

## Keragaman Walang Sangit (Hemiptera: Alydidae) di Desa Kiniar, Kecamatan Tondano Timur, Kabupaten Minahasa Berdasarkan DNA Barcoding

Mira Astriani<sup>1\*</sup>, Beivy Jonathan Kolondam<sup>2</sup>, Marhaenus Johanis Rumondor<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Universitas Sam Ratulangi, Manado

\*E-mail korespondensi: [miraastraini102@student.unsrat.ac.id](mailto:miraastraini102@student.unsrat.ac.id)

### Abstrak

Walang sangit (*Hemiptera:Alydidae*) merupakan serangga yang berpotensi sebagai hama tanaman padi (*Oryza sativa*). Penyebaran metode identifikasi yang lebih baru yaitu melibatkan teknik molekuler, yakni DNA Barcoding. Target standar dari DNA barcoding untuk hewan tingkat tinggi adalah marka gen COI. Untuk itu diperlukan penelitian mengenai penentuan spesies serangga hama tanaman padi menggunakan DNA barcoding untuk keperluan konservasi, serta membandingkan spesies-spesies yang ditemukan pada daerah tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi serangga hama tanaman padi di persawahan kabupaten Minahasa menggunakan DNA barcoding. Lokasi pengambilan spesimen serangga bertempat di persawahan tanaman padi Desa Kiniar, Kecamatan Tondano Timur, Kabupaten Minahasa, Provinsi Sulawesi Utara. Metode penelitian dimulai dari pengambilan sampel serangga, kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi DNA, amplifikasi gen COI (menggunakan metode PCR), elektroforesis gel agarosa, sekuensing, dan analisis data. Hasil data sekuensing yang berupa kromatogram data urutan sekuens DNA disunting dengan menggunakan software Geneious v5.6.4. Hasil penelitian menunjukkan spesies yang teridentifikasi dari sekuens kedua sampel serangga adalah *Leptocoris oratoria* dan *Leptocoris chinensis*. Analisa kekerabatan menunjukkan *L. oratoria* dan *L. chinensis* memiliki tingkat kekerabatan terdekat diantara spesies lainnya.

**Kata Kunci:** DNA Barcoding; Gen COI; Kekerabatan; Walang Sangit

### Abstract

Rice ear bug (*Hemiptera: Alydidae*) is a potential pest of rice plants (*Oryza sativa*). The spread of new identification methods involves molecular techniques, namely DNA Barcoding. The standard target for DNA barcoding in high-level animals is the COI gene marker. Therefore, research on the determination of rice plant pest species using DNA barcoding for conservation purposes is needed, as well as comparing the species found in the area. This study aims to identify rice plant pests in Minahasa Regency using DNA barcoding. The location of the insect specimen collection is in the rice fields of Kiniar Village, Tondano Timur District, Minahasa Regency, North Sulawesi Province. The research method begins with insect sampling, followed by DNA extraction, COI gene amplification (using PCR method), agarose gel electrophoresis, sequencing, and data analysis. The sequencing data in the form of chromatogram DNA sequence data were edited using Geneious v5.6.4 software. The results of the study show that the species identified from the sequence of the two insect samples were *Leptocoris oratoria* and *Leptocoris chinensis*. Phylogenetic analysis shows that *L. oratoria* and *L. chinensis* have the closest relationship among other species.

**Keywords:** COI Gene; DNA Barcoding; Phylogeny; Rice ear bug



Ciptaan disebarluaskan di bawah [Lisensi Creative Commons Atribusi-BerbagiSerupa 4.0 Internasional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

## PENDAHULUAN

Walang sangit (*Hemiptera: Alydidae*) merupakan serangga yang berpotensi sebagai hama tanaman padi (*Oryza sativa*). Walang sangit termasuk hama yang merusak persawahan, hama ini merusak tanaman padi dengan menghisap bulir buah padi menggunakan bagian *stylet*. Serangan walang sangit dapat mengakibatkan penurunan kualitas produksi tanaman padi, karena pengisian bulir padi menjadi tidak sempurna. Walang sangit yang menyerang tanaman padi umumnya berada berdekatan dengan hutan dan saluran irigasi (Litsinger *et al.*, 2015).

Serangga mempunyai peranan yang sangat penting bagi ekosistem, peranan tersebut dapat menguntungkan maupun merugikan. Peran yang menguntungkan yaitu serangga dapat bermanfaat sebagai penyerbuk/pollinator, juga dapat berperan sebagai musuh alami serangga hama. Peran serangga yang merugikan yaitu serangga yang menyebabkan luka pada tanaman sehingga menyebabkan kerusakan/kerugian dan disebut sebagai hama. Pelukaan tanaman oleh serangga dilakukan dengan cara: menggigit, menghisap, memakan, melukai akar, meletakkan telur/membuat sarang, mengamati serangga lain dan pengantar penyakit (Untung, 2010). Kerusakan pada tanaman bisa keseluruhan misalnya, tanaman menjadi mati atau busuk, dan bisa juga pada sebagian tanaman saja, misalnya merusak daun, batang dan akar.

Pengelolaan serangga hama yang kurang tepat menimbulkan terjadinya penurunan produktivitas tanaman padi. Oleh Karena itu, diperlukan pengetahuan petani untuk bisa mengenal jenis-jenis hama pada tanaman padi yang ada di Indonesia. Serangan hama tanaman padi yang paling sering menyerang adalah jenis penggerek batang, ganjur (*Pschydiplosis oryzae*), wereng, walang sangit (*Leptocorixa acuta*), dan hama putih (*Nymphula depunctalis*). Kepinding (*Scotinophora* sp.) termasuk salah satu hama tanaman yang menimbulkan kerugian. Jenis penggerek batang paling banyak menyerang adalah penggerek putih (*Scirpophaga innotata*), penggerek kuning (*S. incertulas*), penggerek bergaris (*Chilo suppressalis*) dan penggerek merah jambu (*Sesamia inferens*). Harahap dan Tjahyono (1992) menjelaskan jenis wereng yang paling aktif menyerang adalah wereng hijau (*Nephotettix oryzae*), wereng coklat (*Nilaparvata lugens*), wereng putih (*Sogatella furcifera*) dan wereng bergaris (*Nephotettix apicalis*) serta kepik hijau (*Nezara viridula*) dan hispa padi (*Diclandispa armigera*).

