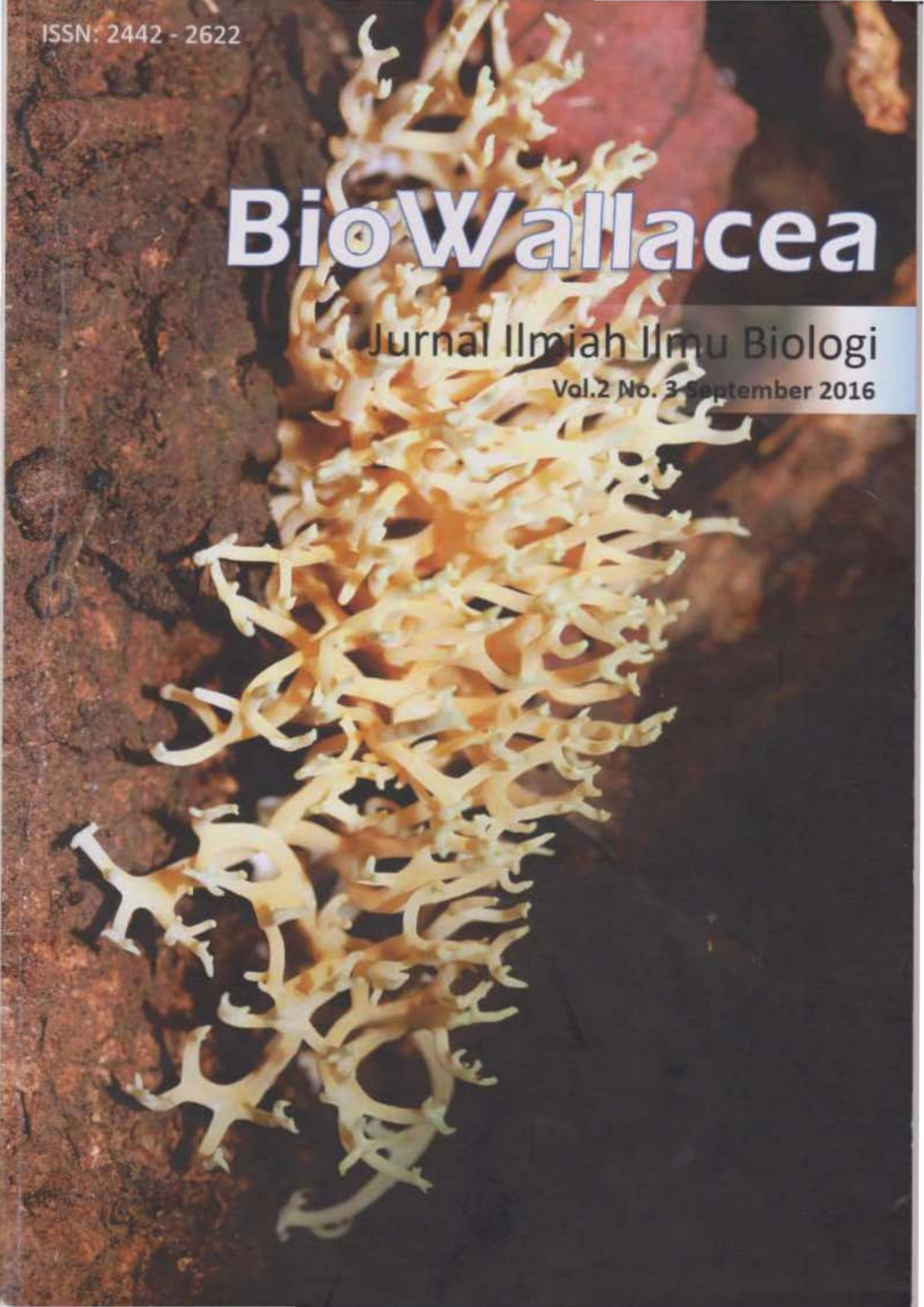


ISSN: 2442 - 2622

BioWallacea

Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi

Vol.2 No. 3 September 2016



ISSN: 2442-2622

BioWallacea

Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi

Vol. 2 No. 3 September 2016

Ketua Dewan Editor

Faturrahman (~2017)

