

OPTIMALISASI TEKNIK ISOLASI DNA DAN PEMILIHAN SAMPEL DAUN UNTUK ANALISIS MARKA MOLEKULER JAMBU METE

Tias Arlianti, Jajat Darajat, Oti Rostiana
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Email : misstias@yahoo.com

RINGKASAN

Jambu mete (*Anacardium occidentale* L) merupakan salah satu tanaman potensial sumber devisa negara. Peningkatan produktivitas jambu mete sampai saat ini masih dilakukan secara konvensional melalui seleksi populasi dan hibridisasi. Penggunaan marka molekuler dapat digunakan untuk mempercepat proses seleksi. Untuk dapat memperoleh marka molekuler yang akurat, diperlukan DNA berkualitas tinggi. Optimasi teknik isolasi DNA pada jambu mete telah dilakukan dengan menggunakan tiga fase pertumbuhan daun (pucuk, sedang, tua) pada kondisi segar dan kering serta perbaikan metode ekstraksi dengan cara homogenisasi sampel, memperhalus sampel dan memperpanjang waktu senrifugasi menjadi dua puluh menit. Daun sedang (daun ketiga dari pucuk) merupakan jenis sampel terbaik untuk isolasi DNA jambu mete.

Kata kunci : Molekuler jambu mete, kualitas DNA, sampel daun, isolasi DNA.

PENDAHULUAN

Kualitas DNA (*Deoxyribonucleic acid*) merupakan salah satu faktor penunjang keberhasilan dalam analisis marka molekuler. Semakin baik kualitas DNA sampel yang digunakan, maka hasil analisis akan semakin akurat. Tinggi rendahnya kualitas DNA ditentukan oleh tiga faktor utama, yaitu sumber sampel/materi genetik, teknik isolasi dan pemilihan reagent (pereaksi).

Isolasi DNA pada tanaman tingkat tinggi kerap kali mengalami hambatan pada proses destruksi dinding sel untuk melepaskan isi sel. Hal ini disebabkan tanaman tingkat tinggi memiliki struktur dinding sel yang kompak dan kuat. Pada beberapa tanaman, proses isolasi DNA menjadi semakin sulit karena kandungan polifenol ataupun polisakarida yang tinggi, seperti pada tanaman jambu mete.

Daun jambu mete mengandung dua metabolit utama, yaitu tanin dan senyawa fenol. Kandungan kimia lain yang terdapat pada daun jambu mete

adalah flavonol, asam anakardiol, asam elagat, kardol dan metal kardol (Sulistiyawati dan Mulyati, 2009). Metabolit yang terdapat didalam jaringan daun jambu mete kerap kali mengakibatkan DNA yang disolasi terkontaminasi sehingga tidak dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya. Kontaminasi protein, polifenol dan polisakarida menghambat aktivitas enzim Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase pada reaksi Polymerase Chain Reaction (PCR) (Ausubel et al 1994).

Tabel 1. Komposisi Buffer CTAB Doyle-Saghai

Larutan	Komposisi
Buffer CTAB modifikasi D Doyle-Saghai	4% CTAB 1,4 M NaCl 100 mM TrisHcl, PH 8 20 mM EDTA 2% PVp

Archak *et al.*, 2003

Beberapa metode isolasi DNA telah diaplikasikan pada berbagai jenis tanaman, termasuk untuk tanaman dengan kandungan polifenol tinggi. Metode tersebut tidak bersifat universal dan tidak semua DNA tanaman dapat diisolasi dengan hasil optimal (Varma dan Padh, 2007). Modifikasi teknik ekstraksi perlu dilakukan mulai dari pemilihan sampel, teknik isolasi ataupun pemilihan reagent (pereaksi) untuk memperoleh DNA jambu mete berkualitas baik. Menurut Hendroyo dan Rudiretna (2001) ada tiga prinsip dasar dalam isolasi DNA, yaitu penghancuran dinding sel, ekstraksi atau pemisahan DNA serta pemurnian DNA.

Tujuan penelitian adalah menentukan jenis sampel terbaik serta proses isolasi yang optimal untuk memperoleh kualitas DNA jambu mete terbaik.

