

Variasi Sekuen dan Filogenetik *Leptocorisa oratorius* (Fabricius) di Jawa Timur Berdasarkan Gen *COX2*

Itsna Fauziyyah^{1*}, Suhadi¹

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Malang, Jl. Semarang 5 Malang, Indonesia

*E-mail: itsna.fauziyyah@gmail.com

Abstrak. *Leptocorisa oratorius* menyerang tanaman padi hingga menyebabkan gagal panen di Jawa Timur. Strategi pengendalian hama harus disesuaikan dengan jarak genetik, agar tidak menyebabkan resistensi hama akibat penanganan yang tidak tepat pada populasi hama di tempat yang berbeda. Sehingga tujuan penelitian yaitu untuk mengetahui variasi sekuen dan filogenetik hama *Leptocorisa oratorius* menggunakan gen *COX2*. Sampel diambil dari Trenggalek, Magetan, Malang, Bondowoso, Gresik dan Mojokerto. Metode penelitian yang digunakan yaitu ekstraksi DNA menggunakan The Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega. Amplifikasi gen *COX2* dengan primer *COX2 Leptocorisa oratorius* (F) -5' ACA AGA TGC AAT ATC CCC TT 3' dan *COX2 Leptocorisa oratorius* (R) -5' TGG TTT AAG AGA CCA ATG CT 3'. Analisis sekuens menunjukkan terdapat perbedaan enam belas pasang basa nukleotida pada urutan sekuens sampel dilokasi yang berbeda. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik yaitu sampel daerah (Malang, Mojokerto dan Bondowoso) merupakan sampel yang berada pada satu *internal* klaster, sedangkan sampel (Gresik dan Magetan) memisah dengan sampel lain begitu juga dengan sampel (Trenggalek). Nilai jarak genetik terkecil terbentuk pada populasi hama Mojokerto-Malang, Bondowoso-Malang, Bondowoso-Mojokerto, dan Magetan-Gresik dengan nilai 0.0000 dan jarak genetik terbesar antara populasi hama Gresik-Trenggalek dan Magetan-Trenggalek dengan nilai 0.0190.

Kata kunci : *COX2, Filogenetik, Leptocorisa oratorius*

Abstract. *Leptocorisa oratorius* attacks rice plants causing crop failure in East Java. Pest control strategies must be adapted to genetic distance, so as not to cause pest resistance due to improper handling of pest populations in different places. So that the aim of the study was to determine the sequence and phylogenetic variation of the pest *Leptocorisa oratorius* using the *COX2* gene. Samples were taken from Trenggalek, Magetan, Malang, Bondowoso, Gresik and Mojokerto. The research method used is DNA extraction using The Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega. *COX2* gene amplification with *COX2 Leptocorisa oratorius* (F) -5' ACA AGA TGC AAT ATC CCC TT 3' primer and *COX2 Leptocorisa oratorius* (R) -5' TGG TTT AAG AGA CCA ATG CT 3' primer. Sequence analysis showed that there were sixteen different nucleotide base pairs in the sample sequences at different locations. The results of the phylogenetic tree reconstruction are that the regional samples (Malang, Mojokerto and Bondowoso) are samples that are in one internal cluster, while the samples (Gresik and Magetan) are separated from other samples as well as the sample (Trenggalek). The smallest genetic distance value was formed in the pest populations of Mojokerto-Malang, Bondowoso-Malang, Bondowoso-Mojokerto, and Magetan-Gresik with a value of 0.0000 and the largest genetic distance between the pest populations of Gresik-Trenggalek and Magetan-Trenggalek with a value of 0.0190.

Keywords: *COX2; Phylogenetic; Leptocorisa oratorius*

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) adalah salah satu komoditi pangan di Indonesia dan merupakan bahan makanan pokok bagi sebagian besar penduduk Indonesia yang tergolong sebagai komoditas strategis karena akibatnya dirasakan langsung oleh masyarakat ketika terjadi kelangkaan ketersediaan beras di pasaran. Akibatnya terbatasnya jumlah produksi padi dan terjadinya perubahan harga yang menyebabkan penawaran dan permintaan barang menjadi berkurang (Hosamani, 2009). Kebutuhan beras sebagai salah satu sumber pangan utama penduduk Indonesia terus meningkat karena jumlah penduduk yang terus bertambah.