Editor Pelaksana

Immy Suci Rohyani (~2017)

Dewan Editor

I Made Sudarma (~2017), Surya Hadi (~2017), Islamul Hadi (~2017), I Wayan Suana (~2017), Galuh Tresnani (~2017), Aida Muspiah (~2017), Suropto (~2017), Evy Aryanti (~2017), Hilman Ahyadi (~2017), Mursal Ghazali (~2017), Sukiman (~2017), dan Sri Puji Astuti (~2017)

Teknik Editor

Muhsinul Ihsan (~2017), Lalu Achmad Tantilar WSK. (~2017), Supriadi (~2017), dan Novita Hidayatun Nufus (~2017)

Menejer Bisnis

Rina Kurnianingsih (~2017)

Penerbit

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram

Alamat Redaksi

Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Mataram, Jalan Majapahit No. 62 Mataram;
Telp/Fax : 0370-646506; Email : biologi.fmipa@unram.ac.id; Twitter : [biologifmipaunram](#);
Fb : [biologifmipa universitas mataram](#)

DAFTAR ISI

BioWallacea

Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi
Vol. 2 No. 3 September 2016

Artikel

- KAJIAN PERDAGANGAN SATWA LIAR JENIS BURUNG
DI WILAYAH MATARAM DAN SEKITARNYA
Maier Syaputra 148-152
- KELIMPAHAN DAN KEANEKARAGAMAN ARTHROPODA
TANAH PADA LAHAN PERTANIAN MONOKULTUR DAN
POLIKULTUR DI DESA LABAT KUPANG
Chatarina Gradiet Semiun¹, 153-160
Stefanus Stanis
- DETEKSI MOLEKULER PATOGEN ULATSUTERA (*Bombyx
mori* L) PASCA EPIDEMI PENYAKIT PEBRIN (TAHUN 2010-
2014)
Sitti Nuraeni 161-166
- UJI PEMANFAATAN PUPUK HAYATI MONplus TERHADAP
BIOMASA TANAMAN CAISIM (*BRASSICA* SP.)
Elsanti, Surono Dan Lia 167-173
Fitria
- IDENTIFIKASI MAKANAN ALAMI DALAM LAMBUNG
LOBSTER FASE JUVENIL UNTUK MENOPANG
BUDIDAYA LOBSTER YANG BERKELANJUTAN DI
PULAU LOMBOK
Muhsinul Ihsan, Lalu 174-177
Achmad Tantilar Wangsajati
Sukmaring Kalih,
Muhammad Ali Ilyas
- KERAGAMAN SERTA DISTRIBUSI LOBSTER ANGGOTA
PALINURIDAE DAN SCYLLARIDAE DI PERAIRAN
PANTAI PULAU LOMBOK
Lalu Achmad Tan Tilar 178-189
Wangsajati Sukmaring Kalih,
Trijoko, Nyoman Puniawati
- FENOLOGI PEMBUNGAAN JARAK PAGAR (*JATROPHA
CURCUL.*) GENOTIPE UNGGUL NUSA TENGGARA
BARAT PADA KONDISI AGROKLIMAT DI LOMBOK
UTARA
Bambang Budi Santoso, Igm 190-196
Arya Parwata
- PERSENTASE PARASITASI PARASITOID TELUR WALANG
SANGIT (*Leptocorisa acuta*) PADA LAHAN PADI DENGAN
APLIKASI PESTISIDA DAN NON-PESTISIDA
Aisah Jamili, Sukmawati 197-201
Haerul Asro
- ETNOBOTANI TUMBUHAN OBAT DI DUSUN CIGUGUR,
KABUPATEN PANGANDARAN, JAWA BARAT
Siti Umi Salamah, Johan 202-210
Iskandar
- KEANEKARAGAMAN HAYATI TUMBUHAN BERPOTENSI
OBAT DI KARST RAMANG RAMANG KABUPATEN
MAROS PROVINSI SULAWESI SELATAN
Sri Suhadiyah, Sardi Andys, 211-221
Surni



DETEKSI MOLEKULER PATOGEN ULATSUTERA (*Bombyx mori* L) PASCA EPIDEMI PENYAKIT PEBRIN (TAHUN 2010-2014)

