

Variasi Genetik *Attacus atlas* L. (Lepidoptera: Saturniidae) Berdasar Penanda Molekuler ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

AURONITA PUSPA PRATIWI
Poltekkes Kemenkes Pangkalpinang
Jl. Pulau Bangka Kelurahan Air Itam Pangkalpinang 33148
email: auronitapuspa@gmail.com

ABSTRACT

Attacus atlas is one of potent silk-producing insect and possesses a significant economic value. *A. atlas* is part of genus *Attacus* which inhabits in several quite large areas. *A. atlas* can be found in Sumatera, Java, Borneo, Halmahera Islands, and Papua. Mostly, species which inhabits in wide spread area, has a high level of diversity. Applied studies on *Antheraea* dan *Samia cynthia ricini* showed that geographical differences led to genetic variations occurred upon those species. The aim of this research was to study and analyze the genetic variation *A. Atlas*, which is obtained from multiple sampling locations, ie Berbah, Dlingo, Ngawen, and Pracimantoro, based on ISSR marker. Analysis of genetic variation performed with 4 ISSR primer, ISSR1, ISSR2, ISSR6, and ISSR7 gave forth high genetic variations among individuals of *A. atlas* by indicating the average polymorphic percentage of all primer of 97,78%. Clustering analysis with unweighted pair group with arithmetic average (UPGMA) method resulted dendrogram that exhibiting similarity values among individuals in range between 61% - 87% and clustered into two main clusters at 61% similarity value. The first cluster consists of samples taken from from Dlingo, Ngawen and Pracimantoro which has elevation above 200 m asl, while the second cluster consists of samples originating from Berbah which has elevation below 200 m asl. Amplification used 4 ISSR primer performed 2 monomorphic loci and 82 polymorphic loci. Monomorphic at 300 bp showed by ISSR2 and at 1800 bp showed by ISSR7 may be a candidate locus identifier species of *A. atlas*.

Keywords: *Attacus atlas*, genetic variation, PCR-ISSR

PENDAHULUAN

Attacus atlas adalah salah satu serangga penghasil sutera. Keunggulan *A. atlas* adalah mampu menghasilkan benang sutera yang lebih panjang dibandingkan *Bombyx mori*, karena ukuran kokonnya yang lebih besar. Selain itu, benang sutera yang dihasilkan memiliki warna alami yang bervariasi, mulai dari cokelat muda, cokelat tua, cokelat keemasan hingga keabu-abuan. Serat sutera yang dihasilkan *A. atlas* memiliki nilai ekonomi yang lebih tinggi daripada serat sutera yang dihasilkan *B. mori* (Solihin dan Fuah, 2010). Oleh sebab itu, *A. atlas* memiliki prospek untuk budidaya dan produksi sutera

A. atlas memiliki daerah penyebaran yang luas. Daerah penyebaran utamanya antara lain di Asia Tenggara, Taiwan dan Papua New Guinea. Di Indonesia, populasi genus *Attacus* tersebar di Jawa, Bali, Sumatera, Kalimantan, pulau-pulau Halmahera, dan Papua (Peigler,

1989). Umumnya, spesies yang terdistribusi luas memiliki diversitas genetik yang tinggi. Populasi berbeda, terutama pada lokasi yang berlainan, memiliki tingkat variasi yang berbeda. Perbedaan tersebut dihasilkan dari proses-proses seleksi, *genetic drift*, mutasi, dan migrasi, yang menyebabkan adanya variasi genotip maupun fenotip yang diperlihatkan oleh individu dalam populasi maupun antar populasi. Perbedaan variasi dapat dilihat dari karakter morfologis sampai ke karakter molekular antara lain urutan DNA, asam amino dan protein (Anggreini, 1998; Frankham, *et.al.*, 2002).

A. atlas termasuk serangga yang memiliki beberapa generasi dalam setahun (polivoltin) (Solihin dan Fuah, 2010), dan termasuk serangga polifagus yang dapat hidup pada 90 jenis tumbuhan dari 48 famili yang bisa dimakan oleh larva *A. atlas*. Tanaman yang biasa dimakan larva *A. atlas* antara lain keben

(*Barringtonia asiatica*), sirsak (*Annona muricata*), mahoni (*Sweetenia mahogani*) Senggugu (*Clerodendron serratum*), dan sebagainya (Peigler, 1989). Keberadaan larva serangga polifagus pada jenis tanaman pakan yang spesifik dapat menunjukkan adanya suatu mekanisme dalam terbentuknya variasi genetik (Chew dan Robbins, 1984 dalam Gardjito, 2000).