Dalam identifikasi serangga secara umum, digunakan identifikasi secara morfologi. Penyebaran metode identifikasi yang lebih baru yaitu melibatkan teknik molekuler, yakni DNA Barcoding. Casiraghi *et al.*, (2015) menjelaskan bahwa DNA barcoding adalah alat molekuler dan bioinformatika untuk identifikasi spesies biologi. Kelebihan lain dari DNA barcoding yaitu juga dapat mengidentifikasi spesies yang sulit dibedakan secara morfologi. DNA barcoding juga memberikan kecepatan dan keakuratan dalam identifikasi spesies. DNA barcoding memiliki dua tujuan, yaitu identifikasi molekuler yang sudah terdeskripsikan maupun spesies yang belum terdeskripsikan (Rahayu dan Jannah, 2019). DNA barcoding merupakan suatu metode dalam taksonomi molekuler, yang menggunakan urutan DNA pendek untuk pengidentifikasi spesies. Target standar dari DNA barcoding untuk hewan tingkat tinggi adalah marka gen COI. Marka ini mampu mengidentifikasi spesies dengan tingkat taksonomi yang luas karena memiliki tingkat keragaman yang sangat tinggi. Metode taksonomi molekuler juga sering banyak digunakan untuk melengkapi pendekatan morfologi dalam identifikasi spesies dan dalam membangun hubungan filogenetik (Galan *et al.*, 2018).

Kabupaten Minahasa merupakan sentra pertanian padi yang luas area persawahan dan ladang untuk tanaman padi mencapai 117.277 hektar dengan total produksi mencapai 475.018 ton. Sampai saat ini belum ada penelitian serangga hama yang melibatkan teknik-teknik molekuler. Hal ini penting dalam memetakan keanekaragaman spesies serangga di Indonesia yang selama ini kurang di eksplorasi. Kabupaten Minahasa, Kecamatan Tondano Timur, Desa Kiniar Provinsi Sulawesi Utara merupakan lahan persawahan tanaman padi yang menjadi tempat habitat dari serangga hama. Untuk itu diperlukan penelitian mengenai DNA barcoding walang sangit (hemiptera:alydidae) untuk keperluan konservasi, serta membandingkan spesies-spesies yang ditemukan pada daerah tersebut. Dengan spesies-spesies hama di tempat lain secara molekuler.

## **METODE**

### **Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Juni 2023. Lokasi pengambilan spesimen serangga bertempat di persawahan tanaman padi Desa Kiniar, Kecamatan Tondano Timur, Kabupaten Minahasa, Provinsi Sulawesi Utara. Kemudian dilanjutkan Penelitian di

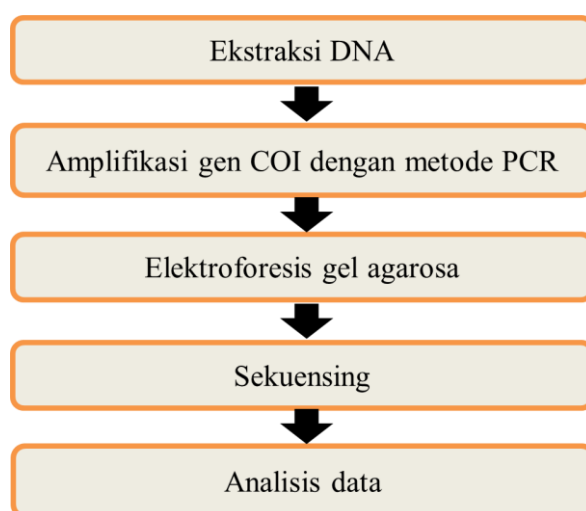
laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi Manado.

### **Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini terbagi menjadi dua, yaitu saat berada di lapangan dan di laboratorium. Alat yang digunakan di lapangan berupa *insectnet* (jaring serangga), box kecil, botol sampel, dan GPS (*Global Positioning System*) yang digunakan pada saat di laboratorium meliputi tabung Eppendorf 1,5 ml, mikropipet, termocycler, UV-Transilluminator, dan alat elektroforesis. Untuk bahan yang digunakan yaitu Genomic DNA Mini Kit (Geneaid), MyTaq HS Red Mix (Biodine), tips mikropipet, ddH<sub>2</sub>O, 2 pasang primer forward dan reverse gen COI, bubuk agarosa (Vivantis), Buffer TBE (Tris-Boric EDTA) 1X, dan DNA Ladder 1 kb.

### **Rancangan Penelitian**

Alur penelitian dimulai dari pengambilan sampel serangga di lapangan. Penelitian dilanjutkan di laboratorium untuk melakukan ekstraksi DNA, amplifikasi gen COI (menggunakan metode PCR), dan elektroforesis gel agarose. Sampel yang berhasil diamplifikasi dikirim untuk dilakukan sekuensing. Hasil sekuensing disunting dan dilakukan analisis data.



Gambar 1: Rancangan Penelitian

### **Pengambilan Sampel Serangga**

Sampel serangga akan diambil di Desa Kiniar, Kecamatan Tondano Timur, Kabupaten Minahasa. Pengambilan sampel serangga dilakukan secara eksploratif sehingga hanya mengambil serangga yang bisa ditemukan di area yang dapat diakses. Sampel serangga yang sudah diperoleh dimasukkan ke dalam botol sampel dan dimasukkan ke dalam box yang sudah disediakan untuk ekstraksi DNA dan diamati morfologinya.