SITTI NURAENI

Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10
 TamalanreaMakassar 90 425, Sulawesi Selatan, Indonesia. Telp. +62-813-42681084, email:
nuraenisitti@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit pebrin dan grasseri pada ulatsutera sering menggagalkan panen kokon. Penyakit pebrin disebabkan oleh *Nosema bombycis* sedangkan grasseri disebabkan oleh *nuclearpolyhedrosis virus* (NPV). Tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi kedua patogen tersebut pasca epidemi penyakit pebrin. Pengambilan sampel dilakukan pada produsen bibit dan sentra pemeliharaan ulatsutera dan deteksi dilakukan dengan menggunakan teknik PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bibit yang dilepas oleh produsen dan beberapa sampel (telur, exuvia, pupa, sekremen dan tanah) tidak ditemukan *N. bombycis* dan NPV kecuali pada larva instar 5 dari pengambilan sampel petani pada bulan Juni 2014.

ABSTRACT

Pebrine diseases and grasseri are the important diseases of silkworm with significant yield loss. Pebrine disease caused by *Nosema bombycis* while grasseri caused by *nuclearpolyhedrosis virus* (NPV). The purpose of this study was to detect both pathogenic after pebrine disease epidemic. Sampling is done on seed producers and rearing bed of silkworm from farmer's and detection was done by using PCR. The results showed that the seeds are released by the producers and some samples (eggs, exuviae, secrement, pupae, soil) are not found pathogens except the fifth instar larvae taken from farmer's in June 2014.

Kata kunci : pebrin, grasseri, ulatsutera, deteksi, PCR.

PENDAHULUAN

Pada awal tahun 2010, ledakan penyakit pebrin kembali terjadi setelah kejadian pada tahun 1972-1973 (Gitosewojo 1995; Disperindag Sulsel 2006). Sebelum tahun 2010 tingkat serangan penyakit pebrin rata-rata di bawah 3 % tetapi tiba-tiba meningkat menjadi 72,42 % pada tahun 2010 (BPA 2013). Akibatnya pada akhir tahun 2010 beberapa sentra pemeliharaan melakukan moratorium pemeliharaan ulatsutera seperti di Kabupaten Enrekang, Soppeng, Wajo, Majalengka, Bogor dan beberapa sentra pemeliharaan di Jawa Barat dikarenakan oleh intensitas serangan penyakit yang sangat berat. Sampai pada akhir tahun tahun 2013, meskipun tingkat serangan telah menurun akan tetapi masih sulit untuk dikendalikan sampai di bawah 5 %. Upaya pengendalian penyakit pebrin dilakukan melalui pemeriksaan induk bebas penyakit sebelum telurnya dilepas ke petani. Seleksi telur melalui indukannya sebelum dijadikan bibit ulatsutera merupakan tindakan preventif. Bibit impor yang didatangkan dari luar juga dilakukan

pengujian telur oleh pihak Karantina Pertanian sebelum legal diperdagangkan di dalam negeri juga merupakan upaya preventif dan regulasi. Namun demikian penyakit pebrin ini masih sering ditemukan sampai pada pemeliharaan di petani. Menurut Hatakeyama dan Hayasaka (2003); Rao et al (2005); Bhat et al (2009); Hussain dan Buhroo (2011); Jyothi dan Patil (2011); Bhaskar (2013), patogen pebrin (*N. bombycis* Naegeli) dapat pula ditularkan melalui mulut melalui daun dari lingkungan pemeliharaan yang terkontaminasi.

Sementara upaya pengendalian penyakit grasseri sulit dilakukan karena tidak termasuk dalam prosedur pengendalian secara preventif. Penyakit grasseri bahkan lebih merugikan petani karena ulatsutera yang sakit akan terus aktif makan daun murbei. Gejala penyakit grasseri baru terlihat setelah larva matang siap mengokan dan segera mati berjatuh sebelum menghasilkan kokon. Petani tidak mendapatkan garansi bibit, kehilangan waktu, tenaga dan daun murbei tanpa mendapatkan hasil kokon. Menurut Guo-Ping

