

**KARAKTERISTIK MOLEKULER DAN FILOGENI LALAT BUAH
Bactrocera occipitalis (Diptera:Tephritidae) DARI TARAKAN
BERDASARKAN SEKUEN NUKLEOTIDA GEN COI**

Dwi Martiningsia, I Nyoman Wijaya, dan I Putu Sudiarta*)

Program Magister Bioteknologi Pertanian, Program Pascasarjana Universitas
Udayana

*) Corresponding author at : Jl. PB. Sudirman Denpasar Bali Indonesia
E-mail : putu.ueda@yahoo.com

Abstract

Bactrocera occipitalis is one species of group *B. dorsalis* complex. The main host of *B. occipitalis* is mango (*Mangifera indica*), guava (*Psidium guajava*), orange (*Citrus* sp), sapodilla (*Achras zapota*) and star fruit (*carambola Averrhoa*). Region of distribution *B. occipitalis* are Philippines, East Malaysia (Sabah), Brunei, Indonesia (Kalimantan). *B. dorsalis* complex has similar morphological and have a less distinctive character for taxonomic identification at immature life stages, it will be an obstacle for the export of fruit and vegetables from Indonesia related to quarantine the country of destination, and DNA-based barcode can solve this problem. Molecular Identification *B. occipitalis* Tarakan successfully amplified at 642 bp with COI gene. Based on sequence homology COI *B. occipitalis* Tarakan has a high of similarity with *B. occipitalis* Philippines is 99.4% -100%. The phylogenetic analysis of DNA sequences and genetic distance based on COI gene sequences showing too genetic closeness with *B. occipitalis* Philippines.

Keywords : *Bactrocera occipitalis*, COI gene

1. Pendahuluan

Lalat buah merupakan salah satu hama hortikultura yang paling merusak di dunia dan menimbulkan risiko bagi kebanyakan buah komersial dan sayuran (Allwood *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2005). Hal ini memiliki implikasi besar untuk produksi yang berkelanjutan dan akses pasar. Di seluruh dunia ada sekitar 4000 spesies lalat buah yang termasuk family Tephritidae dan sekitar 350 spesies merupakan organisme pengganggu tumbuhan yang menyebabkan kerugian ekonomi (Plant Health Australia, 2011).

Lalat buah *Bactrocera dorsalis* komplek adalah hama polifag dan sangat invasif sehingga merupakan spesies hama penting dalam pertanian (Stephens *et al.*, 2007; Advasakulchai *et al.*, 1999). Lalat buah *B. dorsalis* secara signifikan menyebabkan kerugian ekonomi, kerusakan buah, penurunan produksi buah dan hilangnya pasar ekspor yang terkait dengan pembatasan karantina (Peterson *et al.*, 1998 dalam Wan *et al.*, 2011). *Bactrocera occipitalis* merupakan salah satu spesies *B. dorsalis* komplek (Clarke *et al.*, 2005; Delomen *et al.*, 2013; Plant

Health Australia, 2011). Inang utama dari *B. occipitalis* adalah mangga (*Mangifera indica*), jambu (*Psidium guajava*), jeruk (*Citrus* sp) (Clarke *et al.*, 2005; Delomen *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2005; Allwood *et al.*, 1999). Menurut Pujiastuti *et al.*, 2009 dan Permentan no. 93/Kpts/H.k.060/12/2011 bahwa sawo (*Achras zapota*) dan belimbing (*Averrhoa carambola*) juga merupakan inang *B. occipitalis*.

Daerah sebar *B. occipitalis* menurut Drew, 2010 meliputi Filipina, Malaysia Timur (Sabah), Brunei, Indonesia (Kalimantan). Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian no. 93/Kpts/Hk.060/12/2011 tentang jenis-jenis OPTK (*B. occipitalis* merupakan OPTK A2) yang artinya *B. occipitalis* ada di Indonesia tetapi masih di daerah yang terbatas yaitu di Kalimantan, Jawa Barat (Bogor), dan Sumatera (Tanjung Balai Karimun).

