

# Keanekaragaman Genetik Rayap Tanah Genus *Coptotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) di Pulau Jawa

Niken Subekti<sup>1</sup>, Dodi Nandika<sup>2</sup> dan Dedy Duryadi Solihin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang, Jl.Raya Sekaran-Gunungpati Semarang 50229

<sup>2</sup>Departemen Teknologi Hasil Hutan Fakultas Kehutanan IPB, Kampus IPB-Darmaga Bogor 16880

<sup>3</sup>Departemen Biologi, Fakultas MIPA IPB, Kampus IPB-Darmaga Bogor 16880

Diterima Juli 2005 disetujui untuk diterbitkan Mei 2006

## Abstract

*Subterranean termite Coptotermes spp. has been known as the most economically important structural pest in Indonesia. Due to morphological ambiguity, traditional identification of Coptotermes spp. has always been difficult and unreliable. Through molecular diagnostic method, a study was conducted to determine genetic variation of Coptotermes spp. occurring in Java Island. Termite specimens were collected from Banten 1, Banten 2, DKI 1, DKI 2, Jabar 1, Jabar 2, Jateng 1, Jateng 2, Yogya 1, Yogya 2, Jatim 1, and Jatim 2. The method for identification was PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) analysis using four restriction enzymes each of which was applied to CO II amplicon for all the Coptotermes spp. being analyzed. The results showed the existence of two species of Coptotermes in Java which are different from both Coptotermes gestroi and Coptotermes formosanus.*

**Key words:** PCR-RFLP, molecular diagnostics, *Coptotermes spp.*, termites

## Pendahuluan

Rayap merupakan bagian dari kekayaan sumberdaya hayati yang sangat penting di dalam daur ulang nutrisi tanaman melalui proses desintegrasi dan dekomposisi bahan organik. Namun, rayap seringkali juga merusak kayu konstruksi bangunan dan bahan berselulosa lainnya di dalam bangunan gedung atau menyerang pohon dan tanaman hidup sehingga menjadi hama yang potensial, terutama di areal perkebunan kelapa sawit, karet, dan tanaman hutan industri seperti pinus dan eukaliptus (Nandika *et al.*, 2003). Serangan rayap pada bangunan gedung dewasa ini merupakan masalah yang sangat besar mengingat intensitas serangannya yang makin tinggi dan meluas sehingga nilai kerugian akibat serangan rayap cenderung meningkat dari tahun ke tahun.

Penelitian selama ini menunjukkan bahwa sebenarnya hanya beberapa jenis rayap yang mampu menyebabkan kerusakan yang berarti pada bangunan gedung, terutama rayap dari genus *Coptotermes*. Rayap *Coptotermes* merupakan kelompok rayap tanah (*subterranean termite*) yang bersarang di dalam tanah. Namun, berbeda dengan rayap tanah lainnya, serangga ini mampu membentuk sarang-sarang antara (*satellite nest*) yang berada jauh dari permukaan tanah. Oleh karena itu, serangannya dapat mencapai bagian-bagian yang tinggi pada bangunan-bangunan bertingkat.

Dilihat dari potensi biologi dan ekologi daerah tropis dapat dipastikan bahwa keanekaragaman jenis *Coptotermes* di Indonesia jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan keanekaragamannya di negara-negara lain. Namun, hingga saat ini keanekaragaman jenis serangga ini belum secara lengkap diketahui, termasuk di Pulau Jawa yang telah memperlihatkan berbagai kerugian ekonomi akibat serangga ini. Hal ini antara lain disebabkan oleh kemiripan karakter morfologi antarjenis dalam satu genus yang sangat tinggi

sehingga menimbulkan kesulitan dalam identifikasi (Tarumingkeng *et al.*, 2004). Oleh karena itu, tumpuan identifikasi yang tepat untuk membedakan jenis-jenis serangga ini terletak pada penentuan karakter genotipenya. Analisis genotipe dapat dengan tepat membedakan satu jenis rayap dengan jenis rayap lainnya melalui perbedaan karakteristik genotipenya.