Produktivitas padi sering kali terganggu karena adanya organisme pengganggu tanaman dalam kegiatan budidaya tanaman padi. Pracaya (2009) menyatakan adapun beberapa faktor yang mempengaruhi kesehatan tanaman antara lain kesuburan tanah, iklim, bibit unggul, serta hama dan penyakit. Hama *Leptocorisa oratorius* merupakan salah satu hama utama yang menyerang komoditas padi di seluruh dunia (Pratimi, 2011). Di Indonesia, hama ini menyerang bulir padi yang dalam keadaan matang susu. Serangan berat hama tersebut dapat menurunkan produksi panen dengan cara mengisap bulir padi pada fase matang susu sehingga bulir menjadi hampa. Serangan pada tanaman padi dapat menurunkan hasil produksi mencapai 10-40%, sedangkan pada serangan yang berat dapat menurunkan hasil sampai 100% (Kalshoven, 1981).

Hingga saat ini, pengendalian hama walang sangit secara efektif dan efisien masih belum ditemukan akibat terbatasnya informasi mengenai karakteristik hama walang sangit tersebut umumnya fokus pada karakteristik biologis, siklus hidup, perilaku walang sangit dan beberapa sifat penting lainnya (Lim et al, 2013). Studi tentang keanekaragaman walang sangit (*Leptocorisa oratorius*) yang berbeda telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Namun, belum ada penelitian pada tingkat molekulernya. Oleh karena itu rasanya perlu untuk mengambil sebuah studi rinci tentang penanda molekuler seperti kromosom dan DNA mitokondria yang digunakan sebagai determinan karakter genotip untuk mengembangkan manajemen praktek upaya pengendalian hayati hama pada lahan pertanian (Hebert et al, 2009). Ratnayani (2007) mengungkapkan DNA mitokondria mempunyai karakteristik yang dapat dijadikan alat yang signifikan untuk keperluan analisis.

Hubungan kekerabatan merupakan suatu metode yang digunakan dalam analisis sistematika untuk memahami keanekaragaman makhluk hidup melalui rekonstruksi hubungan kekerabatan (Hidayat, 2008). Pohon filogenetik dapat direkonstruksi dengan dua cara, yaitu berdasarkan karakter morfologi dan karakter molekuler (Tjitrosoepomo, 2009). Karakter morfologi telah lama digunakan dalam banyak penelitian tentang hubungan kekerabatan. Namun hasilnya sering kali kurang akurat karena perbedaan spesies yang berkerabat dekat seringkali sulit diamati. Selain hal tersebut, umumnya sifat kuantitatif yang dikendalikan oleh banyak gen dan sangat

dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga hasilnya akan lebih akurat menggunakan penanda molekular (Maftuchah, 2005).

Pada penelitian ini dilakukan analisis sekuen DNA dari mitokondria *Cytochrome C Oxidase Subunit II (COX2)* untuk menganalisis variasi genetik hama walang sangit di wilayah Jawa Timur dengan tujuan untuk mengetahui tingkat variasi genetik antar populasi walang sangit di Jawa Timur. Dengan demikian hal ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar untuk merancang strategi pengendalian hama dalam wilayah geografis tertentu.