Penelitian *A. atlas* yang telah dilakukan di Indonesia antara lain mengenai daur hidup, jenis pakan dan pemeliharaan di lapang maupun di laboratorium (Zebua *et.al.*, 1997; Romulo, 1997; Subagyo, 2000), kualitas serat sutera (Bangun, 2001; Indrawan, 2007; Baskoro, 2008), sementara studi molekuler untuk mengetahui variasi genetik *A. atlas* dengan menggunakan penanda molekuler ISSR belum pernah dilakukan. Penanda molekuler ISSR termasuk PCR-based marker, yang tidak memerlukan informasi tentang sekuen genom yang akan diuji (Bardakci, 2001). ISSR memiliki kemampuan mendeteksi

polimorfisme tinggi, dan diketahui potensial untuk mendeteksi variasi antar populasi yang terpisah secara geografis, juga variasi individu di dalam populasi (Luque, *et.al.*, 2002; Vijayan, *et.al.*, 2006).

Analisis variasi genetik berperan mendukung identifikasi dan karakterisasi spesies. Identifikasi spesies serangga yang tepat adalah langkah awal dalam mempelajari serangga dan merupakan salah satu hal penting, baik untuk penelitian dasar maupun terapan (Situmorang, 1998). Oleh karena itu, penelitian mengenai variasi genetik *A. atlas* menggunakan penanda molekuler ISSR ini perlu dilakukan.

METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah jaringan otot imago *A.atlas* yang diperoleh dari 4 lokasi dan 3 tanaman inang (*host*). Kode dan lokasi pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian dicantumkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Sampel *A. atlas* yang digunakan dalam penelitian

Kode Sampel	Tanaman Inang	Lokasi Sampling
DM1	Mahoni	Dlingo, Bantul
DM2	Mahoni	7°51'27,1" – 7°51'50,8 LS
DM3	Mahoni	110°28'17,9" – 110°29'02,3 BT
DM4	Mahoni	303 – 414 mdpl
NM1	Mahoni	Ngawen, Gunung Kidul
NM2	Mahoni	7°51'27,1" – 7°51'50,8 LS
NM3	Mahoni	110°28'17,9" – 110°29'02,3 BT
NM4	Mahoni	224 – 282mdpl
WM	Mahoni	Pracimantoro, Wonogiri
WS	Sirsak	8°05'33,9" – 8°05'51,9 LS
		110°49'58,5" – 110°50'03,4 BT
		265 – 279 mdpl
BM1	Mahoni	Berbah, Sleman
BM2	Mahoni	7°47'28,6" – 7°48'29,0 LS
BM3	Mahoni	110°27'07,6" – 110°27'56,8 BT
BS1	Senggugu	107 – 125 mdpl
BS2	Senggugu	
BS3	Senggugu	
BR1	Sirsak	
BR2	Sirsak	
BR3	Sirsak	

Ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan mengacu pada petunjuk penggunaan

GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit
®Fermentas.

Amplifikasi dengan Primer ISSR. Amplifikasi DNA dengan primer ISSR dilakukan menggunakan DreamTaq *Master Mix* Fermentas. Primer ISSR yang digunakan

tersaji pada Tabel 2. Pemilihan primer didasarkan pada hasil optimasi yang menunjukkan polimorfisme yang relatif tinggi dan pita hasil amplifikasi yang jelas.

Tabel 2. Primer yang digunakan untuk deteksi polimorfisme populasi *A. atlas*

No	Primer	Suhu Annealing	Sekuens 5'-3'
1.	ISSR1(807)	40,2	AGAGAGAGAGAGAGAGT
2.	ISSR2(809)	50,0	AGAGAGAGAGAGAGAGG
3.	ISSR6(826)	52,3	ACACACACACACACACC
4.	ISSR7(880)	41,8	GGAGAGGAGAGGAGA

Tabel 3. Komposisi Reaksi PCR

Komponen	Konsentrasi Akhir	Volume
DreamTaq™ green PCR <i>Master Mix</i> 2x	1x	12,5 µl
Primer ISSR	10 pmol/µl	1,5 µl
DNA <i>template</i>	0,1-1 ng/ µl	1 µl
<i>Water nuclease free</i>		10 µl
Total		25 l

Komposisi reaksi yang digunakan dalam setiap proses PCR mengacu pada protokol kit PCR ®Fermentas dengan rincian seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3.