ISOLASIDNA

Ekstraksi DNA jambu mete dilakukan dengan menggunakan metode CTAB Doyle-Saghai (Archak *et al.*, 2003) yang dimodifikasi. Modifikasi metode ekstraksi yang dilakukan adalah:

- Penambahan antioksidan PVP (Polivinilpolipirrolidon) sebanyak 1% pada saat penggerusan.

- Penambahan *Mercaptoethanol* 20 μ l pada saat proses ekstraksi daun.
- Penggunaan *chloroform*: *Isoamylalkohol* (24:1) sebanyak dua kali tanpa penggunaan *Phenolisoamylalkohol*.

Sampel yang digunakan berupa daun dari tiga fase pertumbuhan: daun pucuk, sedang (daun ketiga), tua (daun kelima) dalam kondisi segar dibekukan dan kering. Daun segar adalah daun yang dipetik, dimasukkan dalam plastik kedap udara dan disimpan dalam freezer

bersuhu -4°C , sedangkan daun kering diperoleh dengan proses pengeringan didalam oven 40°C selama sehari semalam.

Hasil Ekstraksi kemudian diukur nilai konsentrasi dan Optical Density (OD) menggunakan spektrofotometer. Pengukuran dilakukan dengan membandingkan standar DNA lambda dengan kuantifikasi spektrofotometrik pada panjang gelombang A260 dan A280 menurut metode Sambrook dan Russel (1989).

PENENTUAN SAMPEL DAUN TERBAIK UNTUK ISOLASIDNA

Berdasarkan pengukuran spektrofotometer, nilai OD DNA yang diperoleh berkisar antara 0,613 – 1,256 (Tabel 1). Nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8 -2,0. Jika nilai melebihi 2,0 maka larutan yang diuji masih mengandung kontaminan dari protein membran sehingga kadar DNA yang didapat belum murni.

Isolasi DNA Sampel Daun Pucuk

Penggunaan sampel daun pucuk memiliki potensi kontaminasi senyawa fenol lebih tinggi dari sampel daun

Tabel 1. Kualitas dan kuantitas DNA sampel daun jambu mete, segar dan kering pada fase

No	Sampel Daun	A260	A280	A260:A280	Konsentrasi DNA (ug/ul)	
1	SEGAR	Pucuk	0,019 ± 0,008	0,016 ± 0,008	1,252 ± 0,05	281,780 ± 34,69
2		Sedang	0,024 ± 0,017	0,019 ± 0,015	1,256 ± 0,072	59,152 ± 42,58
3		Tua	0,009 ± 0,005	0,014 ± 0,007	0,613 ± 0,11	22,422 ± 14,21
4	KERING	Pucuk	0,054 ± 0,045	0,067 ± 0,026	0,804 ± 0,36	134,385 ± 113,84
5		Sedang	0,278 ± 0,34	0,261 ± 0,313	1,003 ± 0,09	692,815 ± 424,97
6		Tua	0,072 ± 0,006	0,068 ± 0,008	1,072 ± 0,115	180,284 ± 16,193

sedang atau tua. Menurut Ariyani *et al.* (2007) daun jambu mete muda mengandung senyawa tanin, asam anakardat dan kardol yang lebih banyak dibandingkan dengan daun jambu mete yang sudah tua. Total fenol pada daun pucuk jambu mete berkisar 2809,5 mg/100 g berat kering (Rahmat, 2009). Kandungan fenol yang tinggi tersebut berpotensi mengotori dan mengurangi kualitas DNA. Namun, berdasarkan hasil yang diperoleh, kisaran nilai OD daun pucuk dan sedang (daun ketiga) tidak jauh berbeda. Hal ini karena penggunaan PVP pada saat proses penggerusan mampu mengikat fenol, sehingga kontaminasi fenol pada DNA terisolasi dapat dikurangi. PVP telah banyak digunakan sebagai pereaksi untuk mengisolasi DNA genom tanaman yang kaya polifenol seperti kapas (Chaudhry *et al.*, 1999), tebu, selada, dan stroberi (Aljanabi *et al.*, 1999), anggur, apel, pir, kesemek, serta beberapa conifer (Kim *et al.*, 1997).