MATERIAL DAN METODE

Analisis Molekuler

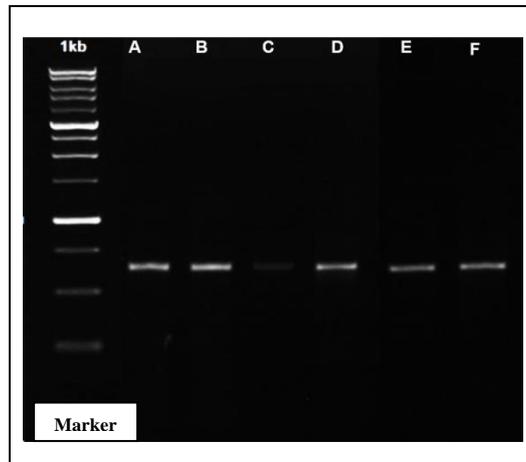
Prosedur **ekstraksi DNA** menggunakan The Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega. **Amplifikasi DNA** hasil ekstraksi dilakukan untuk dua individu dari tiap lokasi pengambilan sampel. Amplifikasi fragmen gen menggunakan primer *COX2 Leptocorisa oratorius* (F) -5' ACA AGA TGC AAT ATC CCC TT 3' dan *COX2 Leptocorisa oratorius* (R) -5' TGG TTT AAG AGA CCA ATG CT 3'. Komposisi PCR amplifikasi gen *COX2* dilakukan dengan total volume 30 µl, yang terdiri dari 15 µl PCR Master Mix Nexpro, 2,5 µl sampel DNA Template (100 ng/µl), 7,5 µl Water, 2,5 µl primer (10 pmol setiap primer forward dan reverse. Siklus PCR meliputi tahap pre-denaturasi pada suhu 95 °C selama 2 menit, kemudian 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 95 °C selama 1,5 menit, annealing pada suhu 50°C selama 1,5 menit, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit. Selanjutnya dilakukan proses post elongation dengan suhu 72 °C selama 2 menit. **Hasil amplifikasi** berupa 1 µl DNA dielektroforesis horizontal menggunakan *agarose*, aquades steril, *loading dye*, Ethidium-Bromide, buffer TBE (Tris 0.5 M, Asam Borat 0.65 M, EDTA 0.02 M). Visualisasi DNA menggunakan *UV transilluminator*. Selanjutnya, Hasil PCR kemudian disekuensing menggunakan jasa sekuensing *sequencing 1stBASE Laboratories*, Malaysia.

Analisis Data

Analisis data genetik hasil sekuensing DNA menggunakan beberapa software pendukung. Data sekuen diolah menggunakan program Bioedit 7.1.9, selanjutnya melalui BLAST data dicocokkan dengan data GenBank di NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Penjajaran sekuens DNA dan semua gap menggunakan multalin V.5.4.1 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) yang dikembangkan oleh (Corpet, 1998). Penjajaran sekuens dilakukan dengan Multalin v5.4.1. Analisis panjang basa, komposisi nukleotida, menghitung jarak genetik, dan membuat pohon filogenetik menggunakan software Mega7.0 (Kumar et al., 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Amplifikasi – PCR



Gambar 1. Electrophoregram amplicon gen COX2 dari 6 sampel Walang sangit.

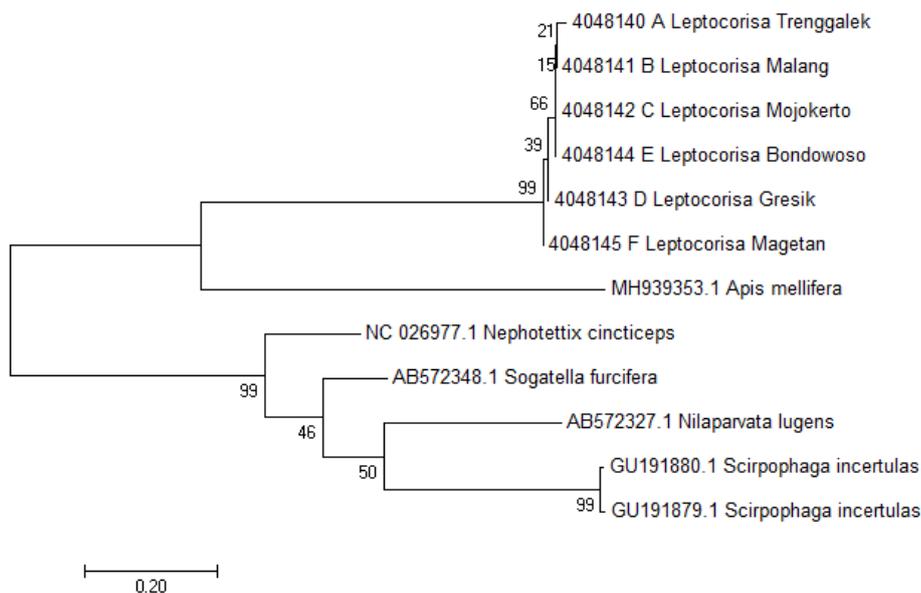
A = Trenggalek, B= Malang, C= Mojokerto, D= Gresik, E = Bondowoso, F= Magetan