Tahapan proses yang diatur untuk setiap reaksi PCR adalah sebagai berikut: *Initial denaturation* 94°C selama 2 menit, *Denaturation* 94°C selama 30 detik, *Annealing* selama 1 menit (suhu sesuai masing-masing primer), *Extention* 72°C selama 2 menit, *Final extention* 72°C selama 7 menit. *Denaturation*, *Annealing* dan *Extention* dilakukan sebanyak 35 siklus.

Pita DNA hasil amplifikasi dikonversi menjadi data biner dengan melakukan *scoring* pita DNA yang muncul, yaitu nilai 1 jika ada pita DNA dan nilai 0 jika tidak ada pita DNA. Analisis kelompok dan pembuatan dendogram

dilakukan dengan metode *unweighted pair group with arithmetic average* (UPGMA), menggunakan *software* NTSYS pc (*Numerical Taxonomy and Multivariate System*) versi 2.1.

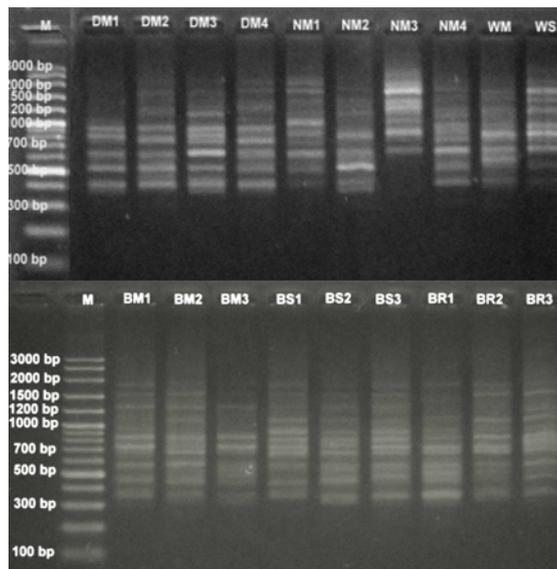
HASIL

Analisis Hasil Amplifikasi PCR ISSR.

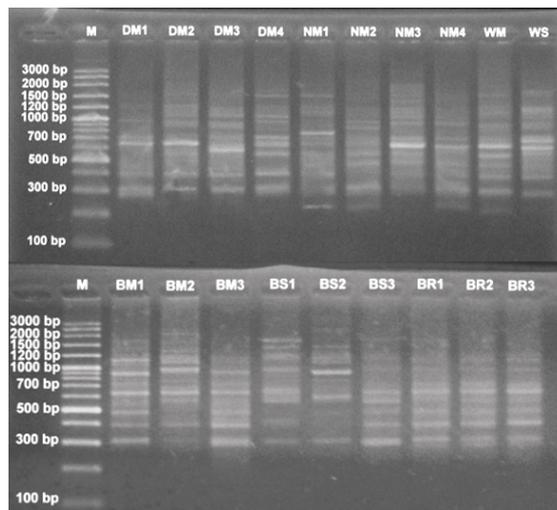
Berdasarkan elektroforesis hasil amplifikasi PCR menggunakan primer ISSR1, ISSR2, ISSR6, dan ISSR7 menghasilkan 84 lokus DNA dan 82 diantaranya merupakan lokus polimorfik (Tabel 4). Elektroferogram hasil amplifikasi ditunjukkan pada Gambar 1, 2, 3, dan 4. Berdasarkan hasil amplifikasi dan perhitungan persentase polimorfik tiap primer diketahui bahwa dua dari empat primer yang digunakan, yaitu primer ISSR1 dan ISSR6 menghasilkan 100% lokus polimorfik.