dan Xi-Jie (2011), fenomena kegagalan produksi karena serangan penyakit akan berdampak signifikan terhadap stabilitas serikultur dan juga pada animo masyarakat, sehingga studi tentang patologi ulatsutera dan penelitian terapan menjadi sangat penting.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah telur atau bibit yang akan atau sedang dipelihara oleh petani. Sumber bibit yang digunakan petani berasal dari BPA Bili-bili Kabupaten Gowa dan KPSA Perum Perhutani Kabupaten Soppeng. Bibit ulatsutera yang diproduksi adalah galur S01, S02, S03, BS09 dan C301. Sampel lainnya adalah telur dari petani yang telah disertifikasi, larva, pupa, exuviae, sekremen ulatsutera dan tanah disekitar ruang pemeliharaan yang dikumpulkan secara acak pada sentra pemeliharaan ulatsutera di Kabupaten Soppeng dan Wajo pada bulan Juni 2014.

Primer yang digunakan

Deteksi patogen *N. bombycis* dengan metode PCR mengacu pada metode dari Hatakeyama dan Hayasaka (2003) sedangkan untuk deteksi NPV mengacu pada metode dari Saez et al (2014). Primer yang digunakan adalah NBEF 35 *Forward* (5'ATG GAC GGT GTA AAG TTG CTG G3') dan NBEF957 *Reverse* (5-ACC ATY TCR TTR TGI GCI AC-3) dengan 922 pasang basa untuk produk genom *N. bombycis*. Primer ORF14 *Forward* (5'ATG GAC GGT GTA AAG TTG CTG G3') dan ORF14 *Reverse* (5'TCA AAA TCA ACG CCG TCG TC3') dengan 433 pasang basa untuk produk genom NPV.

Ekstraksi dan purifikasi DNA

Spora *N. bombycis* dan polyhedra diekstraksi dari telur ulatsutera menggunakan Metode KOH (Hatakeyama dan Hayasaka, 2003). Telur ditempatkan dalam tabung Eppendorf ditambahkan 500 µl KOH 30 %. Larutan sampel didiamkan selama 20 menit sampai warna telur ulatsutera berubah menjadi merah. Setelah terjadi perubahan warna, KOH telah dikeluarkan, dan telur ulatsutera dicuci dua kali dengan 500 µl air distilasi. Selanjutnya dinetralkan dengan 1M HCl untuk mencegah pembentukan garam. Telur ulatsutera kemudian dicuci dua kali lagi dengan air distilasi.

Metode ekstraksi DNA *N. bombycis* dan polyhedra NPV merujuk pada Qiagen *DNA Extraction*. DNA *N. bombycis* dan polyhedra NPV dilepaskan dari sel telur dengan menggunakan 20 µl proteinase-K dan 180 µl ATL buffer. Telur-telur dipecahkan menggunakan mikropestil tube kemudian divortex.

Selanjutnya diinkubasi pada suhu 56 °C selama 20 menit sampai terjadi lisis sempurna. Berikutnya ditambahkan AL buffer sebanyak 200 µl kemudian divortex dan diinkubasi kembali selama 10 menit. Sebelum disentrifus, tambahkan Etanol 96 % 200 µl lalu divortex kembali untuk memisahkan supernatan dengan material padatnya. Dengan menggunakan pipet supernatan dipindahkan ke *spin column* lalu disentrifus pada 8.000 rpm selama satu menit hingga terjadi pemisahan dimana DNA terkumpul pada saringan. *Spin column* dipindahkan ke *tube* baru lalu dicuci dengan menambahkan 500 µl AW1 buffer lalu disentrifus kembali pada 8000 rpm selama satu menit. Pencucian kembali dilakukan pada *tube* baru dengan menambahkan 500 µl AW2 buffer lalu disentrifus kembali selama 3 menit pada 14.000 rpm. Elusi DNA dengan menambahkan 200 µl AE buffer pada bagian tengah membran *spin column*. Selanjutnya diinkubasi selama satu menit pada suhu 25 °C kemudian disentrifus pada 8.000 rpm selama satu menit.