### **Ekstraksi DNA Serangga**

Proses ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *genomic DNA Mini Kit (Geneaid)* yang dimodifikasi berdasarkan Kolondam *et al.* (2013). Mengambil sampel serangga yang dikumpulkan, dimulai dengan labeling sampel (MAHH, MACH, MAHC). Setelah itu persiapkan sampel (serangga) untuk dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang sudah diberikan label, dan ditambahkan 400  $\mu$ l buffer GP1 (larutan lisis). Untuk menghancurkan dinding sel, sampel serangga digerus sampai hancur agar DNA terpisah dari sel, kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 15 menit dalam termoblok. Setelah itu sebanyak 100  $\mu$ l buffer GP2 ditambahkan ke dalam masing-masing tabung dan diinkubasi dalam *freezer* selama 2 menit. Sampel disentrifugasi 10.000 rpm selama satu menit dan supernatant dituang ke dalam tabung Eppendorf yang baru.

Tahap selanjutnya yaitu pengikatan DNA pada *spin filter* (GP column). Sampel ditambahkan dengan 750  $\mu$ l GP3, kemudian diinversikan sebanyak 5 kali. *Spin filter* diletakkan ke tabung koleksi (2 ml) kemudian 700  $\mu$ l sampel dipindahkan ke dalam *spin filter*, lalu disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Filtrat di buang dan *spin filter* diletakkan kembali pada tabung penerima.

Tahap selanjutnya yaitu pencucian yang dilakukan dengan menambahkan 400  $\mu$ l buffer W1 dan di sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama satu menit. 600  $\mu$ l *Wash buffer* (larutan pencuci) ditambahkan ke dalam kolom dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama satu menit. Filtrat dibuang untuk menghilangkan etanol, kemudian *spin filter* diletakkan pada tabung penerima yang baru dan disentrifugasi pada kecepatan maksimal (15.000 rpm) selama 2 menit. Tutup tabung dibuka dan dikeringkan selama 2 menit. DNA dielusi dengan cara menempatkan *spin filter* pada tabung Eppendorf

baru dan ditambahkan dengan 100 µl *Elution Buffer* ke membran silica dalam kolom, diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama satu menit. DNA murni yang diperoleh disimpan dalam *freezer* untuk digunakan pada proses PCR.

### **Amplifikasi Gen COI dengan Metode PCR**

Proses amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR *Tpersonal* (Biometra). Proses amplifikasi terlebih dahulu dilakukan dengan membuat *Master Mix* PCR di dalam 40 µL reaksi PCR. Beberapa komponen dicampur untuk satu kali reaksi yaitu 20 µL 2x *May Taq HS Red Mix* (Bioline), 1,5 µL primer *forward*, 1,5 µL primer *reverse*, 1,5 µL ddH<sub>2</sub>O (air terdeionisasi) dan 2 µL template DNA. Pasangan primer yang digunakan untuk amplifikasi gen COI yaitu LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') dan HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAG AAT CA-3') (Folmer *et al.*, 1994). Amplifikasi yang tidak berhasil menggunakan primer Folmer *et al.* (1994), maka digunakan primer berdasarkan Ivanova *et al.* (2007), yaitu FF2d (5'-TTC TCC ACC AAC CAC AAR GAY ATY GG-3') dan FR1d (5'-CAC CTC AGG GTG TCC GAA RAA YCA RAA-3'). Tahapan dalam proses amplifikasi PCR dimulai dengan pengaturan suhu denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer (*primer annealing*) pada suhu 50°C selama 30 detik, elongasi (ekstensi) DNA pada suhu 72°C selama 50 detik, dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 1 menit (Kolondam, 2015).

### **Elektroforeis**

Untuk membuat gel agarosa 0,8%, sebanyak 0,8gram agarose powder ditambahkan sampai 100 mL dengan Buffer TBE (*Tris-Bonic EDTA*) 1X lalu dididihkan dan dituang dalam cetakan. Gel agarosa dicetak menggunakan sisirnya (*comb*) untuk mebentuk sumuran-sumuran (*wells*). Setelah mengeras, gel dimasukkan ke dalam bak alat elektroforesis yang telah digenangi dengan buffer TBE 1X. DNA *Ladder* digunakan untuk mengetahui kisaran ukuran pita DNA dalam gel agarosa. Loading dye dipipet sebanyak 10 µL dan dimasukkan ke dalam sumuran pertama. Produk PCR (yang sudah mengandung loading dye dalam kit PCR)

dipipet ke dalam sumur berikutnya. Alat elektroforesis diberikan tegangan listik 100 Volt selama 30 menit. Gel agarose direndam dalam larutan berisi ethidium bromide selama 10 menit dan divisualisasi menggunakan UV-Transiluminator. Dokumentasi hasil elektroforesis dilakukan dengan menggunakan smartphone.