Tabel 4. Persentase Lokus Polimorfik Hasil Amplifikasi Seluruh Sampel pada Setiap Primer

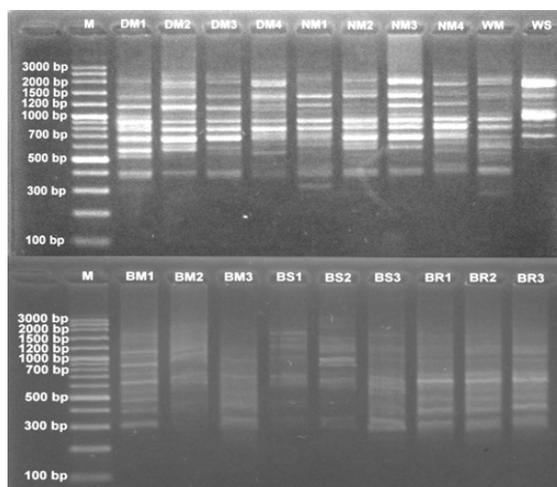
Primer	Lokus Polimorfik	Lokus Monomorfik	Persentase Polimorfik
ISSR1	19	0	100%
ISSR 2	20	1	95,65%
ISSR 6	22	0	100%
ISSR 7	21	1	95,45%
Total	82	2	



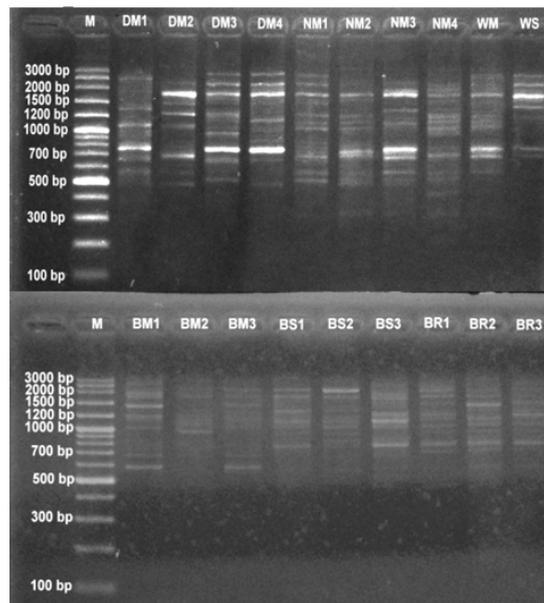
Gambar 1. Elektroferogram Hasil Amplifikasi DNA *A.atlas* dengan primer ISSR1. Keterangan M = marker



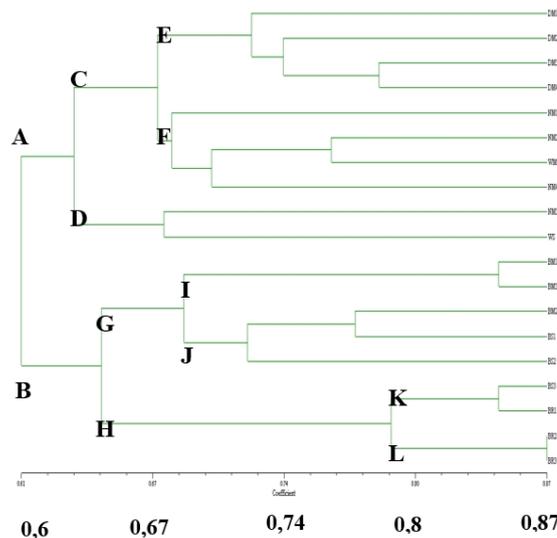
Gambar 2. Elektroferogram Hasil Amplifikasi DNA *A.atlas* dengan primer ISSR2. Keterangan M = marker



Gambar 3. Elektroferogram Hasil Amplifikasi DNA *A.atlas* dengan primer ISSR6. Keterangan M = marker



Gambar 4. Elektrogram Hasil Amplifikasi DNA *A.atlas* dengan primer ISSR7. Keterangan M = marker