Elektroferosis

Agarose ditimbang 1,5 gr dan dilarutkan dalam 100 ml TAE buffer 1x dipanaskan hingga larut kemudian dimasukkan dalam kontainer pencetak agarose. Setelah memadat dimasukkan 8 µl produk PCR masing-masing sampel yang telah diamplifikasi ke dalam sumuran pada agarose, selanjutnya di *running* 100 V selama 50 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi dini pada bibit ulatsutera

Hasil amplifikasi sampel-sampel yang diuji untuk mendeteksi *N. bombycis* dan NPV dapat dilihat pada Tabel 1 dan pola elektroforesis gel agarose dari produk PCR dapat dilihat pada Gambar 1-2. Hasil amplifikasi sampel telur ulatsutera Galur S01, S02, S03, BS09 dan C301 dari produsen dan beberapa sampel telur dari petani pemelihara ulatsutera didapatkan hasil amplifikasi yang negatif. Demikian pula halnya dengan beberapa sampel dari lingkungan pemeliharaan petani, yaitu larva instar 3, pupa, exuviae, sekremen dan tanah juga menunjukkan yang hasil negatif.

Deteksi pada lingkungan pemeliharaan petani

Deteksi keberadaan patogen *N. bombycis* dan NPV pada sampel telur yang tidak menetas dan cangkang telur, larva instar 3, pupa, exuviae, sekremen dan tanah dari lingkungan pemeliharaan ulatsutera yang dikumpulkan secara acak pada sentra pemeliharaan petani sutera Kabupaten

Soppeng dan Wajo. Hasil amplifikasi beberapa sampel dari petani untuk mendeteksi *N. bombycis* dan NPV dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 3-4. Hasil amplifikasi PCR untuk deteksi *N. bombycis* hanya pada larva instar 5 (Gambar 3 kolom 2) menunjukkan hasil positif atau *N.*

Tabel 1. Hasil amplifikasi semua sampel untuk deteksi pathogen penting pada ulatsutera pasca epidemi penyakit pebrin

Sampel	Asal Sampel	Deteksi <i>Nosema bombycis</i>	Deteksi NPV
Telur Galur S01	Gowa	-	-
Telur Galur S02	Gowa	-	-
Telur Galur S03	Gowa	-	-
Telur Galur BS09	Soppeng	-	-
Telur C301	Soppeng	-	-
Telur	Soppeng	-	-
Telur	Impor	-	-
Larva instar 3	Wajo	-	-
Pupa	Gowa	-	-
Pupa	Soppeng	-	-
Exuviae	Soppeng	-	-
Sekreman tanah	Wajo	-	-
Larva instar 5	Soppeng	+	+



Gambar 1. Produk PCR deteksi *N. bombycis*. 1. Kontrol positif; 2. 100 bp DNA ladder; 3-5. Telur dari Galur S01, S02, dan S03 (dari produsen); 6-7. Telur dari Galur BS09 dan C301 (dari produsen); 8. Telur/bibit lokal dari pemeliharaan petani; 9. Telur impor dari pemeliharaan petani.

bombycis terdeteksi. Sedangkan hasil amplifikasi PCR untuk deteksi NPV hanya pada larva instar 5 (Gambar 4 kolom 6) menunjukkan hasil positif atau NPV terdeteksi.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

1 2 3 4 5 6 7 8 9

443 bp →



Gambar 2. Produk PCR deteksi NPV. 1. Kontrol positif; 2. 100 bp DNA ladder; 3-5. Telur dari Galur S01, S02, dan S03 (dari produsen); 6-7. Telur dari Galur BS09 dan C301 (dari produsen); 8. Telur/bibit lokal dari pemeliharaan petani; 9. Telur impor dari pemeliharaan petani.



Gambar 3. Produk PCR deteksi *N. bombycis*. 1. 100 bp DNA ladder; 2. Larva instar 5; 3. Kontrol positif



Gambar 4. Produk PCR deteksi *BmiNPV*. 1. Primer (Kontrol negatif); 2. Kontrol positif; 3. 100 bp DNA ladder; 4. Telur (Soppeng); 5. pupa; 6. larva instar 5

PEMBAHASAN

Upaya untuk membebaskan indukan ulatsutera dari penyakit pebrin terus dilakukan setelah ledakan penyakit beberapa tahun terakhir.