Penggunaan daun pucuk sebagai materi ekstraksi DNA memiliki kelemahan meskipun kualitas DNA yang dihasilkan cukup tinggi. Sampel daun pucuk cenderung lebih mudah rusak, terutama apabila lokasi pengambilan sampel yang jauh. Daun seringkali sudah hancur dalam perjalanan menuju laboratorium, sehingga pada saat akan dilakukan ekstraksi, ada kemungkinan DNA di dalam sel sudah terdegradasi.

Isolasi DNA Sampel Daun sedang

Hasil isolasi DNA pada daun sedang (daun ketiga) baik dalam keadaan segar ataupun kering diperoleh nilai OD dan konsentrasi DNA yang lebih tinggi dari perlakuan lain (Tabel 1). Penggunaan daun sedang sebagai sampel memiliki beberapa keunggulan yaitu: tidak mudah rusak, lebih mudah dihaluskan, lebih tahan disimpan dan DNA yang dihasilkan lebih bersih. Dengan menggunakan daun sedang sebagai sampel dapat dilakukan

beberapa kali isolasi dengan satu kali pengambilan sampel, dengan demikian menghemat biaya serta waktu perjalanan saat pengambilan sampel daun.

Isolasi Daun Tua

Hasil isolasi DNA pada daun tua diperoleh DNA dengan kualitas terendah. Hal ini disebabkan antara lain karena daun tua cenderung lebih keras dan liat, sehingga pada saat proses ekstraksi sulit diperoleh bubuk daun yang halus. Nilai OD daun tua berkisar antara 0,6–1, dimana nilai tersebut mengindikasikan kandungan protein dan polisakarida yang cukup tinggi. Polisakarida merupakan rantai panjang dari monosakarida (gula sederhana) sementara protein adalah polimer dari asam amino (Robinson, 1995). Menurut Harborne (1996), protein, polisakarida dan asam amino merupakan tiga kelompok makromolekul utama pada tumbuhan dan memiliki struktur yang rumit sehingga pada saat isolasi seringkali terurai atau membentuk senyawa lain. Isolasi asam nukleat (DNA) sukar diperoleh dalam bentuk murni karena berikatan erat dengan protein histon dalam inti (Harborne, 1996). Kontaminasi protein, polifenol dan polisakarida pada hasil isolasi DNA dapat menghambat aktivitas enzim seperti enzim restriksi (dalam aplikasi blotting) ataupun aktivitas taq polimerase dalam reaksi PCR (Ausabel *et al.* 1994). Secara umum, penggunaan sampel segar yang disimpan dalam freezer memperlihatkan hasil yang lebih baik daripada sampel kering. Untuk keperluan jangka panjang, penggunaan sampel segar beku lebih ideal digunakan, karena lebih mudah, kondisi penyimpanan lebih stabil dan kualitas hasil isolasi tinggi. Penelitian Matasyoh *et al.* (2008) dan Sari *et al.* (2009) menunjukkan hasil kualitas DNA *Capsicum gratissimum* L yang lebih baik dengan menggunakan sampel daun beku. Penyimpanan daun segar dalam freezer mengakibatkan

pembekuan jaringan tanaman, sehingga mencegah terjadinya degradasi DNA yang dapat menurunkan kualitas DNA. Penggunaan daun kering secara teknis memudahkan pekerjaan ekstraksi (menggerus) namun memiliki potensi kerusakan jaringan tanaman lebih besar jika proses pengeringan dan penyimpanan tidak dilakukan dengan baik. Pengeringan harus dilakukan secepatnya setelah pengambilan sampel, kondisi lembab akan mengakibatkan oksidasi pada jaringan tanaman dan mengakibatkan penurunan kualitas DNA. Proses pengeringan menyebabkan terjadinya kerusakan isi sel yang berujung pada peristiwa fragmentasi DNA dan menyebabkan konsentrasi DNA yang dihasilkan tidak akan lebih banyak dibandingkan dengan yang dihasilkan dari bahan segar (Topik dan Wulan, 2001)