Gambar 5. Dendrogram Koefisien Similaritas Genetik 19 Sampel *A. atlas*

Amplifikasi seluruh sampel (DM, NM, WM, WS, BM, BS, dan BR) dengan primer ISSR1 menghasilkan 19 lokus dengan ukuran pita DNA berkisar 375-2300 bp. Semua lokus yang terdeteksi merupakan lokus polimorfik (Gambar 1). Amplifikasi DNA seluruh sampel dengan primer ISSR2 menghasilkan 21 lokus DNA dengan ukuran pita DNA berkisar 225-2500 bp, yang terdiri dari 20 lokus DNA polimorfik dan 1 lokus DNA monomorfik pada ukuran DNA 300 bp (Gambar 2). Amplifikasi seluruh sampel dengan ISSR6 menghasilkan

22 lokus DNA yang semuanya polimorfik dengan ukuran pita berkisar 275-2500 bp. Hasil yang diperoleh menunjukkan pita DNA spesifik pada ukuran 500 bp yang hanya muncul pada sampel-sampel BR (sampel yang berasal dari Berbah dengan pakan/ *hostplant* sirsak) (Gambar 3). Amplifikasi seluruh sampel dengan primer ISSR7 menghasilkan 22 Lokus DNA dengan ukuran pita berkisar 300-2700 bp, yang terdiri dari 21 lokus DNA polimorfik dan 1 lokus DNA monomorfik pada ukuran DNA 1800 bp (Gambar 4).

Analisis Variasi Genetik *A.atlas*.

Dendrogram menunjukkan bahwa individu *A. atlas* mengelompok membentuk dua kluster utama yaitu A dan B pada koefisien similaritas 0,61 (kesamaan 61%). (Gambar 5). Kluster A terdiri atas semua sampel yang berasal dari Dlingo, Ngawen dan Pracimantoro, sedangkan kluster B terdiri atas semua sampel yang berasal dari Berbah. Pada koefisien 0,63 (kesamaan 63%), kluster A kemudian terbagi menjadi kluster C yang terdiri atas sampel DM1, DM2, DM3, DM4, NM1, NM2, NM4, dan WM serta kluster D yang terdiri atas sampel NM3 dan WS. Kluster C terbagi menjadi kluster E dan F pada koefisien similaritas 0,67 (67%). Kluster E terdiri atas semua sampel yang berasal dari Dlingo, sedangkan kluster F yang terdiri dari sampel Ngawen (NM1, NM2, dan NM4) dan Pracimantoro (WM) dengan similaritas yang berbeda-beda. Kluster B terbagi menjadi kluster G dan H pada koefisien similaritas 0,65 (65%). Pada koefisien similaritas 0,69 (69%), kluster G terbagi menjadi kluster I yang terdiri atas sampel BM1 dan BM3, serta kluster J yang terdiri dari sampel BM2, BS1 dan BS2. Sampel BM2 memiliki similaritas yang lebih dekat dengan sampel BS1, dan keduanya memiliki similaritas yang lebih dekat dengan sampel BS2. Pada kluster H terbentuk dua kluster pada koefisien similaritas 0,79 (79%), yaitu kluster K yang terdiri atas sampel BS3 dan BR1, serta kluster L yang terdiri atas sampel BR2 dan BR3.

PEMBAHASAN

Analisis Hasil Amplifikasi PCR ISSR.

Penanda molekuler ISSR merupakan metode sederhana dengan kemampuan mendeteksi polimorfisme tinggi, dapat dipercaya serta sensitif untuk membedakan individu yang berkerabat dekat (Reddy, *et.al.*, 1999). Amplifikasi dengan primer ISSR hanya terjadi jika dua mikrosatelit, sekuen berulang yang sama, dalam orientasi terbalik, berlokasi cukup dekat satu sama lain sehingga memungkinkan sekuen diantaranya untuk teramplifikasi (Pharmawati, 2009). Pita DNA yang terbentuk dianggap sebagai satu karakter yang mewakili satu lokus DNA. Pita-pita DNA dengan ukuran

yang sama dianggap sebagai satu lokus (Agisimanto *et.al.*, 2007). Berdasarkan elektroforesis hasil amplifikasi PCR menggunakan primer ISSR1, ISSR2, ISSR6, dan ISSR7 menghasilkan 84 lokus DNA dan 82 diantaranya merupakan lokus polimorfik. Berdasarkan hasil amplifikasi dan perhitungan persentase polimorfik tiap primer diketahui bahwa dua dari empat primer yang digunakan, yaitu primer ISSR1 dan ISSR6 menghasilkan 100% lokus polimorfik. Hal ini menunjukkan kedua primer tersebut lebih mampu menunjukkan variasi genetik antar individu *A.atlas*, dibandingkan dua primer ISSR lainnya (primer ISSR2 dan ISSR7).