## Materi dan Metode

Spesimen rayap yang digunakan dalam penelitian ini ialah koloni rayap *Coptotermes* yang berasal dari Jakarta Selatan (DKI 1), Jakarta Timur (DKI 2), Serang (Banten 1), Rangkasbitung (Banten 2), Bogor (Jabart 1), Bandung (Jabar 2), Semarang (Jateng 1), Jepara (Jateng 2), Yogyakarta (Yogya 1), Sleman (Yogya 2), Surabaya (Jatim 1), dan Sidoarjo (Jatim 2). Pengumpulan spesimen rayap dilakukan melalui teknik pengumpanan yang dikembangkan oleh Nandika (2001) dengan cara menggunakan kayu umpan Pinus (*Pinus merkusii*) berukuran 20 x 5 x 5 cm. Lahan pengambilan spesimen yang digunakan berukuran 10 x 10 meter untuk setiap titik sampel. Jumlah titik setiap pengambilan sampel pada setiap lokasi adalah 200. Kayu pinus tersebut ditanam ke dalam tanah sedalam 15 cm sehingga terdapat bagian kayu yang muncul di atas permukaan tanah sepanjang 5 cm. Kayu umpan dibiarkan selama tiga minggu. Selanjutnya, kayu umpan diangkat dari dalam tanah dan rayap yang terdapat pada setiap kayu umpan dikumpulkan untuk diidentifikasi jenisnya. Pengujian secara genetik dilakukan dengan ekstraksi DNA, amplifikasi gen mtDNA, yaitu gen CO II secara parsial yang dipotong dengan enzim restriksi, sehingga dapat diketahui kekerabatan jenisnya.

Purifikasi DNA dilakukan menggunakan metode Duryadi (1993) yang dimodifikasi, yaitu 25 ekor spesimen dari kasta prajurit dalam satu koloni yang telah dibuang saluran pencernaannya digerus, kemudian diencerkan dengan menambahkan 500 µl bufer digesti (1% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 9,0; 0,1 M EDTA pH 8,0; 0,2 M NaCl; 0,1 mg/ml RNase, dan 0,5 mg/ml proteinase K) pada campuran tersebut dan dikocok hingga homogen. Larutan diinkubasi pada suhu 55°C selama 16 jam. Sebanyak 500 µl larutan fenol ditambahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga, kemudian dikocok hingga homogen selama 20 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga yang baru dan diberi kloroform : isoamilalkohol (24 :1) sebanyak 500 µl, lalu dikocok hingga homogen selama 20 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga baru dan diberi larutan etanol absolut sebanyak 2x volume awal, kemudian dikocok hingga terbentuk material putih (DNA). Larutan yang mengandung DNA tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Larutan etanol absolut dibuang dan DNA dicuci dengan etanol 70%. Endapan DNA dikeringkan dengan *vacuum dryer* selama 15 menit, kemudian diberi larutan TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8,0) sebanyak 100 µl. Larutan DNA disentrifugasi beberapa saat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. DNA disimpan pada suhu -20° C (*freezer*).

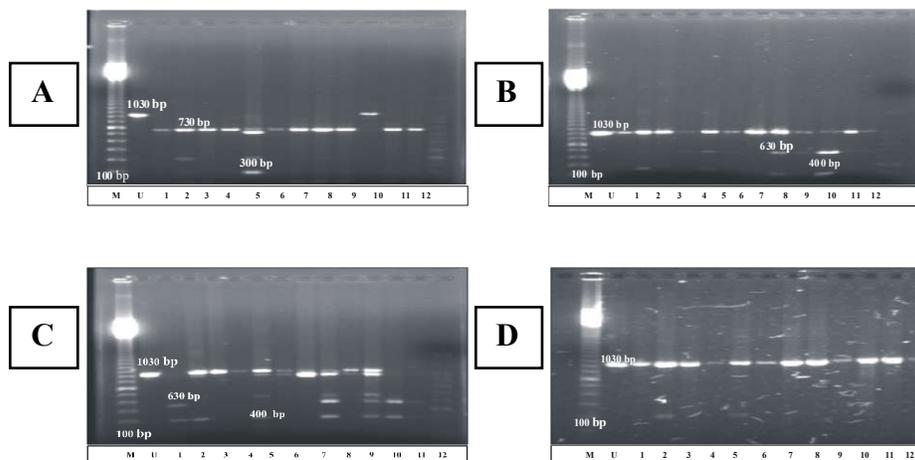
Amplifikasi daerah CO II dilakukan menggunakan sepasang primer yang dirancang oleh Miura *et al.* (2000), yaitu (5') ATA CCT CGA CGA TTA TTC AGA (3') sebagai *forward primer* dan (5') GTT TAA GAG ACC AGT ACT TG (3') *reverse primer*. Optimalisasi dalam proses amplifikasi daerah CO II dilakukan menggunakan mesin Gene Amp PCR System 2400 Perkin Elmer dengan kondisi denaturasi DNA 94° C selama 45 detik, *annealing* 59° C selama 1,5 menit, dan *elongasi* 72° C selama 1 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus (sekitar 3 jam). Keanekaragaman genetik pada daerah CO II mtDNA rayap genus *Coptotermes* dideteksi dengan teknik PCR-RFLP menggunakan tiga jenis enzim restriksi pemotong empat basa dan satu enzim pemotong enam basa, yaitu *Alu* I (AG/CT), *Msp* I (C/CGG), *Rsa* I (GT/AC) dan *EcoR* I (G/AATTC). Komposisi reaksi pemotongan dengan keempat enzim restriksi tersebut adalah 1 µl bufer; 1,5 µl enzim restriksi; 7,5 µl DNA sampel.

Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam (Sambrook *et al.*, 1989). Hasil pemotongan fragmen DNA tersebut kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1,2% menggunakan bufer TBE 1x selama 2 jam (Sambrook *et al.*, 1989). Sebagai standar besarnya ukuran fragmen DNA yang dihasilkan digunakan DNA *ladder* 100 pb (*Amersham Pharmacia Biotech*).

## Hasil dan Pembahasan

Amplifikasi gen-gen secara parsial pada fragmen CO II DNA mitokondria dari beberapa spesimen *Coptotermes* di Pulau Jawa menunjukkan bahwa ukuran DNA hasil amplifikasi organisme tersebut dengan primer spesifik yang digunakan adalah 1.030 pb. Namun, hasil pemotongan dengan enzim restriksi *Alu* I (AG/CT) menunjukkan variasi pola pita DNA. Kecuali pada spesimen rayap *Coptotermes* yang berasal dari Yogya 2, terlihat adanya pita-pita DNA berukuran 730 pb dan 300 pb sebagai hasil pemotongan dengan *Alu* I, sedangkan pada rayap *Coptotermes* dari daerah Yogya 2 tidak ditemukan situs pemotongan *Alu* I.

Hasil pemotongan dengan *EcoR* I (G/AATTC) menunjukkan dua pola, yaitu pola yang memperlihatkan adanya situs *EcoR* I dan pola yang tidak memperlihatkan adanya situs tersebut. Pada pola yang memperlihatkan situs restriksi *EcoR* I hanya ditemukan satu situs sehingga terdapat pita berukuran 630 pb dan 400 pb. Spesimen yang memiliki pola tersebut berasal dari Banten 1, Banten 2, DKI 2, Jabar 1, Jabar 2, Jateng 2, dan Yogya 2. Sementara itu, spesimen rayap *Coptotermes* yang tidak memperlihatkan adanya situs pemotongan *EcoR* I berasal dari daerah DKI 1, Jateng 1, Yogya 1, Jatim 1, dan Jatim 2. Hal ini ditunjukkan dari ukuran pita DNA hasil pemotongannya yang sama dengan ukuran pita sebelum dipotong.



Gambar 1. Profil DNA rayap *Coptotermes* teramplifikasi yang dipotong dengan *Alu* I (A), *EcoR* I (B), *Rsa* I (C), dan *Msp* I (D). M = DNA *ladder* 100 pb; U = amplicon utuh; 1 = Banten1; 2 = Banten 2; 3 = DKI 1; 4 = DKI 2; 5 = Jabar 1; 6 = Jabar 2; 7 = Jateng 1; 8 = Jateng 2; 9 = Yogya1; 10 = Yogya 2; 11 = Jatim 1; dan 12 = Jatim 2.

Figure 1. Profile of *Coptotermes* DNA amplicon restricted with *Alu* I (A), *EcoR* I (B), *Rsa* I (C), and *Msp* I (D). M = 100 bp DNA ladder; U = intact amplicon; 1 = Banten1; 2 = Banten 2; 3 = DKI 1; 4 = DKI 2; 5 = Jabar 1; 6 = Jabar 2; 7 = Jateng 1; 8 = Jateng 2; 9 = Yogya1; 10 = Yogya 2; 11 = Jatim 1; and 12 = Jatim 2.

Hasil pemotongan dengan *Rsa* I (GT/AC) memberikan pola yang sama dengan hasil pemotongan *EcoR* I. Pada tujuh spesimen rayap *Coptotermes* yang berasal dari daerah Banten 1, Banten 2, DKI 2, Jabar 1, Jabar 2, Jateng 2, Yogya 2, Jatim 1, dan Jatim 2 dihasilkan pita-pita DNA berukuran 630 pb dan 400 pb. Sementara itu, pada rayap *Coptotermes* lainnya tidak ditemukan adanya situs pemotongan *Rsa* I sehingga ukuran pita DNA hasil pemotongannya sama dengan ukuran pita sebelum dipotong.