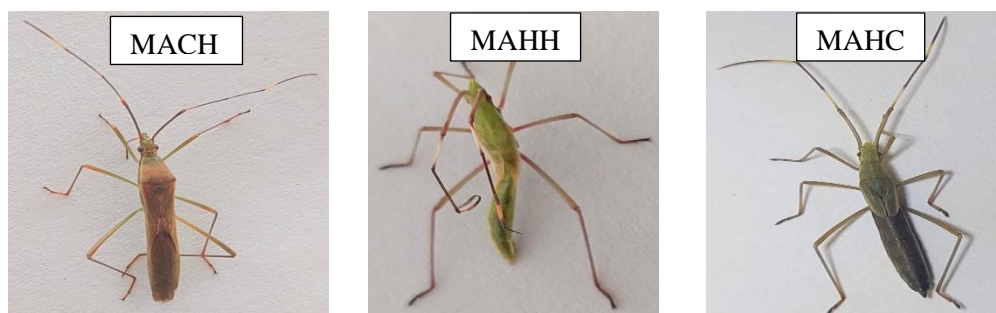
### **Sekuensing dan Analisis Data**

Data hasil sekuensing disunting menggunakan software *Geneious V.5.6* (Drummond *et al.*, 2015). Sekuensing dilakukan sebanyak dua kali dari arah yang berbeda (forward dan reverse), sesuai dengan primer yang tersedia. Hasil sekuensing berupa urutan-urutan DNA yang dibaca dengan menggunakan metode BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) untuk mencari sekuens yang serupa (homolog) yang tersedia di GenBank. Hasil data sekuensing yang berupa kromatogram data urutan sekuens DNA disunting dengan menggunakan software *Geneious v5.6.4* (Drummond *et al.*, 2015). Utas *reverse* dilakukan proses “*reverse and complement*”, kemudian dijajarkan dengan utas forward menggunakan algoritma MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) seperti yang dilakukan Kolondam (2015). Sekuens primer dihilangkan dari bagian hulu dan hilir yang menyisakan sekuens gen COI. Sekuens gen COI (tanpa primer) diubah dalam bentuk FASTA (*Fast Alignment*) dan digunakan untuk mencari sekuens serupa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Deskripsi Morfologi Sampel**

Berdasarkan hasil pengambilan sampel di persawahan Desa Kiniar, diperoleh 30 individu serangga walang sangit yang kemudian dikelompokkan menjadi tiga morfotipe berdasarkan perbedaan warna tubuh, yaitu MAHH (Mira Astriani – Hijau – Hijau), MACH (Mira Astriani – Coklat – Hijau) dan MAHC (Mira Astriani – Hitam – Coklat) sesuai warna secara morfologi. Pengelompokan ini menunjukkan adanya variasi fenotipik dalam populasi yang sama, yang secara awal dapat mengindikasikan keberadaan lebih dari satu spesies atau variasi intraspesifik dalam genus *Leptocorisa*.



Gambar 2: Morfologi spesimen ketiga serangga yang ditemukan

Secara morfologi, ketiga morfotipe menunjukkan karakter umum famili Alydidae, seperti tipe mulut menusuk-menghisap, antena filiform, dan tubuh memanjang. Namun, perbedaan warna tubuh yang digunakan sebagai dasar klasifikasi lapangan memiliki keterbatasan dalam menentukan identitas spesies secara akurat, karena karakter tersebut bersifat variabel dan dapat dipengaruhi oleh fase perkembangan maupun kondisi lingkungan.

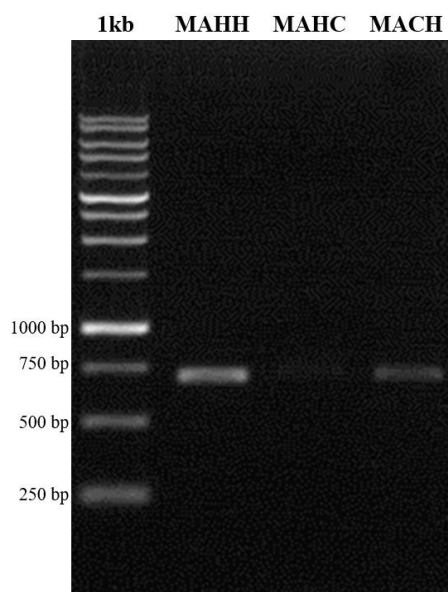
Hasil identifikasi awal di lapangan menunjukkan kemiripan morfologi dengan beberapa spesies dalam genus *Leptocorisa*, khususnya *Leptocorisa oratoria*, *Leptocorisa chinensis*, dan *Leptocorisa acuta*. Namun, kemiripan karakter morfologi antarspesies dalam genus ini menyulitkan proses identifikasi berbasis morfologi saja, terutama ketika hanya menggunakan karakter eksternal seperti warna tubuh.

Temuan ini mengindikasikan bahwa pendekatan morfologi memiliki keterbatasan dalam membedakan spesies walang sangit secara presisi. Oleh karena itu, diperlukan pendekatan molekuler melalui DNA barcoding untuk mengkonfirmasi identitas spesies dan menghindari potensi kesalahan identifikasi yang dapat terjadi akibat kemiripan morfologi antarspesies.

### **Elektroforesis Gel Agarosa Produk PCR**

Amplifikasi gen COI menunjukkan keberhasilan yang berbeda antar sampel. Sampel MAHH dan MACH berhasil diamplifikasi menggunakan primer universal LCO1490 dan HCO2198, sedangkan sampel MAHC tidak menunjukkan hasil amplifikasi dengan primer tersebut dan baru berhasil diamplifikasi setelah menggunakan primer alternatif (FF2d dan FR1d). Perbedaan ini mengindikasikan adanya kemungkinan variasi pada daerah target primer atau kualitas DNA template yang berbeda antar sampel.

Hasil elektroforesis memperlihatkan bahwa pita DNA pada sampel MAHH tampak jelas, sedangkan pada MACH dan MAHC terlihat lemah. Intensitas pita DNA yang rendah pada MACH dan MAHC menunjukkan kemungkinan konsentrasi DNA template yang rendah atau adanya degradasi DNA selama proses ekstraksi. Kondisi ini berimplikasi langsung terhadap kualitas hasil sekuensing, karena DNA dengan konsentrasi rendah atau kualitas buruk cenderung menghasilkan data sekuens dengan tingkat kepercayaan yang rendah.



Gambar 3: Elektroforesis gel agarosa 0,8% dari tiga produk PCR.

Perbedaan kualitas pita DNA ini konsisten dengan hasil sekuensing, di mana sampel MAHH menghasilkan data dengan kualitas tinggi, sementara MAHC menunjukkan kualitas sekuens yang sangat rendah dan tidak dapat dianalisis lebih lanjut. Dengan demikian, keberhasilan amplifikasi tidak hanya ditentukan oleh kecocokan primer, tetapi juga sangat dipengaruhi oleh kualitas DNA template yang digunakan.