Walaupun masih menggunakan teknik konvensional untuk membersihkan bibit atau telur dari *N. bombycis* akan tetapi sudah mulai menunjukkan hasil yang baik. Cara konvensional atau Metode Louis Pasteur digunakan untuk investigasi dan pembebasan telur ulatsutera dari penyakit pebrin. Metode ini adalah yang umum digunakan pada negara-negara produsen bibit. Metode ini pula sebagaimana pertama kali diterapkan pada saat epidemi penyakit pebrin melanda negara-negara penghasil sutera di Eropa pada abad ke-17 (Bhat et al 2009). Metode Pasteur disebut pula metode 'graining', yaitu membebaskan bibit ulatsutera dari penyakit pebrin dengan mengeliminasi telur-telur yang indukannya terdeteksi mengandung spora *N. bombycis* (Schwartz 2001). Hasil penelitian ini dilakukan setelah melewati metode graining, menunjukkan bibit yang dilepaskan produsen telah bebas dari patogen *N. bombycis*.

Pengendalian penyakit grasseri belum ada standar bakunya sebagaimana pengendalian penyakit pebrin. Tindakan preventif penyakit grasseri sebelum sampai pada petani belum banyak dilakukan. Hasil penelitian ini menunjukkan investigasi secara molekuler tidak ada terdeteksi NPV yang terbawa melalui bibit. Apabila polyhedra NPV yang terbawa melalui bibit yang merupakan kontaminasi primer dari indukannya dan akan ditularkan melalui telur yang diletakkan. Dengan teknik molekuler yang sudah banyak diterapkan untuk mendeteksi patogen termasuk *N. bombycis* dan NPV pada ulatsutera. Teknik biologi molekuler modern telah berhasil mengembangkan teknik deteksi patogen ulatsutera sejak tahun 1994 (Guo-Ping dan Xi-Jie 2011). Deteksi dini patogen dapat membantu penelitian dan pusat-pusat penyuluhan untuk memastikan bibit ulatsutera telah bebas dari patogen sebelum dipasok ke petani (Ravikumar et al 2011). Deteksi dini bermanfaat untuk mengurangi biaya pemeliharaan, pakan (Gaganidze et al 2014) dan menghindari kerugian produksi sutera yang lebih besar (Gowda et al 2015).

Deteksi dini merupakan bagian dari upaya tindakan preventif terhadap penyakit-penyakit yang ditularkan melalui bibit. Deteksi dapat pula dilakukan pada lingkungan yang menjadi sumber penularan penyakit. Selama ini deteksi terhadap penyakit pebrin dilakukan secara manual atau dengan melihat langsung spora-sporanya di bawah mikroskop. Di Indonesia, pemanfaatan teknologi terkini dengan sensitivitas yang lebih tinggi dan akurat belum pernah dimanfaatkan. Menurut Singh et al (2012), strategi penelitian di masa

depan adalah penerapan teknik molekuler untuk diagnosis, diferensiasi spesies, mengembangkan teknik deteksi dini penyakit yang lebih baik, cepat, sistematis dan layak. Beberapa penelitian yang telah mengembangkan teknik deteksi pada patogen ulatsutera yang menggunakan metode molekuler adalah antara lain Moraes dan Maruniak (1997); Sachse (2002); Hatakeyama dan Hayasaka (2003); Didier et al (2004); Khurad et al (2004) dan Ravikumar et al (2011). Hasil-hasil penelitian tersebut saat ini telah dapat digunakan yang mengembangkan metode berbasis molekuler dengan *polymerase chain reaction* (PCR) menggantikan metode konvensional untuk mendeteksi dini beberapa penyakit ulatsutera termasuk pebrin dan NPV yang tingkat sensitivitas dan akurasi lebih tinggi.

Patogen *N. bombycis* dapat dideteksi dengan PCR pada semua tingkatan fase siklus hidup ulatsutera, yaitu mulai pada telur, larva, pupa dan ngengat. Sedangkan NPV hanya dapat terdeteksi pada fase larva (Ravikumar et al 2011) dan termasuk fase pupa (Gaganidze et al 2014). Spora *N. bombycis* dalam bahan organik sekitar pemeliharaan ulatsutera tidak selamanya hadir sebagai sumber inokulum seperti pada sisa cangkang telur, pupa mati, ekskremen, exuvie ataupun pada tanah di sekitar ruang pemeliharaan melalui sistem sampel. Studi yang sama pernah dilakukan oleh Tekin et al (2014) bahwa dengan memanfaatkan PCR yang menggunakan primer yang sama (NBEF35F dan NBEF957R) di Turki hasilnya negatif atau *N. bombycis* tidak terdeteksi.