B. dorsalis kompleks memiliki morfologis serupa dan pada tahap perkembangan awal memiliki karakter yang kurang khas untuk identifikasi taksonomi, *barcode* berbasis DNA bisa memecahkan masalah ini (Frey *et al.*, 2013). *Barcoding* DNA secara bertahap merupakan alat yang efektif untuk mengidentifikasi spesies dalam kisaran yang luas pada grup taksonomi, dan beberapa publikasi melaporkan bahwa penanda DNA rata-rata efektif dan cepat untuk identifikasi lalat buah (Jiang *et al.*, 2014). Diagnosis secara genetik dengan mtCOI dan 16 s DNA dapat membedakan secara spesifik antara spesies *B. occipitalis* dan *B. philipinensis*. Deteksi dan identifikasi dengan menggunakan Polimerase Chain Reaction (PCR) dengan primer spesifik yang dirancang berdasarkan Mitokondria sitokrom oksidase I (COI) telah dilakukan dan menghasilkan hasil deteksi yang cepat dan spesifik (Yu *et al.*, 2005).

Keberadaan *B. occipitalis* di Indonesia akan menjadi kendala bagi ekspor buah dan sayur dari Indonesia terkait dengan perkarantinaan negara tujuan hal ini juga didukung oleh Siwi, *et al.*, 2006 bahwa peraturan karantina dari negara pengimpor dapat mengembargo produk ekspor dari negara yang terdapat hama lalat buah tertentu atau memaksa produsen untuk memberi perlakuan khusus yang akan banyak memakan biaya. Walaupun demikian Indonesia merupakan negara kepulauan yang akan menjadi barrier bagi penyebaran lalat buah *B. occipitalis*. Maka dari itu perlu dipelajari kaarakteristik dan filogeni molekuler *B. occipitalis* dari Tarakan yang mewakili Kalimantan sebagai daerah sebar *B. occipitalis*.

2. Bahan dan Metode

2.1. Pengambilan sampel

Sampel *B. occipitalis* didapat dari Balai Karantina Pertanian Kelas I Tarakan Kalimantan Utara. Identifikasi dilaksanakan di Laboratorium Entomologi dan Biomolekuler Karantina Tumbuhan Balai Karantina Pertanian Kelas I Denpasar mulai Februari 2015 – Juni 2015

2.2 Identifikasi molekuler

Identifikasi molekuler menggunakan metode PCR yang diawali dengan melakukan ekstraksi DNA dari sampel *B. occipitalis* dari Tarakan. Primer yang digunakan yaitu gen mtCOI spesifik lalat buah. Produk PCR kemudian dielektroforesis dan kemudian di sekuensing

2.3 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA sampel lalat buah *B. occipitalis* menggunakan Qiagen Dneasy (Qiagen, Hilden, Germany) Blood and Tissue kits. Sampel *B. occipitalis* diambil bagian kepala, thorax, dan tungkai kemudian digerus menggunakan pistil dan mortar, dibantu dengan penambahan nitrogen cair. Serbuk hasil gerusan dimasukkan ke tube microcentrifuge 1,5 ml, ditambahkan 180 µl Buffer ATL dan 20 µl proteinase K kemudian di *mix* dengan vortex. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 56°C di thermomixer *overnight*. Selanjutnya ditambahkan 200 µl Buffer AL pada sampel, dan di vortex lagi. Setelah itu ditambahkan 200 µl ethanol (96-100%), dan divortex lagi. Selanjutnya campuran tersebut dimasukkan ke Dneasy Mini Spin column dalam tabung koleksi 2 ml dengan menggunakan pipet, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit, larutan yang masuk ke tabung dibuang. Selanjutnya Dneasy Mini Spin column dipindah ke tabung koleksi 2 ml yang baru, ditambahkan 500 µl Buffer AW 1, dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit, larutan yang masuk ke tabung dibuang. Selanjutnya Dneasy Mini Spin column dipindahkan lagi ke tabung koleksi 2 ml yang baru, ditambahkan 500 µl Buffer AW2, dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit sampai membran Dneasy kering, larutan yang ada di tabung dibuang. Selanjutnya Dneasy Mini spin column dipindahkan ke tabung microcentrifugasi 2 ml yang bersih, dan pipet 200 µl Buffer AE langsung ke membran DNeasy. Kemudian inkubasi pada temperatur ruang selama 1 menit dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit untuk elusi.