Amplifikasi menggunakan primer COX2 *Leptocoris oratorius* (F) -5' ACA AGA TGC AAT ATC CCC TT 3' dan COX2 *Leptocoris oratorius* (R) -5' TGG TTT AAG AGA CCA ATG CT 3' telah berhasil dilakukan pada 6 sampel yang diteliti. Visualisasi gen target hasil amplifikasi seluruh sampel menunjukkan fragmen DNA sepanjang 800 bp – 900 bp (Gambar 1).

Variasi Sekuen

Hasil penjaran keenam sampel Hama *Leptocoris oratorius* dengan menggunakan Multalin v5.4.1, menunjukkan adanya variasi intraspecies pada keenam *Leptocoris oratorius* (Gambar 2). Variasi basa nukleotida terdapat 16 titik pada gen COX2 yang berada pada urutan basa nomor 9 (G-A), 10 (T-G), 13 (G-T), 14 (A-G), 70 (G-A), 106 (C-T), 124 (C-T), 157 (T-A), 190 (G-A), 334 (A-G), 385 (G-A), 424 (G-A), 445 (T-C), 454 (C-T), 664 (A-G) dan 665 (A-C). Variasi basa nukleotida yang terjadi pada situs-situs tersebut disebabkan karena adanya substitusi basa nukleotida. Perubahan basa yang terjadi berupa substitusi transisi dan transversi. Transisi adalah perubahan antar basa A (Adenin) dan G (Guanin) atau purin, atau antar basa C (Sitosin) dan T (Timin) atau pirimidin, sedangkan transversi adalah perubahan antara suatu basa purin dengan suatu basa pirimidin. Di antara substitusi ini, substitusi transisi paling banyak ditemukan dari pada substitusi transversi.

Pohon Filogenetik



Gambar 2. Filogenetik berdasarkan Metode Neighbor Joining 1000 bootstrap. Panjang dari setiap pasangan dari cabang-cabang diatas menunjukkan jarak antara masing-masing pasangan. Skala dibawah pohon menunjukkan ukuran jarak antar sekuens. Angka pada pohon menunjukkan nilai bootstrap masing-masing cabang.

Hasil analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan software Mega7.0. Metode yang digunakan melalui pendekatan *distance-based method* yaitu *Neighbor Joining* dengan 1000 bootstrap pada sampel hama *Leptocorisinae* dan *outgroup* (*Scirpophaga intercula* Wlk., *Sogatella furcifera* Horv., *Nilaparvata lugens* Stal., *Apis mellifera* Lin., *Neptotettix cincticeps* Uhler.) menunjukkan jarak genetik yang terpisah. *Leptocorisinae* memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan membentuk kelompok dalam satu cabang pohon, yaitu hasil menunjukkan bahwa sampel B (Malang), C (Mojokerto) dan E (Bondowoso) merupakan sampel yang berkerabat dekat yang berada pada satu *internal klaster*, dalam taksonomi hal berikut disebut monofiletik. Sedangkan Sampel D (Gresik) dan F (Magetan) memisah dengan sampel lain begitu juga dengan sampel A (Trenggalek). Sedangkan pada spesies *outgroup* (*Scirpophaga intercula* Wlk., *Sogatella furcifera* Horv., *Nilaparvata lugens* Stal., *Apis mellifera* Lin., *Neptotettix cincticeps* Uhler.) membentuk percabangan sendiri. Topologi pohon filogenetik yang dihasilkan bersifat monofiletik, artinya kelompok tersebut memiliki satu nenek moyang yang mewarisi sifat-sifat genetik, morfologi dan biokimia pada semua keturunannya. Hal ini membuat anggota monofiletik sangat erat hubungannya satu sama lain (Hidayat & Pancoro, 2008). Pernyataan tersebut sesuai dengan pohon filogenetik hama *Leptocorisinae* yang terbentuk.