Pada sampel larva instar 5 yang terdeteksi terinfeksi *N. bombycis* atau NPV menunjukkan bahwa kehadiran patogen sering sulit dihindari pada saat pemeliharaan ulatsutera berlangsung. Meskipun bibit atau telur yang digunakan terbebas dari patogen sebagai sumber infeksi utama akan tetapi sumber infeksi lain dari lingkungan seringkali sulit dihindari. Lingkungan pemeliharaan dapat menjadi sumber infeksi sekunder apabila pada pemeliharaan ulatsutera sebelumnya terdapat sumber infeksi dan disinfeksi ruangan serta peralatan pemeliharaan kurang diperhatikan. Menurut Yup-lian (1991) menyatakan bahwa sumber infeksi *N. bombycis* atau NPV dapat berasal dari bangkai larva yang sakit, sekresi, feses, urin larva instar terakhir yang sakit, exuviae atau kokon kotor dalam karena larvanya mati dan pecah di dalam kokon.

Pemanfaatan PCR untuk deteksi dini dapat lebih cepat diketahui infeksi *N. bombycis* dan/atau NPV dibandingkan dengan penggunaan mikroskop konvensional. Patogen NPV dengan menggunakan

teknik molekuler mampu mendeteksi pada hari kedua setelah infeksi sedangkan dengan mikroskop biasa terdeteksi pada hari ke-8 setelah infeksi (Ravikumar et al 2011). Metode molekuler yang inovatif dikembangkan untuk mendeteksi NPV berdasarkan urutan wilayah gen polyhedrin. Metode mendeteksi NPV dalam telur ulatsutera secara cepat adalah dengan menggunakan PCR dan primer khusus (Gaganidze et al 2014). Pemanfaatan PCR untuk mendeteksi patogen *N. bombycis* dan NPV dapat pula dilakukan secara bersamaan melalui PCR Multiplex (Ravikumar et al 2011).