PERBAIKAN PROSES ISOLASI DNA

Untuk meningkatkan kualitas DNA jambu mete, maka dilakukan perbaikan proses ekstraksi dengan menggunakan materi sampel terbaik, yaitu daun sedang segar. Perbaikan proses ekstraksi yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- Homogenisasi sampel dengan cara mencampur beberapa daun dari setiap nomor aksesori (setiap 0,4 mg sampel yang digunakan merupakan campuran beberapa daun dari setiap nomor aksesori). Sampel kemudian digerus dengan kuat sampai menjadi serbuk
- Pencampuran larutan pereaksi dengan sampel secara intensif dan kuat, dengan cara menggoyangkan mikrotube sampai serbuk sampel bercampur rata.
- Memperpanjang durasi pemisahan DNA dengan kotoran (sentrifugasi) dari 10 menit menjadi 20 menit

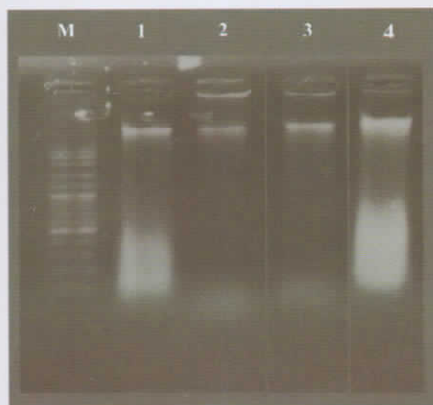
Isolasi DNA dengan perbaikan proses ekstraksi dilakukan pada empat sampel Jambu Mete. Hasil pengukuran spektrofotometer menunjukkan nilai perbandingan OD value 260/280 meningkat menjadi 1,875 (Tabel 2)

Nilai kualitas DNA yang diperoleh termasuk dalam kisaran tingkat kemurnian yang baik, sesuai dengan pernyataan Sambrook dan Russell (2001) bahwa tingkat kemurnian DNA yang baik berkisar antara 1,8-2. Nilai OD di atas nilai kisaran murni menunjukkan kontaminasi RNA sementara rasio di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi protein.

Tabel 2. Kualitas dan kuantitas DNA sampel daun sedang (daun ketiga) dengan perbaikan proses ekstraksi

NO	Kode SAMPEL	A260:A280	KONSENTRASI DNA
1	Ende	1,7	6108
2	Muna Tangkuno	2,0	8898
3	PK-36	1,9	3509
4	N-8	1,9	3371
	Rata-rata	1,875	5471

Kualitas DNA hasil isolasi juga dapat dilihat dari visualisasi elektroforesis. DNA yang baik dan tidak terdegradasi pada hasil elektroforesis menampilkan pola pita yang jelas (Herison et al., 2003). Berdasarkan hasil elektroforesis tampak pita tunggal DNA yang dihasilkan jelas dan tebal (Gambar 1). Hal ini menandakan bahwa DNA hasil isolasi memiliki kualitas yang baik, karena tidak terlihat pita DNA yang terdegradasi. Pada sampel Muna Tangkuno dan PK-36 (no 2 dan 3), pita tunggal DNA yang dihasilkan tampak sangat jelas dan bersih. Sementara pada Ende dan Nigeria 8 (1 dan 4) tampak sedikit kemungkinan bayangan/kontaminasi RNA. Menurut Sauer et al. (1998) kontaminasi RNA dapat dideteksi dengan terbentuknya pola bayangan smear di bawah pita DNA. Kontaminasi RNA dapat dihilangkan dengan pemberian RNase.



Gambar 1. Pola pita DNA Jambu Mete hasil elektroforesis dengan gel agarose 0,8% menggunakan sampel daun sedang/daun ketiga dengan perbaikan proses ekstraksi. (M = Ladder 100 bp, 1 = Ende, 2 = Muna Tangkuno, 3 = PK-36, 4 = Nigeria-8)

Perbaikan proses ekstraksi dengan cara homogenisasi sampel dari beberapa daun, memperhalus partikel dan memperpanjang waktu sentrifugasi memberikan hasil nyata terhadap peningkatan nilai OD. Homogenisasi jaringan adalah pemecahan sel secara halus yang bertujuan meningkatkan

jumlah sel atau permukaan area yang akan dilisiskan. Homogenisasi sangat menunjang keberhasilan isolasi DNA dari organ atau jaringan. Semakin homogen jaringan tanaman yang digunakan sebagai sampel maka akan semakin banyak jumlah sel yang dapat dilisis. Selain itu semakin besar kontak antara sel dan bufer lisis sehingga kemungkinan DNA yang diperoleh akan lebih banyak dengan nilai OD yang optimal. Pada dasarnya ada tiga faktor penentu agar ekstraksi dan purifikasi (pemurnian) DNA berjalan optimal, yaitu: (1) Penghomogenan jaringan tanaman, (2) Komposisi penambahan larutan buffer pada saat penggerusan daun/jaringan tanaman, dan (3) Penghilangan enzim penghambat polisakarida, khususnya pada tanaman tahunan (Syafaruddin et al., 2011).