Temuan ini menunjukkan bahwa variasi kualitas DNA antar sampel dapat menjadi faktor pembatas dalam analisis molekuler, dan perlu diperhatikan dalam interpretasi hasil, terutama ketika sebagian data tidak dapat digunakan untuk analisis lanjutan.

### **Hasil sekuensing menggunakan Gen COI**

Hasil sekuensing menunjukkan adanya perbedaan kualitas data yang signifikan antar sampel. Sampel MAHH dan MACH menghasilkan sekuens dengan kualitas tinggi,

ditunjukkan oleh nilai *High Quality* (HQ%) di atas 93% untuk kedua arah pembacaan (forward dan reverse) serta panjang sekuens yang konsisten ( $\pm 650$  bp). Sekuens sampel serangga walag sangit disunting menggunakan piranti lunak *Geneious* v.5.6.4. Nilai ini mengindikasikan bahwa data sekuens yang dihasilkan reliabel dan layak digunakan untuk analisis lanjutan, termasuk identifikasi spesies dan konstruksi filogenetik.

Tabel 1: Kualitas Sekuensing Serangga Walang Sangit

No.	Sampel	Primer	Arah Sekuensing	Kualitas sekuensing (HQ%)	Panjang Sekuens (bp)
1	MAHH	LCO1490	Forward	95,4	653
		HCO2198	Reverse	93,7	651
2	MACH	LCO1490	Forward	96,5	651
		HCO2198	Reverse	95,1	658
3	MAHC	FF2d	Forward	0,0	686
		FR1d	Reverse	1,6	760

Sebaliknya, sampel MAHC menunjukkan kualitas sekuens yang sangat rendah, dengan nilai HQ% mendekati 0% pada kedua arah pembacaan. Nilai ini menunjukkan bahwa sinyal kromatogram tidak dapat dibedakan secara jelas, sehingga urutan nukleotida yang dihasilkan tidak dapat diinterpretasikan secara akurat. Kondisi ini mengindikasikan kegagalan dalam memperoleh data sekuens yang valid, yang kemungkinan disebabkan oleh kualitas DNA template yang rendah atau degradasi DNA. Perbedaan kualitas sekuens ini konsisten dengan hasil elektroforesis sebelumnya, di mana sampel MAHC juga menunjukkan pita DNA yang lemah. Hal ini memperkuat indikasi bahwa kualitas DNA awal menjadi faktor penentu keberhasilan analisis molekuler secara keseluruhan.

Dengan demikian, hanya sampel MAHH dan MACH yang memenuhi kriteria kualitas untuk dianalisis lebih lanjut. Implikasi dari temuan ini adalah bahwa interpretasi identitas molekuler spesimen dalam penelitian ini secara efektif didasarkan pada dua sampel yang valid, sementara sampel MAHC tidak dapat digunakan dalam analisis lanjutan. Sekuens berkualitas tinggi dari MAHH dan MACH kemudian digunakan untuk analisis kesamaan sekuens melalui BLAST terhadap database GenBank. Hasil ini menjadi dasar dalam penentuan identitas spesies serta analisis hubungan kekerabatan antar spesimen.

## MAHH

Sampel MAHH berhasil di sekuens dan menunjukkan hasil yang bagus sehingga dapat digunakan untuk percocokan data di NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Hasil ini dapat dilihat pada Tabel 2. Sekuensing sampel MAHH memiliki kemiripan dengan spesimen *Leptocorisa oratoria* dengan nomor aksesori OM177217.1 (Pandi *et al.*, 2022) dari India, OL697750.1 (Dong *et al.*, 2021) dari China, dan OL739349.1 (Yakoop, 2021) dari Malaysia. Menurut Wehantouw (2017), nilai presentase kemiripan yang melebihi 90% dan kisaran nilai presentase panjang nukleotida selaras (*Query cover*) sebesar 98-100% menunjukkan bahwa sekuens memiliki nilai homologi yang tinggi.

Tabel 2: Hasil sekuens MAHH melalui BLAST

No.	Deskripsi	Query Cover (%)	Max. Identity (%)	Acc. Number	Referensi
1	<i>Leptocorisa oratoria</i> (India)	100	100	OM177217.1	Pandi <i>et al.</i> , 2022
2	<i>L. oratoria</i> (China)	100	100	OL697750.1	Dong <i>et al.</i> , 2021
3	<i>L. oratoria</i> (Malaysia)	99	100	OL739349.1	Yakoop, 2021
4	<i>L. vericornis</i> (India)	95	99,36	KX351389.1	Kuotsu <i>et al.</i> , 2016

Berdasarkan pengamatan secara morfologi sampel MAHH umumnya ditemui di Indonesia, yang diduga mempunyai kemiripan dengan spesies *L. oratorius*. Ciri khas dari spesies ini adalah berwarna coklat kehitaman pada lateral ventral tubuhnya, tubuhnya berbentuk *robust* (lonjong) dengan sayap membraneous, untuk tubuhnya mempunyai warna yang bervariasi dari hijau untuk pertumbuhan masa nimfa, dan kecoklatan untuk imago. Kemudian untuk ukuran bentuk tubuh pada jantan lebih besar dari pada betina, panjang tubuh betina antara 17,50-18,00 mm dan lebar tubuh betina antara 2,40-3,00 mm, sedangkan panjang tubuh jantan antara 18,00-19,50 mm dan lebar antara 1,95-2,00 mm. Rentang hidup walang sangit mencapai 50 – 83 hari (Ramadhan *et al.*, 2022).

