menunjukkan terdapat kontaminasi RNA, sedangkan jika nilai rasio kurang dari 1,8 menunjukkan masih ada kontaminasi protein atau phenol di dalam larutan DNA (Sulandari dan Zein, 2003). Hasil isolasi DNA genom kepik penghisap buah menunjukkan tingkat kemurnian yang tinggi dengan perbandingan A_{260}/A_{280} mencapai 1,85.

Kemurnian DNA dapat pula diketahui melalui elektroforesis sampel DNA genom pada gel agarosa. Hasil visualisasi agarosa 1% (b/v) memperlihatkan pola pita tunggal yang jelas, tebal dan tidak *smear* (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa DNA genom hasil isolasi memiliki kualitas yang baik karena tidak terlihat pola pita DNA yang terdegradasi. Menurut Herison dkk.(2003) menyatakan bahwa kualitas DNA yang baik dan tidak terdegradasi pada hasil elektroforesis tidak memperlihatkan pola pita yang *smear*.

Amplifikasi gen *cytochrome coxidase* sub unit I (COI) dilakukan secara *in vitro* menggunakan teknik PCR. Hasil PCR yang divisualisasi pada gel agarosa 1% (b/v)

memperlihatkan pita fragmen target dengan jelas dan tebal yang membentuk pola pita tunggal (*single band*) dengan panjang produk sekitar 550pb (Gambar 2). Amplikon ini sesuai dengan target amplifikasi fragmen gen COI yang dihasilkan oleh primer *Hlpf* dan *Hlpr* yang digunakan dalam penelitian ini. Berdasarkan visualisasi tersebut, maka fragmen gen COI diperkirakan telah berhasil diamplifikasi secara spesifik. Menurut Settanni *et al.* (2006) menyatakan bahwa suatu sampel DNA dikatakan spesifik dan berhasil diamplifikasi apabila hasil analisis elektroforesis menunjukkan adanya pita tunggal DNA dengan ukuran yang sesuai dengan penanda yang telah diketahui sebelumnya. Berdasarkan hasil pengurutan DNA, ukuran fragmen DNA hasil PCR dengan menggunakan primer *Hlpf* dan *Hlpr* adalah 552 pb.

Fragmen gen COI kepik penghisap buah mempunyai kemiripan yang cukup tinggi dengan *Helopeltis*. Menurut Hall (2001), nilai *similarity* dapat ditentukan dari parameter *bit score* dan *identities*. Semakin tinggi nilai *identities* semakin menunjukkan kemiripan dengan sekuen acuan pada *GeneBank* (Prayuni, 2008). Selanjutnya Henry *et al.* (2000) menyatakan bahwa nilai *identities* (similaritas) 99–100% dinyatakan sebagai satu spesies yang sama, sedangkan nilai *identities* 89–99% termasuk dalam genus yang sama. Berdasarkan hal tersebut diduga sampel kepik penghisap buah bukan termasuk spesies dan genus yang sama dengan sekuen gen *subject* tetapi sampel kepik penghisap buah masih tergolong famili yang sama dengan sekuen gen *subject*. Hal ini didasarkan pada nilai similaritas jika lebih dari 80% maka masih digolongkan famili yang sama (Guo *et al.*, 2011).

Hasil analisis restriksi menunjukkan bahwa pada sekuen parsial gen COI sampel kepik penghisap buah memiliki 25 situs pemotongan enzim restriksi yang merupakan golongan enzim endonuklease tipe II. Enzim-enzim ini memiliki tiga pola pemotongan yaitu fragmen DNA berujung tumpul (*blunt end*), fragmen DNA berujung 5' lengket/lancip (*sticky/cohesive end at 5'*) dan fragmen dengan ujung 3' lengket/lancip (*sticky/cohesive end at 3'*). Pola pemotongan fragmen DNA berujung tumpul dimiliki oleh enzim BstZ17I, HaeIII, Hpy166II, HpyCH4V, NlaIV dan SpeI, kemudian pola pemotongan fragmen DNA berujung 5' dimiliki oleh enzim AccI, ApoI, AvaII, BccI, BceAI, BfaI, BfuAI, BspMI, CviAII, EaeI, FatI, HpyCH4IV, MaeIII, Sau96I, SfaNI, SfcI dan SpeIs. Pada pola pemotongan fragmen DNA berujung 3' dimiliki oleh enzim AagI, BanII, BslI, BsmI, Bsp1286I, BspCNIBsrI, BtsI, BtsIMutI, HpyCH4III, NlaIII, TspGWI dan TspRI. Enzim-enzim ini merupakan salah satu karakter yang dapat membedakan spesies lain. Berdasarkan Campbell *et al.* (2000), penggunaan peta restriksi (*restriction map*) dapat digunakan untuk pendekatan alternatif lain dalam analisis filogenetik antar spesies.