Hasil pemeriksaan secara molekuler pada sampel telur yang diambil secara acak dari produsen menunjukkan hasil negatif. Hal ini pula merupakan upaya deteksi dini patogen *N. bombycis* dan NPV yang terbawa melalui bibit sebelum disalurkan ke petani. Sedangkan sampel yang biasa menjadi kotaminan sekunder (larva instar 3, pupa sekremen, exuviae dan tanah) menunjukkan hasil negatif kecuali pada sampel larva instar 5 hasilnya positif. Penelitian ini telah menjawab pertanyaan yang sering muncul, bahwa apakah bibit yang beredar benar-benar telah terbebas dari *N. bombycis*. Sementara pada tingkat petani masih perlu memperhatikan kebersihan, sanitasi dan standar pemeliharaan ulatsutera.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada Balai Persuteraan Alam Bili-bili dan KPSA Perum Perhutani Kabupaten Soppeng atas kerjasamanya selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhaskar RN. 2013. Horizontal Transmission of *Nosema bombycis* N. infection on Rearing Parameters of Silkworm, *Bombyx mori* L. Presentation in 6th BACSA International Conference "Building Value Chains in Sericulture" "BISERICA" 2013. Padua, Italy.
- Bhat SA, Bashir I, Kamili AS. 2009. Microsporidiosis of silkworm, *Bombyx mori* L (Lepidoptera-bombycidae): A review Special Review African Journal of Agricultural Research, 4(3): 1519-1523.
- [BPA] Balai Persuteraan Alam. 2013. Persuteraan Alam. Bahan Rapat Koordinasi Pengendalian Hama dan Penyakit. Makassar tanggal 15 Maret 2013.
- Didier ES, Stovalla ME, Greenb LC, Brindleyc PJ, Sestaka K, Didierd PJ. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology* 126: 145-166.
- [Disperindag] Dinas Perindustrian dan Perdagangan Provinsi Sulawesi Selatan. 2006. Program Pengembangan Industri Sutera Alam Sulawesi Selatan 2007-2010. Makalah yang disampaikan pada Ternu Bisnis Sutera Alam Sulawesi Selatan. Makassar.
- Gaganidze D, Gujabidze I, Sadunishvili T, Gigolashvili G. 2014. Elaboration of nuclear polyhedrosis virus detection method in eggs of mulberry silkworm. *The journal of ecology* 108: 336-345.
- Gitosewojo. 1995. Peluang pengembangan persuteraan alam di Indonesia khususnya di Jawa Barat. Makalah yang disajikan pada Seminar Nasional Persuteraan Alam. Bandung 30 Januari 1995.
- Gowda KSM, Shamprasadhphadhis, Bharath KN, Anithapeter. 2015. Molecular and immunological detection of Kenchu virus infecting silkworm (*Bombyx mori* L.). *Impact Journals* 3(9): 77-86.
- Guo-Ping K, Xi-Jie G. 2011. Overview of silkworm pathology in China. *African Journal of Biotechnology* 10(79): 18046-18056.
- Hatakeyama Y, Hayasaka S. 2003. A new method of pebrine inspection of silkworm egg using multiprimer PCR. *Journal of Invertebrate Pathology* 82: 148-151.
- Hussain A, Buhroo AA. 2011. An alternative method to secure pebrine free silkworm eggs. *International Society for Zoological Research (ISZR). International Journal of Entomology* 2(1): 40-42.
- Jyothi NB, Patil CS. 2011. Light and Electron Microscopic Study on the Development of *Nosema bombycis* Naegeli in the Midgut of Silkworm *Bombyx mori* L. *Int. J. Indust. Entomol* 23(1): 107-113.
- Khurad AM, Mahulikar A, Rathod MK, Rai MM, Kanginakudru S, Nagarajuc J. 2004. Vertical transmission of *nucleopolyhedrovirus* in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Journal of Invertebrate Pathology* 87: 8-15.
- Moraes RR, Maruniak JE. 1997. Detection and identification of multiple bacuviruses using the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. *Journal of Virological Methods* 63: 209-217.

- Rao SN, Nath BS, Saratchandra B, 2005. Characterization and phylogenetic relationships among microsporidia infecting silkworm, *Bombyx mori*, using inter simple sequence repeat (ISSR) and small subunit rRNA (SSU-rRNA) sequence analysis. *Genome* 48(3): 355.
- Ravikumar G, Urs SR, Prakash NBV, Rao CGP, Vardhana KV. 2011. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of microsporidians, nucleopolyhedrovirus, and densovirus infecting silkworms. *Journal of Invertebrate Pathology* 107: 193-197.
- Sachse K. 2002. Specificity and performance of diagnostic PCR assays. In: Sachse K, Frey J (eds) *Methods in molecular biology: PCR detection of microbial pathogens*. Vol. 216. Humana Press.
- Saez CRN, Munhoz REF, Pereira NC, Bignotto TS, Fassina VA, Pessini GM, Garay LB, Ribeiro LF, Brancalhão R.C, Fernandez MA. 2014. Detection of Contamination and Analysis of Vertical Transmission of *BmNPV* in Eggs and Moths of *Bombyx mori*. *Open Journal of Genetics*. 4: 370-377.
<http://dx.doi.org/10.4236/ojgen.2014.45034>
- Schwartz M. 2001. The life and works of Louis Pasteur. *Journal of Applied Microbiology* 91(4): 597-601. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01495.x
- Singh T, Bhat MM, Khan MA. 2012. Review Article. Microsporidiosis in the Silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Pertanika J. Trop. Agric. Sci* 35(3): 387-406.
- Tekin OK, Sezer D, Soganci K, Tunca RI. 2014. Molecular and microscopic detection of microsporidia in some silkworm (*Bombyx mori* L.) populations in Turkey. *Turkish Journal of agricultural and natural sciences* 1(4): 450-453.
- Yup-lian L. 1991. *Silkworm Disease*. Rome: FAO Agricultural Services Bulletin 73/4.