## MACH

Pembacaan BLAST menunjukkan bahwa Sampel MACH teridentifikasi sebagai spesies *Leptocorisa chinensis* dengan nilai kemiripan tertinggi yaitu *Leptocorisa chinensis* dengan nomor aksesori OL697730.1 (Pandi *et al.*, 2022) dari India dengan nilai kemiripan 99,85%. Ditemukan tiga sekuens spesies *Leptocorisa oratoria* yang berasal dari genus yang sama dengan nilai kemiripan sebesar 99,54%-99,70%, serta diikuti oleh *Leptocorisa vericornis* dengan nilai kemiripan 99,36% dan *Liorhysus hyalinus* nilai kemiripan 85,71%.

Tabel 3: Hasil sekuens MACH melalui BLAST

No.	Deskripsi	Query Cover (%)	Max. Identity (%)	Acc. Number	Referensi
1	<i>Leptocorisa chinensis</i> (India)	100	99,85	OL697730.1	Pandi <i>et al.</i> ,2022
2	<i>L. oratoria</i> (China)	100	99,70	OM177217.1	Dong <i>et al.</i> ,2021
3	<i>L. oratoria</i> (Malaysia)	99	100	OL739349.1	Yakoop, 2021
4	<i>L. vericornis</i> (India)	95	99,36	KX351389.1	Kuotsu <i>et al.</i> ,2016
5	<i>Liorhysus hyalinus</i> (Jerman)	100	85,71	KM022038.1	Raupach <i>et al.</i> , 2014

*Leptocorisa chinensis* adalah spesies serangga dari keluarga *Alydidae*, yang dikenal sebagai “katydid padi” atau “paddy bug”, yang sering mengisap biji padi. Serangga ini memiliki tubuh ramping dengan warna coklat kehijauan dan panjang sekitar 14-17 mm. Kepalanya memiliki dua tonjolan kecil di sisi kiri dan kanan, serta antena yang panjang dan ramping. sayapnya transparan dengan urat-urat yang jelas terlihat. Kaki-kakinya panjang dan ramping, dengan kaki belakang cenderung lebih panjang dari kaki lainnya. Serangga ini mempunyai karakteristik garis hitam pada sayap hingga mencapai ujung sayap. Pada tubuh bagian atas memiliki garis hitam memanjang, sedangkan tubuh bagian bawah berwarna kuning kehijauan, serta memiliki duri kecil pada kaki bagian belakang. *Leptocorisa chinensis* merupakan serangga yang mempunyai ciri-ciri spesifik, untuk panjang sayap ukurannya 8-12 mm, lebar sayap 3-5 mm, kemudian jumlah garis hitam pada sayap 3-5 garis, dan ujung sayap

berbentuk membulat. Serangga ini mempunyai perbedaan dengan spesies serupa yaitu *Leptocorisa oratoria* memiliki garis hitam lebih panjang pada sayapnya, sedangkan *leptocorisa varicornis* memiliki warna tubuh lebih terang dan garis hitam lebih tipis (Pandi *et al.*, 2022).

### **Genetik Distance**

Analisis jarak genetik dilakukan untuk mengevaluasi tingkat perbedaan evolusioner antar sampel dan dengan spesies referensi. Perhitungan berbasis matriks jarak genetik memungkinkan estimasi kedekatan hubungan kekerabatan berdasarkan perbedaan pasangan basa dalam sekuens DNA (Monalisa *et al.*, 2019).

Hasil analisis menunjukkan bahwa sampel MAHH memiliki nilai jarak genetik sebesar 0,000 terhadap *Leptocorisa oratorius*. Nilai ini menunjukkan tidak adanya perbedaan sekuens pada fragmen gen COI yang dibandingkan, sehingga mengindikasikan tingkat kesamaan genetik yang sangat tinggi. Dengan demikian, hasil ini secara kuat mendukung identifikasi MAHH sebagai *L. oratorius*.

Sementara itu, sampel MACH menunjukkan jarak genetik sebesar 0,016 terhadap *Leptocorisa chinensis*. Nilai ini masih berada dalam kisaran jarak genetik antar spesies yang berkerabat dekat dalam satu famili, namun tidak menunjukkan identitas yang identik. Berdasarkan interpretasi jarak genetik, nilai ini mengindikasikan bahwa MACH memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *L. chinensis*, tetapi kemungkinan merupakan variasi genetik yang berbeda atau bahkan spesies yang berbeda dalam genus yang sama. Hal ini sejalan dengan pernyataan bahwa semakin kecil nilai jarak genetik, maka semakin dekat hubungan kekerabatan antar organisme, namun tidak selalu menunjukkan identitas spesies yang sama (Tallei *et al.*, 2016).

Jarak genetik antara MAHH dan MACH sebesar 0,032 menunjukkan adanya perbedaan genetik yang lebih besar dibandingkan jarak masing-masing terhadap spesies referensi. Nilai ini berada di atas kisaran variasi intraspesifik yang dilaporkan pada *L. oratorius* di Asia Tenggara, yaitu sekitar 0,001–0,005 (Kumar *et al.*, 2018), sehingga mengindikasikan bahwa kedua sampel tersebut kemungkinan besar berasal dari spesies yang berbeda.