Hasil pemotongan dengan *Msp* I (C/CGG) pada semua spesimen tidak memperlihatkan adanya situs restriksi *Msp* I. Oleh karena itu, ukuran pita DNA hasil pemotongannya sama dengan ukuran pita sebelum dipotong, yaitu sebesar 1.030 pb.

Hasil kompilasi pemotongan keempat enzim restriksi di atas kemudian ditransformasi menjadi data biner seperti pada Gambar 5 dan diolah menggunakan program MEGA versi 2.0 dengan dasar pembuatan pohon filogenik menggunakan sistem UPGMA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan pemotongan menggunakan empat jenis enzim restriksi didapatkan dua pola pemotongan pada bagian CO II berukuran 1.030 pb untuk semua sampel spesimen rayap *Coptotermes*. Pola I dicirikan oleh pita yang tidak terpotong untuk seluruh sampel sebagai hasil pemotongan menggunakan enzim restriksi *Msp* I. Pola II dicirikan oleh adanya pita DNA polimorfik sebagai hasil pemotongan menggunakan enzim *Alu* I, *EcoR* I, dan *Rsa* I (Tabel 1), yang sebagian di antara sampel ada yang tidak terpotong.

Tabel 1. Haplotype rayap *Coptotermes* dari beberapa kota di Pulau Jawa berdasarkan atas hasil pemotongan dengan enzim restriksi *Alu* I, *EcoR* I, *Rsa* I, dan *Msp* I

Table 1. Haplotype of *Coptotermes* from many cities in Java based on the restriction patterns of *Alu* I, *EcoR* I, *Rsa* I, and *Msp* I

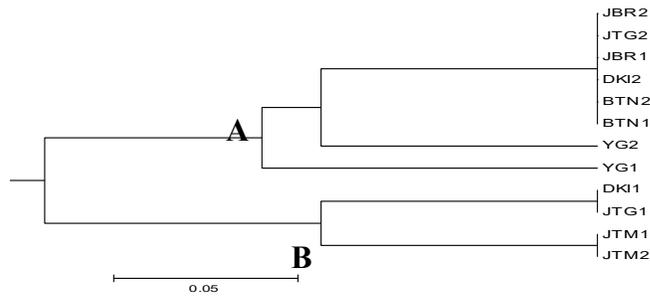
Haplotype	<i>Alu</i> I (pb)			<i>EcoR</i> I (pb)			<i>Rsa</i> I (pb)			<i>Msp</i> I (pb)
	1.030	730	300	1.030	630	400	1.030	630	400	1.030
I		X	X		X	X		X	X	X
II	X				X	X		X	X	X
III		X	X		X	X	X			X
IV		X	X	X			X			X
V		X	X	X				X	X	X

Keterangan : X = hasil pemotongan

Secara keseluruhan hasil PCR-RFLP pada fragmen CO II DNA mitokondria rayap *Coptotermes* yang berasal dari beberapa kota di Pulau Jawa ditandai dengan terdapatnya lima haplotipe. Haplotype I ditemukan pada sampel dari Jabar 2, Jateng 2, Jabar 1, DKI 2, Banten 2 dan Banten 1. Haplotype II dan haplotype III ditemukan pada rayap tanah *Coptotermes* dari Yogya 2 dan Yogya 1. Haplotype IV ditemukan pada sampel dari DKI 1 dan Jateng 1, sedangkan haplotype V ditemukan pada sampel dari Jatim1 dan Jatim 2. Berdasarkan atas hasil tersebut nampaknya kelima tipe pemotongan yang diperoleh dapat digunakan sebagai penanda dalam pengelompokan sampel rayap *Coptotermes* yang dianalisis. Haplotype I, II, dan III cenderung mencirikan pengelompokan untuk rayap *Coptotermes* A, sedangkan haplotype IV dan V cenderung mencirikan pengelompokan untuk rayap *Coptotermes* B (Gambar 2).