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hasil Ekstraksi DNA kemudian diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer yang spesifik yang didesain dari Gen Mitochondria Cytochrome Oxidase I Fruit Fly CO1-F(FFCOI)5'-GGAGCATTAATYGGRGAYG-3' dan primer reverse HCO-R5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Plant Health Australia, 2011). PCR dilakukan dalam volume 25µl yang terdiri dari master mix 12,5 µl (1x BSA, 10x Buffer, dNTP's, MgCl₂, dan NEB Taq), 1 µl LCO1490-F, 1 µl HCO-R, DNA template 3 µl, dan *Nuclease free water* 7,5 µl. Siklus PCR yang digunakan yaitu predenaturasi 94°C selama 2 menit, kemudian dilanjutkan 40 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, annealing (penempelan primer) pada 52 °C selama 30 detik, ekstensi 72 °C selama 30 detik, dan ekstensi akhir 72 °C selama 2 menit.

2.5 Elektroforesis dan Sekuensing

Produk PCR 1 µl (ditambah 1 µl loading dye) dielektroforesis dalam gel agarose 2%. Gel agarose 2% dipilih karena panjang DNA dari *B. occipitalis* berkisar 556-642 pb (Delomet *et al.*, 2013, Pramudi *et al.*, 2013). Gel agarose 2% digunakan untuk fragmen panjang DNA 50-2.000 panjang basa (Holil, 2004). Pembuatan 2% gel agarose dalam volume 80 ml 1x buffer TAE, maka jumlah agarose yang akan ditimbang yaitu: 2 gram/100ml x 80ml=1,6 gram. Agarose 1,6 gram ditempatkan ke dalam labu erlenmeyer dan isi dengan larutan 1X Buffer TAE sampai volume 80ml, kemudian dikocok sampai merata. Setelah itu dipanaskan dalam microwave sampai mendidih sampai larutan menjadi jernih. Kemudian agarose didinginkan kira-kira sampai 60°C dan tambahkan 3 µl biotine gel red dan campur hingga merata. Setelah itu larutan dituang ke dalam tray dan pasang *well-forming combs*, ditunggu kurang lebih 30 menit atau sampai gel mengeras. Kemudian *well-forming combs* dilepas secara perlahan-lahan dan gel agarose siap digunakan untuk elektroforesis.

Elektroforesis dilakukan selama 120 menit pada 70 volt. DNA yang telah dielektroforesis divisualisasi dengan UV transluminator. Produk hasil PCR yang berhasil teramplifikasi dikirim ke laboratorium FirstBase Malaysia untuk dilakukan sekuen nukleotida, urutan basa nukleotida hasil sekuensing akan digunakan dalam analisis molekuler selanjutnya.

2.6 Analisis sekuen dan Filogenetik

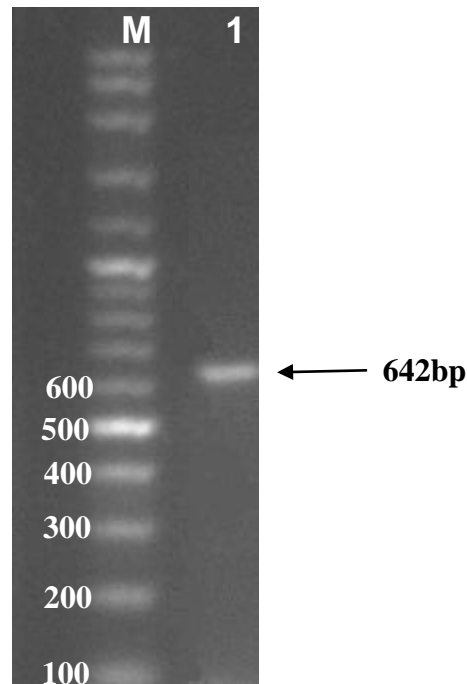
Hasil sekuen nukleotida *B. occipitalis* dari Tarakan berdasarkan gen COI digunakan untuk mencari gen *B. occipitalis* yang telah dipublikasikan di GenBank dengan Program Basic Local Aligment Tool (BLAST) yang dapat diakses pada www.ncbi.nlm.nih.gov. Sekuen *B. occipitalis* dari Tarakan dan sekuen-sekuen yang homolog berdasarkan GenBank tersebut selanjutnya dilakukan aligment dengan program ClustalW untuk mengetahui tingkat similaritas atau kesejajaran sekuen. Selanjutnya hasil aligment data sekeuen nukleotida digunakan untuk mengkontruksi pohon filogeny dengan menggunakan program Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 6 (Tamura *et al.*, 2013).