Mahardika (2008) metode yang paling sering digunakan adalah metode *Neighbor-Joining* (NJ). Pola percabangan pohon filogenetik dibentuk berdasarkan jarak matrik antar pasangan

populasi. Panjang cabang pohon filogenetik menggambarkan jumlah substitusi nukleotida yang berupa polimorfisme DNA. Skala terletak di bawah pohon filogenetik menunjukkan ukuran jarak antar sekuens. Angka yang terletak pada cabang-cabang pohon filogenetik menunjukkan nilai *bootstrap*. Nilai *bootstrap* pada sampel *Leptocorisa oratorius* menunjukkan nilai 99%. Analisis *bootstrap* dilakukan untuk menguji validitas konstruksi pohon filogenetik. Pohon filogenetik memberi informasi tentang klasifikasi populasi berdasarkan hubungan evolusionernya. Dalam rekonstruksi pohon filogenetik, data molekuler lebih banyak digunakan karena dianggap lebih stabil dalam proses evolusi dibandingkan dengan data morfologi (Dharmayanti, 2011).

Analisis filogeografi hama walang sangit (*Leptocorisa oratorius*) dapat dijelaskan melalui hubungan filogenetik berupa kluster-kluster dengan keadaan geografis. Populasi hama yang berasal dari Trenggalek membentuk kluster tersendiri dan memisah dengan populasi hama lain. Secara keseluruhan keenam sampel berada pada cluster yang sama, walau bila diperhatikan dalam internal cluster memiliki keragaman. Dimana hama dari Trenggalek yang memiliki karakter wilayah yang berada di daerah perbukitan dan pesisir pantai selatan dengan tipe iklim tropis. Sedangkan hama dari daerah Malang Bondowoso dan Mojokerto diketahui ketiga daerah tersebut memiliki kemiripan karakter wilayah yang sebagian besar terletak dilembaran pegunungan yang dikelilingi pegunungan – pegunungan dengan tipe suhu dan beriklim muson tropis. Sedangkan hama dari Gresik dan Magetan memisah dengan sampel lain dengan kemiripan karakter wilayah yang sebagian besar daerah tersebut memiliki kondisi tanah yang tandus dan dekat dengan bantaran Telaga Sarangan serta bengawan Solo (perairan) dengan tipe iklim tropis.

Faktor lain yang mempengaruhi keragaman *internal cluster* pada hama walang sangit yaitu kondisi geografis yang berbeda sehingga menyebabkan kelimpahan dan persebaran hama berbeda-beda. Sehingga memperlihatkan terjadinya aliran gen hama walang sangit antar populasi di Jawa Timur.

Selain penanaman yang tidak serempak faktor lain yang mempengaruhi populasi dan persebaran hama walang sangit (*Leptocorisa oratorius*) yaitu kondisi geografis yang berbeda sehingga menyebabkan kelimpahan hama berbeda-beda. Letak geografis seperti ketinggian tempat dapat menimbulkan cuaca dan iklim yang berbeda pula sehingga dapat mempengaruhi aktivitas serangga (Syarkawi, 2015). Menurut (Shi et al, 2011) bahwa adanya keterkaitan yang erat antara kondisi geografis dengan suhu udara, hal ini dikarenakan suhu udara memiliki peranan penting dan merupakan faktor pembatas bagi kecepatan berlangsungnya proses metabolisme dan kelangsungan hidup serangga dalam aktivitasnya mencari makan serta proses perkembangannya.