PENUTUP

Jenis sampel terbaik untuk isolasi DNA jambu mete adalah daun fase pertumbuhan sedang (daun ketiga) dalam bentuk segar. Teknik isolasi terbaik adalah dengan proses homogenisasi dimana sampel yang digunakan merupakan campuran beberapa daun pada aksesori sama yang kemudian digerus dengan kuat hingga menjadi serbuk, mengintensifkan proses pencampuran larutan buffer dengan sampel dan memperpanjang durasi pemisahan DNA dengan kotoran (sentrifugasi) menjadi dua puluh menit.

DAFTAR PUSTAKA

- Aljanabi SM, Forget L, Dookun A. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Mol Biol. Rep.* 17: 1-8.
- Archak S, Gaikwad AB, Gautum D, Rao EVVB, Swamy KRM, Karihaloo JL, 2003. DNA fingerprinting of Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using RAPD and ISSR techniques. *Euphytica* 230:397-404.

Ariyani M, Kusumaningsih T, Rahardjo MB 2007. "Daya Hambat Ekstrak Daun Jambu Mete (*Anacardium Occidentale*, L) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus sanguis*". *Jurnal PDGI* Vol 57 (02): 45-51. Surabaya: FKG Universitas Airlangga.

Ausabel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley Interscience.

Chaudhry B, Yasmeen A, Husnain T, Riazuddin S. 1999. Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. *Plant Mol Biol Rep.* 17: 1-7.

Harborne JB. 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern menganalisis tumbuhan*. Penerbit ITB. 354 hal.

Hendroyo D, Rudiretna A. 2001. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) (General Principle and Implementation of Polymerase Chain Reaction)*.

Herison C, Rustikawati, Eliyanti. 2003. Penentuan Protokol yang Tepat untuk Menyiapkan DNA Genom Cabai (*Capsicum* sp). *Jurnal Akta Agrosia* 6 (2): 38-43.

Kim CS, Lee CH, Shin JS, Chung YS, Hyung NI. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Res.* 25: 1085-1086.

Matasyoh GL, Wachira NF, Kinyua GM, Thairu Muigai WA, Mukiyama KT. 2008. Leaf storage conditions and genomic DNA isolation efficiency in *Ocimum gratissimum* L from Kenya. *African Journal of Biotechnology* 7(5): 557-564

Rahmat H. 2009. *Identifikasi Senyawa Flavanoid pada Sayuran Indigenous Jawa Barat*. Unpublished. Fakultas Teknologi Pertanian. IPB. Bogor

Robinson T. 1995. *Kandungan organik tumbuhan tinggi*. Penerbit ITB. 367 hal.

Sambrook J, Russel DW. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Vol: 2nd ed. Cold Spring Harbor Labory Press, New York: XXXVIII+5,3 i-69 hal.

Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* Vol: 1-3. 3rd ed. Cold Spring Harbor Labory Press, New York: XXVII+i.i-794 hal.

Sambrook J, Russel DW. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Sari SK, Muthia NM, Dwi L, Eko SS, 2009. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA pada daun Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* CV. Cakra Hijau) menggunakan genomic DNA mini kit (plant) Geneaid. Seminar Nasional XI Pendidikan Biologi FKIP UNS. Hal 65-69.
- Sauer P, Muller M, Kang J. 1998. Quantitation of DNA. *Qiagen News* 2: 23-26.
- Sulistiyawati D, Mulyati S. 2009. "Uji Aktivitas Antijamur Infusa Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*, l) Terhadap *Candida albicans*. Fakultas Biologi, Universitas Setia Budi. Surakarta
- Surzycki S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. New York.
- Syafaruddin, Santoso TJ. 2011. Efektivitas dan Efisiensi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA pada Jambu Mete. *Buletin Penelitian Tanaman Industri*. 2(2): 151-160.
- Syafaruddin, Randriani E, Santoso TJ. 2011. Optimasi teknik isolasi purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Air Shaw). *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 2(2): 151-160.
- Topik H, Wulan AR. 2001. Isolasi DNA dari Bahan Herbarium Bandung. Lembaga Penelitian UPI (Universitas Pendidikan Indonesia).
- Varma AH, Padh N. 2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journal*. 2:386-392.