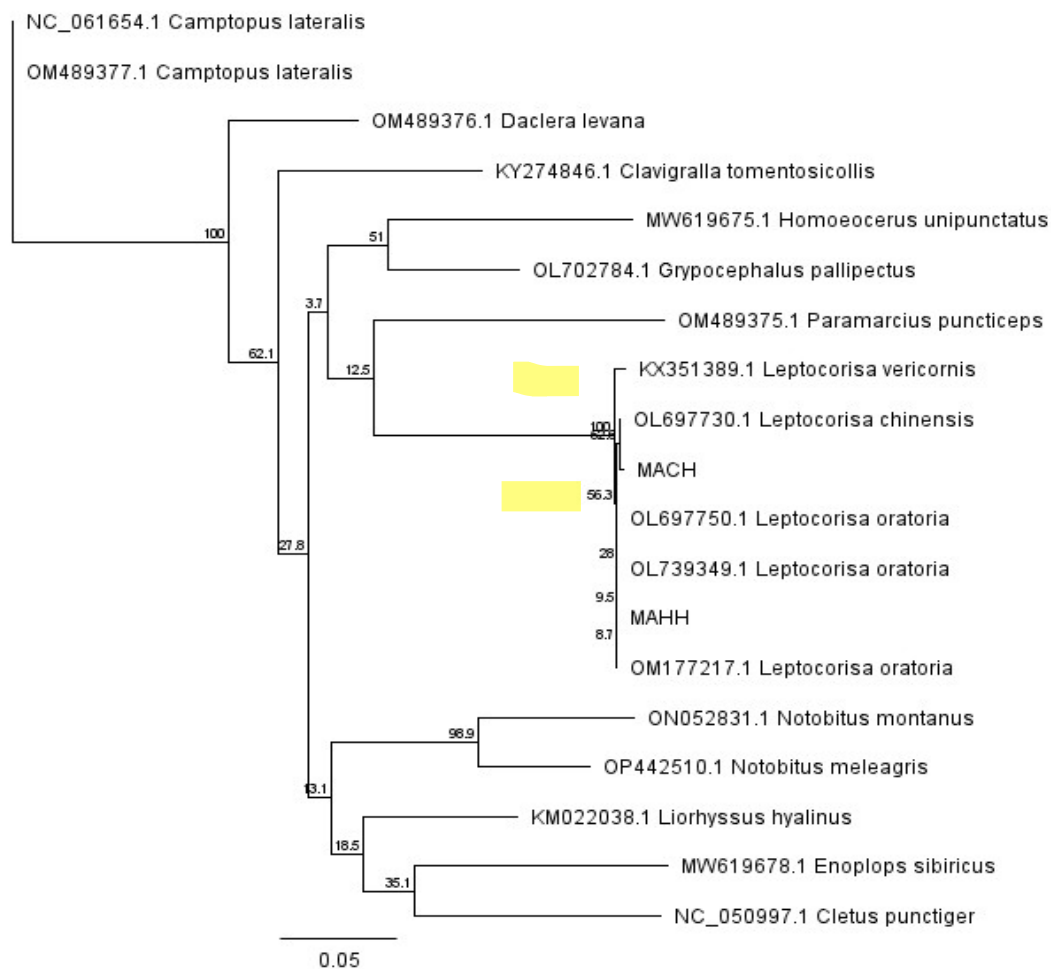
Selain itu, perbandingan dengan spesies lain seperti *Leptocorisa vericornis* dan *Leptocorisa chinensis* menunjukkan rentang jarak genetik yang lebih luas (0,016–0,064), yang memperkuat adanya variasi genetik antar spesies dalam genus *Leptocorisa*. Dengan demikian, meskipun secara morfologi sampel menunjukkan kemiripan, analisis molekuler mampu mengungkap adanya perbedaan genetik yang signifikan.

Temuan ini menegaskan bahwa penggunaan DNA barcoding berbasis gen COI efektif dalam membedakan spesies yang memiliki kemiripan morfologi tinggi, serta memberikan resolusi yang lebih akurat dalam analisis kekerabatan dibandingkan pendekatan morfologi semata.

### **Filogenetik**

Analisis filogenetik dilakukan untuk mengevaluasi hubungan kekerabatan antar sampel berdasarkan kesamaan sekuens gen COI. Pohon filogenetik yang dikonstruksi menunjukkan bahwa sampel MAHH dan MACH berada dalam satu kelompok besar (*cluster*) bersama spesies dalam genus *Leptocorisa*, yang mengindikasikan bahwa kedua sampel tersebut termasuk dalam kelompok taksonomi yang sama.

Namun demikian, meskipun berada dalam satu cluster, posisi MAHH dan MACH tidak berada pada cabang yang identik. Sampel MAHH berkelompok langsung dengan *Leptocorisa oratorius*, yang konsisten dengan nilai jarak genetik sebesar 0,000, sehingga memperkuat identifikasi bahwa MAHH merupakan spesies tersebut.



Gambar 4: Pohon Filogeni sekuens MAHH dan MACH beserta kerabatnya

Sebaliknya, sampel MACH berada pada cabang yang berdekatan dengan *Leptocorisa chinensis*, tetapi tidak menunjukkan pengelompokan yang identik. Hal ini sejalan dengan nilai jarak genetik sebesar 0,016 yang menunjukkan kedekatan, namun tidak cukup untuk menyatakan bahwa keduanya merupakan spesies yang sama. Dengan demikian, posisi filogenetik MACH mendukung interpretasi sebelumnya bahwa sampel ini memiliki hubungan kekerabatan dekat dengan *L. chinensis*, tetapi kemungkinan merupakan entitas genetik yang berbeda.

Keberadaan MAHH dan MACH dalam satu cluster yang sama, namun pada cabang yang berbeda, menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut masih berada dalam satu genus, tetapi memiliki divergensi genetik yang cukup untuk dipisahkan pada tingkat spesies. Hal ini konsisten dengan nilai jarak genetik antar keduanya sebesar 0,032 yang berada di atas kisaran

variasi intraspesifik (Kumar et al., 2018).

Sementara itu, spesies seperti *Paramarcus puncticeps* dan *Grypocephalus pallipectus* berada pada cabang yang terpisah dari kelompok *Leptocorisa*, yang menunjukkan perbedaan genetik yang lebih besar. Nilai jarak genetik yang tinggi (0,156–0,192) memperkuat bahwa spesies tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang jauh dan berada di luar kelompok genus yang sama.

Secara keseluruhan, analisis filogenetik tidak hanya mengonfirmasi hasil identifikasi berbasis jarak genetik, tetapi juga menunjukkan pola divergensi antar spesies dalam genus *Leptocorisa*. Pendekatan ini memperkuat bahwa kombinasi analisis jarak genetik dan filogenetik memberikan interpretasi yang lebih komprehensif dalam menentukan hubungan kekerabatan dibandingkan penggunaan salah satu metode secara terpisah (Dharmayanti, 2011).