3. Hasil dan Pembahasan

Sampel *B. occipitalis* dari Tarakan dideteksi dengan menggunakan primer Mitochondrial cytochrome C Oxidase I (COI) dengan metode PCR. Amplifikasi menggunakan pasangan primer COI, Fruit Fly COI-F(FFCOI)5'-GGAGCATTAATYGGRGAYG-3' dan primer reverse HCO-R5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Plant Health Australia, 2011) dengan panjang fragmen DNA yang diperoleh 642 bp (Gambar 1.).

Data sekuensing *B. occipitalis* berdasarkan Gen COI dicari homologinya di GenBank dengan menggunakan software BLAST, ditemukan beberapa data sekuen asam nukleat spesies *B. occipitalis* dalam data GenBank yang memiliki

similaritas dengan *B. occipitalis* yang ditemukan di Tarakan. Data sekuen *B.occipitalis* di GenBank yang memiliki similaritas dengan data sekuen yang berasal dari Tarakan semuanya berasal dari Filipina. Kemudian dilakukan pensejajaran (aligment) sekuen *B. occipitalis* Tarakan dan sekuen yang similar dari GenBank dengan menggunakan ClustaW (Tabel 1.).



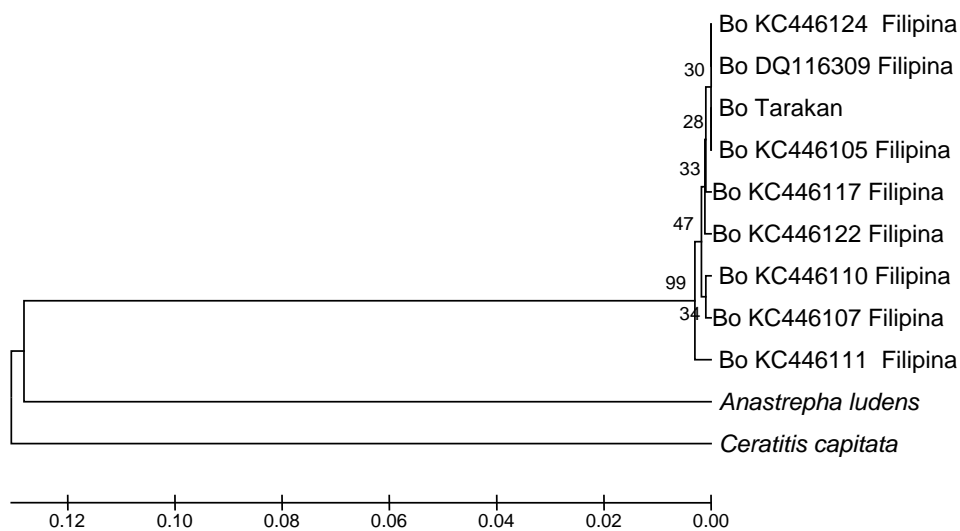
Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA 1. *B. occipitalis* Tarakan, dengan metode PCR menggunakan pasangan primer COI-F(FFCOI)5' dan HCO-R5. Sampel *B.occipitalis* teramplifikasi dengan ukuran 642 pb. M : marker 100 bp (Fermentas)

Hasil pensejajaran sekuen menunjukkan bahwa asam nukleat gen COI *B. occipitalis* Tarakan menunjukkan homologi yaitu 99,4-100%, tertinggi dengan *B.occipitalis* yang berasal dari Filipina dengan nomer aksesori KC446105 Voucher Bd793 yakni sebesar 100 % (Tabel 1.).

Analisa filogenetika menggunakan metode *unweighted pair group* dengan rata-rata aritmatika (UPMGA) 1000x *bootstrap* (Brinkman, F and D.Leipe 2001; Dhramayanti, 2011; Holil, 2004; Tamura *et al.*, 2013) diperoleh konstruksi filogeni *Bactrocera occipitalis* Tarakan dengan koleksi GenBank (Delomen *et al.*, 2013) (Gambar 2.).