Rata-rata persentase lokus polimorfik yang dihasilkan primer yang digunakan adalah 97,78%, yang menunjukkan tingginya variasi genetik *A.atlas* berdasarkan analisis dengan penanda ISSR. Nilai tersebut lebih tinggi dibandingkan persentase polimorfik pada penelitian variasi genetik *Samia cynthia-ricini* (Vijayan, 2006) dengan primer yang sama, yaitu 65,83%. Jumlah lokus polimorfik dalam analisis variasi genetik menentukan tingkat variasi genetik suatu populasi (Nuryani, 2003). Semakin tinggi jumlah lokus polimorfik maka tingkat variasi genetik di antara individu-individu juga akan semakin tinggi.

Perbedaan tersebut dapat terjadi karena adanya perbedaan urutan nukleotida pada masing-masing individu. Perbedaan urutan nukleotida dapat disebabkan delesi dan atau insersi pada perlekatan primer yang mengakibatkan daerah perlekatan primer terlalu jauh untuk menyokong amplifikasi, serta insersi dan delesi yang mengubah produk amplifikasi (Haymer, 1995).

Lokus monomorfik pada 300 bp yang dihasilkan ISSR2 dan pada 1800 bp yang dihasilkan ISSR7 dapat menjadi kandidat lokus penciri spesies *A. atlas*. Sementara, adanya pita DNA spesifik yang hanya dimiliki oleh sampel tertentu merupakan penunjuk keunikan karakter genetik individu tersebut dibandingkan individu lainnya. Thomas (1992) menyatakan bahwa setiap individu dari spesies yang mengalami perkawinan bukan saudara (*outbreeding*) akan memiliki keunikan pengacakan gen dan kombinasi alel yang

terjadi pada proses reproduksi seksual yang akan diturunkan hingga keturunan selanjutnya. Keunikan ini dapat mengindikasikan sebab awal terjadinya spesiasi simpatrik. Thibert-Plante (2011) menyatakan bahwa pemilihan pasangan, kompetisi, dan keragaman sumber daya yang tersedia merupakan faktor kunci yang mempengaruhi bagaimana suatu spesies berevolusi menjadi spesies yang terpisah dalam proses spesiasi simpatrik. Kondisi pada *A. atlas* yang membutuhkan kesesuaian feromon betina dan jantan untuk terjadinya proses kawin serta memiliki keragaman tanaman pakan mungkin sesuai dengan konsep tersebut, sehingga keunikan yang terdeteksi melalui penanda ISSR mungkin menunjukkan perubahan genetik yang terjadi, yang bisa jadi akan mengarah pada spesiasi.

Analisis Variasi Genetik *A.atlas*. Pola pengelompokan yang terbentuk cenderung berdasarkan geografis, seperti yang tampak pada pengelompokan antara klaster A dan klaster B. Daerah asal anggota klaster A berada pada ketinggian diatas 200 mdpl, sedangkan daerah asal anggota klaster B berada pada ketinggian dibawah 200 mdpl. Beberapa serangga dapat mengalami variasi dalam pola voltinisme, yang mungkin dipengaruhi variasi geografi dan ketinggian (Gullan dan Cranston, 2000). Pola voltinisme berkaitan dengan periode diapause yang diatur melalui regulasi gen, yang bisa jadi dipengaruhi oleh aktivitas transposon. Transposon adalah elemen genetik yang dapat berpindah dari satu lokus suatu kromosom ke bagian lain kromosom maupun ke suatu lokus pada kromosom yang lain (Yuwono, 2005). Perpindahan transposon ini dapat mengubah susunan nukleotida pada genom sehingga memungkinkan munculnya variasi genetik. Mengelompoknya individu dari lokasi yang berlainan ke dalam satu kelompok (pada individu-individu NM dan W) terjadi karena individu tersebut memiliki kemiripan genetik yang dapat disebabkan oleh adanya rekombinasi genetik atau adanya aliran gen, mengingat lokasi tersebut relatif berdekatan dan memiliki ketinggian wilayah yang hampir sama. Penelitian pada *Bombyx mori*, menunjukkan bahwa perbedaan kondisi lingkungan belum tentu menghasilkan