## **KESIMPULAN**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka di dapatkan kesimpulan sebagai berikut: Pertama, Spesies-spesies serangga walang sangit yang ditemukan dari Desa Kiniar Kecamatan Tondano Timur, Berdasarkan hasil identifikasi molekuler menggunakan DNA barcoding yaitu *Leptocorisa oratoria* dan *Leptocorisa chinensis* dari sampel MAHH dan MACH. Kedua, Serangga walang sangit berdasarkan Gen COI memiliki hasil sekuensing yang baik dari sampel yang di temukan yaitu MAHH dan MACH. Sekuensing sampel MAHH memiliki kemiripan dengan spesies *Leptocorisa oratoria* dengan nomor aksesori OM177217.1 presentase kemiripan sebesar 100%, sedangkan Sekuensing sampel MACH memiliki kemiripan dengan spesies *Leptocorisa chinensis* dengan nomor aksesori OL697730.1 presentase kemiripan sebesar 99,85%.

## **REFERENSI**

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. dan Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389-3402.
- Bangol, I., Momuat, L. I., & Kumaunang, M. (2014). Barcode DNA Tumbuhan Pangi (*Pangium edule R.*) Berdasarkan gen matK. *Jurnal MIPA*, 3(2), 113. doi: 10.35799/jm.3.2.2014.5862.

- Casiraghi, M., Galimberti, A., Sandionigi, A., Bruno, A., & Bellati, A. (2015). DNA barcoding in mammals: what's new and where next? *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*.
- Dharmayanti, N.L.P.I., 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa21* (1):1-10
- Dong, X, Wang, Y., & Liu, X. (2021). Taxonomic study on the genus *Leptocoris* (Hemiptera: Alydidae) from China. *Journal of Insect Science*, 21(3), 537-553.
- Fatchiyah, N. (2011). Faktor-faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Amplifikasi DNA dengan Teknik PCR. *Jurnal Bioteknologi dan Biologi Molekuler*, 18(3), 123-134.
- Galan, G. Mendez, N. dan Cruz R.Y.D. 2018. DNA Barcoding of Three Selected Gastropod Species Using Cytochrome Oxidase (COI) Gene. *Annals of West University of Timisoara, Ser. Biology* 21(1): 93–102.
- Harahap, I.S. dan Tjahyono. 1992. Pengendalian Hama Penyakit Padi. Penebar Swadaya : Jakarta.
- Hasegawa, H. (1997). *Pest control and insect biodiversity in Southeast Asia*. Tokyo: Japan Agricultural Research Quarterly.
- Ivanova, N. V., Zemplak, T. S., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. N. (2007). *Universal primer cocktails for fish DNA barcoding*. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 544–548. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01748>.
- Kolondam, B. J. 2015. Applying matK Gene for Identification of Liliopsida Plant Species From North Sulawesi Through Bold Systems. *International Journal Of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 6(2): 242-245.
- Kuotsu, K., Yang, C. M., & Chen, X. P. (2016). Revision of the genus *Leptocoris* (Hemiptera: Alydidae) from China. *Zootaxa*, 4083(3), 301-324.
- Kusnaedi. 1997. Pengendalian Hama Tanpa Pestisida. Penebar Swadaya :Jakarta.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms*. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Litsinger, J. A., Bandong, J. P., Canapi, B. L., & Lumaban, M. D. (2015). Response of *Leptocoris oratoria* (Hemiptera: Alydidae) to rice varieties and insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 108(4), 1751-1761.
- Mandanayake, T. A., Schaefer, C. W., & Ahmad, I. (2014). *Taxonomic review and identification key to the rice bug (Hemiptera: Alydidae) species of South and Southeast Asia*. *Journal of Entomology and Nematology*, 6(4), 56–65.
- Monalisa, S., Setyawan, A. D., & Suryanto, A. (2019). Analisis filogenetik ikan tuna (*Thunnus spp*) di perairan Maluku Utara menggunakan COI. *BIOMA: Jurnal Biologi Makassar*, 4(2), 114-122.
- Pandi, F., Zhang, Y., & Chen, X. (2022). Taxonomic study on the genus *Leptocoris* (Hemiptera: Alydidae) from China. *Journal of Insect Science*, 22(2), 257-274.

- Rahayu DA, dan Jannah M. 2019. *Dna Barcode Hewan dan Tumbuhan Indonesia*. Jakarta Selatan: Yayasan Inspirasi Ide Berdaya.
- Ramadhan, A., Suwignyo, A., & Wibowo, A. (2022). *Identifikasi perilaku walang sangit (Leptocorisa oratorius) di Kebun Biologi FMIPA UNY*. *Jurnal Edukasi Biologi*, 8(1), 85–93.
- Raupach, M. J., et al. (2014). Molecular phylogeny and systematics of the genus *Liorhyssus* (Hemiptera: Rhopalidae). *Systematic Entomology*, 39(2), 261-274.
- Tallei, T.E. dan B.J. Kolondam. 2015. DNA barcoding of Sangahe Nutmeg (*Myristica fragrans*) using matK gene. *HAYATI Journal of Biosciences* 22(1): (41-47. DOI: 10.4308/hjb.22.1.41)
- Untung, K. 2010. Diktat dasar-dasar ilmu hama tanaman. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan UGM.
- Wehantouw, F. (2017). *Identifikasi sirip ikan hiu yang didapat dari pengumpul di Minahasa Utara menggunakan metode DNA barcoding*. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 5(1), 1–8.
- Yakoop, M. (2021). Identification and characterization of *Leptocorisa oratoria* (Hemiptera: Alydidae) in Malaysia. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(3), 123-128.