Hasil PCR-RFLP pada fragmen CO II mtDNA berukuran 965 pb pada rayap *C. formosanus* dari Jepang (Miura *et al.*, 2000) menunjukkan bahwa tidak ada situs *Alu* I, *EcoR* I, dan *Msp* I, tetapi terdapat beberapa situs *Rsa* I (hasil pemotongan berupa fragmen 561 pb, 318 pb, 71 pb, dan 15 pb). Sementara itu, hasil PCR-RFLP pada fragmen CO II mtDNA berukuran 995 pb pada rayap *C. gestroi* dari Australia (Tsai *et al.*, 2003) menunjukkan bahwa

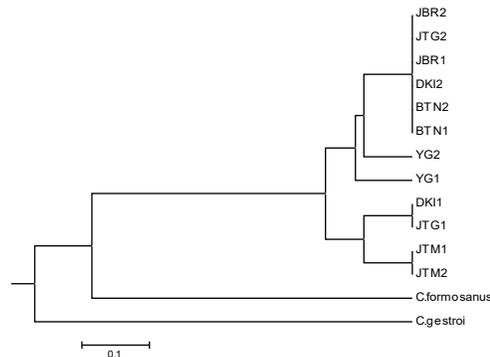
tidak ada situs pemotongan untuk enzim *EcoR* I dan *Msp* I. Sebaliknya, terdapat situs pemotongan untuk enzim *Alu* I (941 pb dan 54 pb) dan *Rsa* I (880 pb, 66 pb, dan 49 pb).



Gambar 2. Dendrogram pola polimorfik daerah CO II mtDNA rayap *Coptotermes* di Pulau Jawa dengan metode UPGMA

Figure 2. Dendogram of mtDNA CO II polymorphism of *Coptotermes* in Java Island using UPGMA method

Apabila hasil penelitian ini digabungkan dengan hasil Miura *et al.* (2000) dan Tsai *et al.* (2003) seperti tertera pada Gambar 3, akan terlihat bahwa rayap *Coptotermes* yang ada di Pulau Jawa secara genetik berbeda spesies dengan rayap *C. gestroi* (Australia) dan *C. formosanus* (Jepang). Walaupun demikian, secara genetik *Coptotermes* di Pulau Jawa masih nampak lebih dekat dengan *C. formosanus* jika dibandingkan dengan *C. gestroi*.



Gambar 3. Dendrogram pola polimorfik daerah CO II mtDNA rayap *Coptotermes* di Pulau Jawa dengan kelompok pembanding *C. formosanus* dan *C. gestroi* dengan metode UPGMA

Figure 3. Dendogram of mtDNA CO II polymorphism of *Coptotermes* in Java Island in compare to that of *C. formosanus* and *C. gestroi* using UPGMA method

## Kesimpulan

Analisis hubungan kekerabatan genetik antarjenis dalam genus *Coptotermes* menunjukkan bahwa di Pulau Jawa sekurang-kurangnya terdapat dua jenis rayap tanah yang berbeda. Perbedaan secara genetik rayap tanah genus *Coptotermes* di Pulau Jawa dengan rayap tanah *C. formosanus* dan *C. gestroi* dapat dideteksi menggunakan pola restriksi *Alu* I, *EcoR* I, *Rsa* I, dan *Msp* I.

## Ucapan Terima Kasih

Dengan selesainya penelitian ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi atas dukungan dana yang diberikan.

## Daftar Pustaka

- Duryadi, D. 1993. Role Possible du comportement dans l'évolution de deux souris *Mus macedonicus* et *Mus spicilequs* en Europe Centrale. Thesis Doctorat. Universite Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France.
- Miura, T., A. Kamikouchi, M. Sawata, H. Takeuchi, and T. Matsumoto. 2000. Soldier caste-specific gene expression in the mandibular glands of *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termopsidae). *Mol. Evol.* 96 (24): 13874-13879.
- Nandika, D. 2001. Dampak Ekonomis Serangan Rayap *dalam* Teknologi Pengendalian Rayap Ramah Lingkungan. Makalah Penelitian dan Workshop, Pusat Studi Ilmu Hayati, IPB dan Rentokil Pest Control, Bogor, 19-21 Juli 2001.
- Nandika, D., Y. Rismayadi, dan F. Diba . 2003. Rayap: Biologi dan Pengendaliannya. Muhamadiyah University Press, Surakarta.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Tarumingkeng, R.C., S. Suryokusumo, dan D. Duryadi. 2004. Pengendalian Terpadu Koloni Rayap Tanah Genus *Coptotermes* pada Lingkungan Pemukiman di Pulau Jawa Berdasarkan Informasi Genetik dan Kelas Bahaya Rayap. Laporan Penelitian Hibah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Tsai, C., W. Chen, and C. Chen. 2003. *Coptotermes gestroi cytochrome oxydase* subunit II gene; mitochondrial gene for mitochondrial product. [http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) diakses 28 Mei 2003.