Tabel 1. Tingkat homolog (%) *B.occipitalis* dari Tarakan, dan spesies *B. occipitalis* negara lain yang terdapat di *GenBank* berdasarkan gen COI

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| [1] | ID | | | | | | | | | | |
| [2] | 99,6 | ID | | | | | | | | | |
| [3] | 99,8 | 99,8 | ID | | | | | | | | |
| [4] | 99,8 | 99,4 | 99,6 | ID | | | | | | | |
| [5] | 99,6 | 99,2 | 99,4 | 99,4 | ID | | | | | | |
| [6] | 99,6 | 99,2 | 99,4 | 99,4 | 99,2 | ID | | | | | |
| [7] | 100 | 99,6 | 99,8 | 99,8 | 99,6 | 99,6 | ID | | | | |
| [8] | 99,8 | 99,4 | 99,6 | 99,6 | 99,8 | 99,4 | 99,8 | ID | | | |
| [9] | 99,4 | 99 | 99,2 | 99,2 | 99,4 | 99 | 99,4 | 99,6 | ID | | |
| [10] | 81,1 | 80,9 | 81,1 | 81,3 | 81,1 | 81,1 | 81,1 | 80,9 | 80,5 | ID | |
| [11] | 85,1 | 84,7 | 84,9 | 85,3 | 85,3 | 85,1 | 85,1 | 85,1 | 85,1 | 80,9 | ID |



Gambar 2. Pohon Filogeni *B. occipitalis* Tarakan dibandingkan dengan *B. occipitalis* dari negara lain berdasarkan Gen COI. Nomor akses *B. occipitalis* KC446122 Bd793 dari Filipina, *B. occipitalis* KC446124 Bd 800 dari Filipina, *B. occipitalis* KC446117 Bd 739 dari Filipina *B. occipitalis* KC446107 Bd 783 dari Filipina, *B. occipitalis* DQ116309 Isolat FF 1000 dari Filipina, *B. occipitalis* KC446110 Bd786 dari Filipina, *B. occipitalis* KC446111 Bd787 dari Filipina, *B. occipitalis* KC446105 Voucher Bd739 dari Filipina *Ceratitis capitata* JN705013 dan *Anastrepha lugens* HM538334 sebagai outgroup. Pohon Filogeni dikonstruksi menggunakan perangkat MEGA versi 6.06 (Algoritma UPGMA dengan 1000 *bootstrap method Replication*).

Berdasarkan analisa filogenetik *B. occipitalis* Tarakan berada satu clade dengan *B. occipitalis* Filipina, jadi berdasarkan gambar 2. *B. occipitalis* Tarakan berada pada kelompok monofiletik dengan *B. occipitalis* Filipina. Hasil filogenetik dengan UPGMA didukung dengan nilai bootstrap yang tinggi yaitu 99%, menurut Dharmayanti (2011) nilai bootstrap menjadi tolak ukur penentu tingkat kepercayaan filogeni. Analisa bootstrap adalah metode yang menguji seberapa baik set data model, menguji cabang-cabang yang dapat dipercaya.

Berdasarkan Jarak genetik sekuen gen COI *B. occipitalis* Tarakan dan Filipina sekitar 0,00-0,006. Jarak genetik terendah yaitu dengan *B. occipitalis* KC446105, KC446124 dan DQ 116309 Filipina yaitu 0,043, dengan *B. occipitalis* Tarakan memiliki jarak genetik 0,000, dan jarak genetik tertinggi dengan *B.occipitalis* KC446111 dari Filipina yaitu 0,006 (Tabel 2.). Spesies yang memiliki nilai jarak genetik semakin rendah, maka memiliki hubungan kekerabatan semakin dekat. Sebaliknya spesies yang memiliki jarak genetik tinggi, maka hubungan kekerabatannya semakin jauh (Dharmayanti 2011). Tetapi semua *B. occipitalis* tersebut berada dalam 1 clade yang sama.