perbedaan genotip pada serangga penghasil sutera. Kondisi lingkungan yang berbeda kemungkinan dapat memperlihatkan genotip yang sama (Jakaria, *et.al.*, 2001). Mengelompoknya individu dari tanaman pakan yang berbeda dalam satu kelompok (pada individu-individu dari Berbah) juga menunjukkan kemiripan genetik individu yang dapat disebabkan oleh kesamaan daerah asal sehingga kemungkinan parental-parentalnya masih berkerabat dekat. Pada individu yang berasal dari Berbah menunjukkan pengelompokan individu dengan tanaman pakan Sirsak (BR) terpisah dari kelompok individu dari Berbah dengan tanaman pakan yang lain (Senggugu dan Mahoni). Namun, perbedaan tanaman pakan sebagai penyebab terjadinya pengelompokan tidak dapat dipastikan, sebab di dalam kelompok tersebut (kluster H) juga terdapat individu BS3 yang tanaman pakannya adalah Senggugu.

Dalam Hopkin's *Host Selection Principle* dijelaskan bahwa pada serangga yang dapat berkembang biak pada lebih dari satu jenis tanaman inang, imago serangga tersebut akan meletakkan telurnya pada tanaman pakan tempat hidupnya saat fase larva. Keberadaan larva pada jenis tanaman inang atau tanaman pakan spesifik dapat menunjukkan mekanisme pembentukan variasi genetik. Hal tersebut disebabkan kekhususan hubungan antara serangga dengan suatu jenis tanaman pakan/inang hanya dapat tercapai setelah melalui asosiasi dalam waktu lama (Chew and Robin, 1984; Vinson, 1985 dalam Garjito, 2000). Pada pola pengelompokan dendrogram, terutama pada klaster B yang berasal dari daerah yang sama (Berbah) dengan tanaman inang yang berbeda-beda, tidak menunjukkan pengelompokan yang jelas berdasarkan tanaman inangnya. Hal ini mungkin disebabkan tanaman inang merupakan tanaman pakan alternatif di daerah tersebut, sehingga asosiasi antara serangga dan tanaman inang tersebut belum mampu menyebabkan terbentuknya variasi genetik.