Hal ini menegaskan bahwa aliran genetik dapat dipengaruhi oleh faktor isolasi geografis, isolasi geografis menyebabkan terbentuknya spesies baru dengan memisahkan populasi spesies asal menjadi beberapa populasi yang tidak saling berinteraksi dan tidak terjadi pertukaran gen antar populasi tersebut. Sehingga mengakibatkan perubahan yang terjadi di satu populasi akan terakumulasi sepanjang waktu dan akhirnya kedua populasi menjadi sangat berbeda sehingga terbentuk spesies baru yang tidak bisa saling bereproduksi lagi. Isolasi geografis atau pemisahan adalah cara umum untuk proses spesiasi dimulai. Isolasi ini dapat terjadi apabila adanya aliran sungai yang berubah, terbentuknya pegunungan, pemisahan benua akibat pergerakan lempeng tektonik, organisme yang bermigrasi, atau pembentukan pulau baru akibat aktivitas vulkanik (Laltanpuui et al., 2014)

Tabel jarak Genetik

Tabel 1. Tabel jarak genetik *Leptocoris oratorius* dengan outgroup

Spesimen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 A_L.Trenggalek												
2 B_L. Malang	0.0141											
3 C_L.Mojokerto	0.0141	0.0000										
4 D_L.Gresik	0.0190	0.0046	0.0046									
5 E_L.Bondowoso	0.0141	0.0000	0.0000	0.0046								
6 F_L.Magetan	0.0190	0.0046	0.0046	0.0000	0.0046							
7 <i>SCirpophaga incertulas</i>	1.7582	1.7582	1.7582	1.7077	1.7582	1.7077						
8 <i>SCirpophaga incertulas</i>	1.7662	1.7662	1.7662	1.7139	1.7662	1.7139	0.0093					
9 <i>Sogatella furcifera</i>	1.4101	1.3730	1.3730	1.3379	1.3730	1.3379	0.5948	0.5963				
10 <i>Nilaparvata lugens</i>	1.7547	1.7130	1.7130	1.6737	1.7130	1.6737	0.6037	0.5910	0.3788			
11 <i>Apis mellifera</i>	1.1672	1.1440	1.1440	1.1218	1.1440	1.1218	1.7009	1.7033	1.4370	1.5580		
12 <i>Nephotettix cincticeps</i>	1.3999	1.3314	1.3314	1.2997	1.3314	1.2997	0.4872	0.4765	0.4666	0.4872	1.5034	

Hasil analisis jarak genetik menunjukkan jarak genetik antara sampel hama menunjukkan nilai jarak genetik yang berbeda. Nilai jarak genetik terkecil terbentuk pada populasi hama Mojokerto-Malang, Bondowoso-Malang, Bondowoso-Mojokerto, dan Magetan-Gresik dengan nilai 0.0000 sedangkan jarak genetik terbesar antara populasi hama Gresik-Trenggalek dan Magetan-Trenggalek dengan nilai 0.0190. Perbedaan nilai jarak genetik tersebut menunjukkan tingkat similaritas antar sampel hama. Populasi yang berdekatan secara geografis memiliki nilai jarak genetik yang lebih rendah dibandingkan populasi yang jauh secara geografis.

Variasi genetik dipengaruhi oleh biogeografi atau pengaruh lingkungan. Dalam biogeografi ada beberapa faktor penghalang yang mempengaruhi persebaran organisme sebagai pengendali penyebarannya yaitu iklim dan toporafi. Avise (2009) menyebutkan karakteristik geografis dan genealogi saling berhubungan yang dapat mempengaruhi terbentuknya mikroevolusi. Mikroevolusi merupakan bentuk evolusi dalam skala kecil yang ditemukan berupa perubahan

dalam susunan genetik suatu populasi. Menurut Hebert *et al.* (2004) menjelaskan standart nilai jarak genetik lebih dari nilai 0.03 dapat dikatakan bahwa organisme tersebut memiliki jenis yang berbeda. Hal ini mendukung dengan nilai jarak genetik *Leptocoris oratorius* dengan *outgroup* memiliki jarak genetik sebesar 0.0093 - 1.7662 (Tabel 1).