Tabel 2. Matriks Jarak Genetik *B. occipitalis* Tarakan dan Filipina berdasarkan Gen COI

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| [1] | | | | | | | | | | | |
| [2] | 0,000 | | | | | | | | | | |
| [3] | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | | |
| [4] | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | | | | | | | |
| [5] | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | | | | | | | |
| [6] | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,004 | | | | | | |
| [7] | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,004 | 0,004 | | | | | |
| [8] | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,006 | 0,002 | 0,006 | | | | |
| [9] | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,008 | 0,004 | 0,008 | 0,006 | | | |
| [10] | 0,257 | 0,257 | 0,257 | 0,257 | 0,264 | 0,262 | 0,253 | 0,256 | 0,276 | | |
| [11] | 0,257 | 0,257 | 0,257 | 0,257 | 0,263 | 0,257 | 0,252 | 0,250 | 0,257 | 0,268 | |

Keterangan : [1] *B. occipitalis* Tarakan [2] *B. occipitalis* KC446105 Voucher Bd739 Filipina [3] *B. occipitalis* KC446124 Filipina Voucher Bd 800 [4] *B.occipitalis* DQ 116309 Filipina [5] *B. occipitalis* KC446122 [6] *B. occipitalis* KC446110 [7] *B. occipitalis* KC446117 Voucher Bd739 Filipina [8] KC446107 Vouher Bd783 Filipina [9] *B. occipitalis* KC446111 [10] *Ceratitis capitata* JN705013 sebagai outgroup [11] *Anasthrea lugens* HM538334 sebagai outgroup

Daerah sebar *B. occipitalis* meliputi Filipina, Malaysia Timur (Sabah), Brunei, Indonesia (Kalimantan) (Drew and Romig, 2010. Inang utama lalat buah ini yaitu mangga (*Mangifera indica*), jambu (*Psidium guajava*), jeruk (*Citrus* sp), sawo (*Achras zapota*) dan belimbing (*Averrhoa carambola*) (Clarke et al., 2005; Delomen et al., 2013; Yu et al., 2005; Allwood et al., 1999; dan Pujiastuti et al., 2009). Kedekatan genetik berdasarkan sekuen gen COI *B. occipitalis* Kalimantan dan Filipina ini didukung oleh kesamaan faktor lingkungan dan tanaman inang.

Hal ini didukung oleh hasil penelitian Samie and Zaki (2011) yaitu analisis berdasarkan sekuen gen COI pada lima sekuen *B. Zonata* menunjukkan kesamaan dari lima lokasi yang memiliki kondisi lingkungan dan tanaman inang yang sama.

4. Simpulan

Identifikasi molekuler *B. occipitalis* Tarakan berhasil dilakukan dengan gen COI yaitu teramplifikasi pada 642 pb dan pada tingkat homologi sekuen COI *B. occipitalis* Tarakan memiliki tingkat similaritas yang tinggi dengan *B. occipitalis* Filipina yaitu 99,4%-100%. Begitupula dengan analisa Filogenetika dan jarak genetik sekuen DNA berdasarkan sekuen gen COI menunjukkan kedekatan genetik dengan *B. occipitalis* Filipina.