Berdasarkan analisis enzim restriksi memperlihatkan bahwa enzim SpeI dapat digunakan sebagai pembeda dengan spesies lain. Karena enzim ini hanya dimiliki oleh kepik penghisap buah (sampel) sedangkan spesies lain tidak mempunyai enzim tersebut. Hal ini dibuktikan dari hasil pensejajaran nukleotida amplikon kepik penghisap buah dengan *Helopeltis subject* (data tidak ditunjukkan) yang memperlihatkan bahwa hanya DNA kepik penghisap buah yang mempunyai urutan ACTAGT (situs pengenalan SpeI).

Hasil analisis hidrofobisitas, protein COI berada pada skala negatif (hidrofilik) dan positif (hidrofobik) sehingga protein ini merupakan protein yang terintegrasi pada membran. Bagian hidrofobik terletak dalam membran dan bagian hidrofilik terletak dalam matriks mitokondria.

6. Kesimpulan

Gen COI yang berasal dari hama kepik penghisap buah telah berhasil diamplifikasi menggunakan primer HlpF (5'-GAACTTGGAAGTACAGGACCAT-3') dan HlpR (5'-ACATCATCTCTTCGACCCATCA-3') dengan panjang produk 552 pb. Hasil analisis kesejajaran menunjukkan fragmen hasil PCR memiliki similaritas 88% dengan *Helopeltis theivora*, 87% dengan *Helopeltis antonii*, 87% dengan *Helopeltis bradyi* dan 84% dengan *Pacipeltis maesarum* yang memberikan dugaan bahwa kepik penghisap buah bukan termasuk spesies maupun genus yang sama dengan *Helopeltis antonii*, *H. bradyi*, dan *H. theivora* tetapi masih dalam famili yang sama yaitu miridae. Berdasarkan hasil analisis menggunakan program RestrictionMapper menunjukkan sekuen gen parsial COI kepik penghisap buah memiliki 25 situs pemotongan enzim restriksi yang merupakan golongan enzim endonuklease tipe II. Berdasarkan hasil analisis Hidrofobisitas, protein COI bersifat hidrofilik dan hidrofobik yang menunjukkan protein COI terintegrasi pada membran.

Referensi

- Baharudin, Purwantara Agus, Ilyas satriyas, dan Suhartanto Rahmad Mochamad. 2012. Isolasi Dan Identifikasi Cendawan Terbawa Benih Kakao Hibrida. *Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Bogor. Indonesia. Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. Volume 18 No. 1, Maret 2012.
- Campbell, R., and Reece, J. B. Mitchell. 2000. *Biologi Edisi ke-5 Jilid, 3*. Erlangga. Indonesia.
- Ditjen Perkebunan. 2010. Statistik Perkebunan (Tree Crop Estate Statistics). Direktorat Jenderal Perkebunan. *Departemen Pertanian*. 50 p.
- Fatchiyah. 2011. *Modul Pelatihan Analisis Fingerprinting DNA Tanaman Dengan Metode RAPD*. Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya. Malang.
- Guo, Y., Y., Bao, H., Wang, X., Hu, Z., Li, N., Zhao, and Y. Zhao. 2011. A preliminary analysis of the immunoglobulin genes in the African elephant (*Loxodonta africana*). *PloS one*, 6(2), e16889.
- Hall, B. G. 2001. Phylogenetic trees made easy: A how-to manual for molecular biologists. *Sunderland, Mass: Sinauer*.
- Hebert, D. N. Paul, Ratnasingham Sujeevan. and R. deWaard Jeremy. 2003. *Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species*. Departement of Zoology, University of Guelaph. Canada.
- Henry, T., P. C., Iwen, and S. H. Hinrichs. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4), 1510-1515.
- Herison, Catur; Rustikawati dan Eliyanti. 2003. Penentuan Protokol yang Tepat untuk Menyiapkan DNA Genom Cabai (*Capsicum* sp.). *Jurnal Akta Agrosia* 6 (2): 38-43
- Muzuni, Sopandie Didy, Widyastuti Utut, Suharsono, dan Suharsono. 2010. Isolasi dan Pengklonan Fragmen cDNA Gen Penyandi H⁺-ATPase Membran Plasma dari *Melastoma malabathricum* L. *J. Agron. Indonesia*, 38 (1).

- Prayuni Kinasih. 2008. Isolasi dan Pengklonan Promoter Gen *lea3* yang Terinduksi Kekeringan dari Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.) Lokal Indonesia Kultivar Rojolele dan Batutegi. *Skripsi*. FMIPA. UI. Depok.
- Sambrook, J., E.F. Fritch, and T. Manniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: xxxviii + 5.31 + 6.9 hlm.
- Settanni, L, S. Valmori, D.W. Sinderen, G, Suzzi, A. Paparella and A. Corsetti. 2006. Combination of multiplex PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sourdough-associated *Lactobacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(5):3793-3796.
- Sulandari, S., and M. S. A. Zein. 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Bidang Zoologi LIPI. Bogor.
- Wood, B.J. and G.F. Chung. 1989. Integrated management of Insect pests of cocoa in Malaysia. *The planter*, 65 (762), 389 – 418.