KESIMPULAN

Sekuens gen COX2 sampel *Leptocoris oratorius* menunjukkan adanya variasi sekuen. Variasi ditunjukkan dengan adanya perbedaan 16 pasang basa nukleotida pada urutan sekuen sampel dilokasi yang berbeda. Dan rekontruksi pohon filogenetik yaitu sampel hama walang sangit daerah Malang, Mojokerto dan Bondowoso merupakan sampel yang paling berkerabat dekat yang berada pada satu internal klaster, Sedangkan Sampel Gresik dan Magetan memisah dengan sampel lain begitu juga dengan sampel (Trenggalek).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada segenap pembantu lapangan, asisten dan fasilitas di Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Universitas Negeri Malang dan Griya Sains Malang yang membantu kelancaran penelitian ini. Penelitian ini didanai oleh proyek DRPM Dikti Nomor : B/87/E3/RA.00/2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Avisé JC. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *J Biogeogr.* 36: 3-15.
- Corpet, F. (1998). Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. *NUCL. Acids res.* 16(22): 10881-10890.
- Dharmayanti, N.L.P.I. (2011). Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *WARTAZOA Vol. 21.*
- Hebert. P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard. (2009). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.*
- Hidayat T., Pancoro A. (2008). Kajian Filogenetika Molekuler dan peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgriBiogen.* 4.
- Hosamani V. (2009). Biological studies on paddy earhead bug, *Leptocoris oratorius fabricus* (Hemiptera:Alydidae). *Academic Journal of Entomology*, 2: (2).
- Kalshoven, L.G.E. (1981). *The Pests of Crops in Indonesia*: Jakarta.

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA 7.0 : Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets brief communication . *Molecular Biology and Evolution* , 33 (7) . 1870-1874.
- Laltanpuui. N., S. Kumar & M. T. Mathai. (2014). Molecular and Phylogenetic Analysis of the Genus *Orthetrum* (Odonata: Anisoptera: Libellulidae) using Mitochondrial COI gene. *Science Vision* 14: (3).
- Lim J, Kim M, Kim IK, Jung S, Lim JS, Park SY, Kim Km, Kim C, Byun BK, Lee BW, Lee S. (2013). Molecular identification and larval description of *Callipogon relictus* Semenov (Coleoptera: Cerambycidae), a natural monument of South Korea. *J Asia Pac Entomology*. 16: (223).
- Maftuchah, (2005). Analisis variasi genetik mangga menggunakan RAPD untuk perbaikan karakter kualitas buah. Laporan Penelitian Unggulan UMM.
- Mahardika IGNK & Parede L. (2008). Analisa filogenetik sekuen nukleotida bagian hipervariabel protein VP2 virus gumboro isolat Indonesia. *Veteriner*. 9: 60-64.
- Pracaya. (2009). Hama dan Penyakit Tanaman. *Edisi revisi*. Swadaya: Jakarta.
- Pratimi, A. & R.C.H. Soesilohadi. (2011). Fluktuasi population walang sangit *Leptocorisa oratorius* F. (Hemiptera: Alydidae) pada komunitas padi di Dusun Kepitu, Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. *BIOMA*, 13: (2).
- Ratnayani KIN. Wirajana & Laksmiwati. (2007). Analisis Variasi Nukleotida Daerah D-Loop DNA Mitokondria pada Satu Individu Suku Bali Normal. *Jurnal Kimia* 1: (1).
- Shi P, Zhong L, Sandhu HS, Ge F, Xu X, Chen W. (2011). Population decrease of *Scirpophaga incertulas* (Walker) (Lepidoptera Pyralidae) under climate warming. *Ecologi and Evolution* 2:58– 64.
- Syarkawi, Husni & M. Sayuthi. (2015). Pengaruh Tinggi Tempat Terhadap Tingkat Serangan Hama Penggerek Buah Kakao (*Conopomorpha Cramerella Snellen*) Di Kabupaten Pidie. *J. Floratek* 10 : 52-60. Universitas syiah kuala : Banda Aceh.
- Tjitrosoepomo, Gembong. (2009). Taksonomi Tumbuhan. UGM Press, Yogyakarta.