Daftar Pustaka

- Adsavakulchai, A., V. Baimai. W. Prachyabrued, P. J. Grote, S. Lertum. 1999. Morphometric study for identification of The *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera:threptitidae) using wing image analysis. Biotropia 13: 37-48.
- Allwood, A.J., A. Chinajariyawong, R. A. I. Drew, D.L. Hancock, C Hengsawad, J. C. Jinapin, M. Jirasurat, C. Kong Krong, S. Kritsaneepaiboon, C.T.S. Leon, S. Vijaysegaran. 1999. Host Plant records for fruit Flies (Diptera Tephritidae) in South-East Asia. Raffles Bullet. Zool. (Suppl.7).
- Boykin, L. M., M. K. Schutze, M. N. Krosch, A. Chomoic, T. A. Chapman, A. Englezou, K.F. Armstrong, A.R. Clarke, D. Hailstones and S.L. Cameron. 2013. Multigene phylogenetic analysis of south-east Asian pest members of the *Bactrocera dorsalis* species komplek (Diptera:Tephritidae) does not support current taxonomy. Journal of Applied Entomology doi:10.1111/jen.12047
- Brinkman, F. S. L. And D. D. Leipe. 2001. Phylogenetic Analisis In Bioinformatics. A Practical Guides to the Analisis of Gene and Protein. John Willey and Sons. 323-358
- Clarke, A. R., K. F. Armstrong., A. E.Carmichael, J. R. Milne., S. Raghu, G. K. Roderick,and D. K. Yeates. 2005. Invasive phytophagous pest arising trough a recent tropical evolutionary raditation: The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. Quteprint. <http://eprints.qut.edu.au>.
- Delomen, M. C. L., M. S. Mendioro, and M. G. Q. Diaz. 2013. Morphometric analysis and fruit flies *Bactrocera occipitalis* (Bezzi) and *B. philipinensis* Drew and Hancock (Diptera: Tephritidae) from Cavite and Davao del Norte. Philippine Journal of Science. 142 (1): 69-76.
- Dharmayanti, I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa*. 21(1). 1-10.
- Drew, R.A.I., and M. Romig. 2010. Fruit Flies. Biology, biosecurity, pest management and taxonomy. International Centre for the Management of Pest Fruit Flies. Griffith University. Brisbane.
- Frey, J. E., L. Gullen, B. Frey, J. Samietz, J. Rull, and M. Aluja. 2013. Developing diagnostic SNP panels for theidentification of true fruit flies (Diptera: Tephritidae) within the limits of COI-based specie delimitation.

- BMC Evolutionary Biology 2013, 13:106. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/13/106>.
- Holil, K. 2004. Buku Petunjuk Praktikum Teknis Analisis Biologi Molekuler. Jurusan Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Jiang, F., Q. Jin, L. Liang, A.B. Zhang and Z. H. Li. 2014. Existences of species complex largely reduced barcoding success for invasive species of Tephritidae: a case study in *Bactrocera* spp. Molecular Ecology Resources (2014). doi:10.1111/1755-0998.12259.
- Plant Health Australia. 2011.. The Australian Handbook for The Identification of Fruit Flies Version 1.0. Australian Government. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. Canberra.
- Pramudi, M. I., R. D. Puspitarini, dan B. T. Rahardjo. 2013. Keanekaragaman dan kekerabatan lalat buah (Diptera:Tephritidae) di Kalimantan Selatan berdasarkan karakter morfologi dan molekuler (RAPD PCR dan Sekuensing DNA). J HPT Tropikal. 13 (2) : 191 – 202.
- Pujiastuti, Y., L. Kartini, C. Irsan, S. Herlinda, T. Adam, dan R. Thalib. 2009. Variasi jenis tanaman buah sebagai inang lalat buah (Diptera:Tephritidae) Pada berbagai ketinggian tempat di Sumatra Selatan. Jurnal Agripet Fakultas Pertanian Palangka Raya Kalimantan Tengah. 10 (2) : 58-64.
- Siwi S. S., Purnama H. & Suputa. 2006. Taksonomi dan Bioekologi Lalat Buah Penting di Indonesia. BB-Biogen. Bogor.
- Stephens, A.E.A., Kriticos D. J, and Leriche A. 2007. The Current and Future Potential Geographical Distribution of the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera:Tephritidae). Bulletin of Entomological Research 97:309-378.
- Tamura, K., Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipski, and Sudhir Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30(12):2725–2729.
- Wan, X., F. Nardi, B. Zhang, and Y. Liu. 2011. The oriental fruit fly, *Bactrocera Dorsalis*, In China: Origin and gradual inland range expansion associated with population growth. Plose One 6(10) e25238 doi:10.1371/journal.pone.0025238.
- Yu, D. J., Z. L. Chen, R. J. Zhang, and W. Y. Yin. 2005. Real time qualitative PCR for the Inspection And identification Of *Bactrocera philipinensis* And *Bactrocera occipitalis* (Diptera:Tephritidae) using Sybr Green Assay. The Raffles Buletin of Zoology 2005 53(1): 73-78.
- Yu, D. J., L. Xu, F. Nardi, J. G. Li, R. J. Zhang. 2007. The Complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera:Tephritidae). Gene Vol. 396 (1) : 66-74. doi:10.1016/j.gene.2007.02.023