KESIMPULAN

Berdasarkan data hasil penelitian dan analisis yang telah dilakukan dapat

disimpulkan bahwa terdapat variasi genetik yang tinggi antar individu *Attacus atlas* yang diperoleh dari daerah Berbah, Dlingo, Ngawen, dan Pracimantoro, yang ditunjukkan rata-rata persentase polimorfik tiap primer 97, 78%. Dendrogram menunjukkan koefisien similaritas *A. atlas* antara 61% – 87% dan mengelompok menjadi 2 kluster utama pada koefisien similaritas 61% berdasarkan perbedaan geografis. Amplifikasi menggunakan 4 primer ISSR menghasilkan 2 lokus monomorfik dan 82 lokus polimorfik. Lokus monomorfik pada 300 bp yang dihasilkan ISSR2 dan pada 1800 bp yang dihasilkan ISSR7 dapat menjadi kandidat lokus penciri spesies *A. atlas*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agisimanto D dan Supriyanto A. 2007. Keragaman Genetik Pamelon Indonesia berdasarkan Primer Random Amplified Polymorphic DNA. *J. Hort.* vol 17(1): 1-7.
- Anggraeini E. 1998. Analisis Keanekaragaman Genetik Nyamuk *Aedes aegypti* dari Kotamadya Bandung dengan menggunakan Metode Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). [Tesis]. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Bangun AA. 2001. Mutu Kokon dan Serat Sutera *Attacus atlas* (Lepidoptera: Saturniidae) Setelah Pemberian ABA (*Abcisic Acid*) di Awal Instar I. [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Bardacki F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology.* vol 25: 185-196.
- Baskoro A. 2008. Karakteristik Kulit Kokon Segar Ulat Sutera Liar (*Attacus atlas*) dari Perkebunan Teh di Daerah Purwakarta. [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor. <http://repository.ipb.ac.id/>. Diakses 16 Mei 2010.
- Chew FS and Robbins RK. 1984. Egg-laying in Butterflies. In *The Biology of Butterflies*. New York: Academic press. pp 65-79.
- Frankham R, Ballou JD, and Briscoe DA. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University press.
- Garjito TA. 2000. Preferensi Peletakan Telur *Attacus atlas* L. (Lepidoptera: Saturniidae) Pada Beberapa Tanaman Pakan. [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Gullan PJ and Cranston PS. 2000. *The Insect, An Outline of Entomology*. Malden: Blackwell Science. p 155-156.
- Haymer DS. 1995. Genetic Analysis of Laboratory and Wild Strain of The Melon Fly (Diptera: Tephritidae) using RAPD-PCR. *Ann Entomol Soc.* vol 88(5): 705-710.
- Indrawan M. 2007. Karakter Sutera dari Ulat Jedung (*Attacus atlas* L.) yang Dipelihara pada Tanaman Pakan Senggugu (*Clerodendron serratum* Spreng). *Biodiversitas.* vol 3(8): 215-217.
- Luque C, Legal L, Staudter H, Gers C dan Wink M. 2002. Brief Report: ISSR as Genetic Markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas.* vol 136: 251-253.
- Nuryani D. 2003. Analisis Keseragaman Genetik Tanaman Teh (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) Asal Kultur Jaringan, Setek, dan Biji dengan Teknik RAPD. [Skripsi]. Bogor: Jurusan Kimia. Fakultas MIPA. Institut Pertanian Bogor.
- Peigler RS. 1989. A Revision of the Indo-Australian Genus *Attacus*. California: The Lepidoptera Research Foundation, Inc. pp 25-37.
- Pharmawati M. 2009. Marka Molekuler Berbasis DNA untuk Penentuan Hubungan Kekerabatan Tumbuhan. Denpasar: Penerbit Universitas Udayana.
- Reddy KD, Nagaraju J, Abraham EG. 1999. Genetic Characterization of The Silkworm *Bombyx mori* by Simple Sequence Repeat (SSR) anchored PCR. *Heredity.* vol 83: 681-687.
- Romulo VJ. 1997. Daur Hidup dan Faktor Mortalitas *Attacus atlas* L. yang dipelihara di Laboratorium. [Skripsi]. Yogyakarta:

- Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Situmorang J. 2000. Serangga sebagai Sahabat Umat Manusia. Yogyakarta: Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Madya dalam Entomologi pada Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Solihin DD, dan Fuah AM. 2010. Budidaya Ulat Sutera Alam. Jakarta: Penebar Swadaya. hal 9, 23-30.
- Subagyo Y. 2000. Daur Hidup *Attacus atlas* L. (Lepidoptera: Saturniidae) dengan Pakan Alami Daun Mahoni (*Switenia mahagoni* Jacq.) di Lapangan. [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Thibert-Plante X, Hendry AP. 2011. Factors Influencing Progress Toward Sympatric Speciation, In: Gun, H.S. Mekanika Spesiasi: Model yang Menguji Faktor-faktor Munculnya Spesies Baru. <http://www.faktailmiah.com>. Diakses 28 November 2011.
- Thomas R dalam World Conservation Monitoring Centre. 1992. Global Biodiversity, Status of the Earth's Living Resources. London: Chapman and Hall.
- Vijayan K, Anuradha HJ, Nair CV, Pradeep AR, Awasthi AK, Saratchandra B, Rahman SAS, Singh KC, Chakraborti R, and Raje SU. 2006. Genetic Diversity and Differentiation among Population of The Indian Eri Silkworm, *Samia cynthia ricini*, revealed by ISSR Markers. *Journal of Insect Science*. vol 6 (30): 1-11.
- Vinson SB. 1985. The Behaviour of Parasitoids. In G.A.Kerkut and G.A.Gilbert Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Pergamon press. vol 9. pp: 441-489.
- Zebua BTU, Situmorang J, Jati WN. 1997. Daur Hidup *Attacus atlas* L dengan Pemberian Pakan Daun Dadap (*Erythrina lithosperma* Miq.) di Laboratorium. *Biota*. vol 2 (2): 67-72.