Sambungan hal. 08

PENUTUP

Pemanfaatan agensia hayati khususnya patogen serangga seperti *B. bassiana* dan *M. anisopliae* belum banyak dimanfaatkan dalam skala luas walaupun penggunaan jamur patogen yang sudah banyak diuji memberikan hasil yang baik untuk mengendalikan hama wereng batang cokelat (WBC). Hasi uji pemanfaatan jamur entomopatogen dapat digunakan sebagai alternatif pengendali yang ramah lingkungan terhadap WBC. Oleh karena itu, perlu uji lebih lanjut tingkat patogenesitas jamur entomopatogen strain daerah endemi WBC di lapang.

DAFTAR PUSTAKA

- Baehaki S E. 1987. Dinamika populasi wereng cokelat, *Nilaparvata lugens* Stall. dalam : wereng cokelat. Balai Penelitian Tanaman Pangan Bogor. Edisi Khusus I:16-30.
- Koswanudin D, Wahyono TE. 2014. Keefektifan bioinsektisida *Beauveria bassiana* terhadap hama wereng batang cokelat (*Nilaparvata lugens*), walang sangit (*Leptocorisa oratorius*), pengisap polong (*Nezara viridula*) dan (*Riptortus linearis*). Prosiding Seminar Nasional Pertanian Organik. Bogor 18-19 Juni 2015. hlm. 415-420.
- Manurung EM, Tobing MC, Lubis L, Priwiratama. 2012. Efikasi beberapa formulasi *Metarhizium anisopliae* terhadap larva *Oryctes rhinoceros* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) di Insektarium. *Jurnal Agroekoteknologi*. (1): 47-60.
- Mochida O. 1978. Brown Planthopper "Hama Wereng" Problems on Rice Indonesia. Cooperative CRIA - IRRI Program Sukamandi, West Java, Indonesia. 70 hlm.
- Prayogo, Tengkan Y.W, Marwoto. 2005. Prospek cendawan entomopatogen *Metarhizium anisopliae* untuk mengendalikan ulat grayak *Spodoptera litura* pada kedelai. *Jurnal Litbang Pertanian*. 24(1):20-23.
- Soetopo D, Indrayani IGAA. 2007. Status teknologi dan prospek *Beauveria bassiana* untuk pengendalian serangga hama tanaman perkebunan yang ramah lingkungan. *Perspektif* 6(1): 29-46.
- Susanti U, Salbiah D, Loah JH. 2013. Uji beberapa konsentrasi *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin untuk mengendalikan hama kepik hijau (*Nezara viridula* L.) pada kacang panjang (*Vigna sinensis* L.). *Jurnal Universitas Riau*.
- Tampubolon DY, Pangestiningih Y, Zahra F, Manik F. 2013. Uji patogenisitas *Bacillus thuringiensis* dan *Metarhizium anisopliae* terhadap mortalitas *Spodoptera litura* Fabr (Lepidoptera: Noctuidae) di laboratorium. *Jurnal Online Agroekoteknologi*. 1(3):784-791.
- Tirtowirjono S, Sahi I, Ade S. 1987. Evaluasi beberapa galur harapan padi pertanaman cadangan strategis tahan wereng cokelat. Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Balai Penelitian Tanaman Pangan Bogor. hlm 18-25.
- Wahyono TE, Wiratno. 2014. Bio insektisida *Beauveria bassiana* produk komersil yang berdaya saing tinggi dan ramah lingkungan. Prinsip-prinsip dan teknologi pertanian organik. Badan Litbang Pertanian. 2014. hlm. 83-87.
- Yuningsih, Widyaningrum T. 2014. Uji patogenitas spora jamur *Metarhizium anisopliae* terhadap mortalitas larva *Oryctes rhinoceros* sebagai bahan ajar Biologi SMA Kelas X. *JUPEMASI-PBIO*. 1(1):53-59.