

**DETEKSI DINI PENYAKIT PENTING ULAT SUTERA
(*Bombyx mori* L.) DENGAN PENDEKATAN MOLEKULER**

*EARLY DETECTION OF SIGNIFICANT DISEASES OF
SILKWORM (*Bombyx mori* L.) WITH A MOLECULAR
APPROACH*

IKRAENI SAFITRI



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2021

**DETEKSI DINI PENYAKIT PENTING ULAT SUTERA (*Bombyx mori* L.)
DENGAN PENDEKATAN MOLEKULER**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Ilmu Kehutanan

Disusun dan diajukan oleh

IKRAENI SAFITRI

Kepada

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2021

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

Deteksi Dini Penyakit Penting Ulat Sutera (*Bombyx mori* L.) Dengan Pendekatan Molekuler

Disusun dan diajukan oleh:

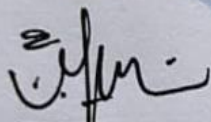
IKRAENI SAFITRI
Nomor Pokok: M012191012

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
pada tanggal 7 Juli 2021

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

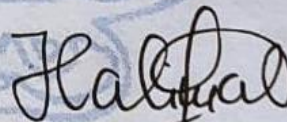
Menyetujui,
Komisi Penasehat

Ketua



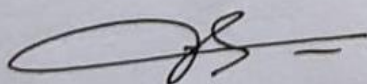
Dr. Ir. Sitti Nuraeni, MP

Anggota



Dr. Siti Halimah Larekeng, SP., MP.

Ketua Program Studi S2
Ilmu Kehutanan,



Prof. Dr. Ir. Muh. Dassir, M.Si

Dekan Fakultas Kehutanan,



Dr. A. Mujetahid M., S. Hut., M. P

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ikraeni Safitri

Nomor Mahasiswa : M012191012

Program Studi : Ilmu Kehutanan

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar,
Yang menyatakan



Ikraeni Safitri

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa dengan selesainya tesis ini.

Banyak kendala yang dihadapi oleh penulis dalam rangka penyusunan tesis ini, yang hanya berkat bantuan berbagai pihak maka tesis ini selesai pada waktunya. Dalam kesempatan ini penulis dengan tulus menyampaikan terimakasih kepada kepada kedua pembimbing terbaik ibu Dr. Ir. Sitti Nuraeni, M.P. dan ibu Dr. Siti Halimah Larekeng, SP., M.P. yang telah banyak mencurahkan tenaga pikirannya dan meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis dalam menyelesaikan tulisan ini. Ucapan terimakasih penulis kepada ibu Dr. Astuti Arif, S.Hut., M.Si, bapak Mukrimin, S.Hut., M.P., dan bapak Dr. Ir. Andi Sadapotto, M.P. sebagai dosen penguji yang telah meluangkan waktu dan memberikan kritik dan saran yang sangat berarti untuk perbaikan tulisan ini. Kepada kedua orang tua tercinta bapak Uddin dan Ibunda Nurlina yang telah mendidik dan senantiasa selalu mendoakan penulis, kepada kakak Iqwan Syarif dan Ardin Damin serta adik Firda Adelia penulis mengucapkan terima kasih atas segala dukungan kepada penulis selama menempuh pendidikan. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada kak titin, kak iss, kak tina, kak ramdana, Sul, Sifa, Une, ulla, aldi dan lainnya yang telah membantu dalam penulisan serta perbaikan penulisan tesis ini. Kepada adik-adik tio, wayan, sakinah, fitri, nurul, devi, kisul, iser, bima yang

telah membantu dalam menyelesaikan penelitian serta memberikan arahan tentang metode yang digunakan.

Semoga Allah SWT membalas budi baik semua yang penulis telah sebutkan diatas maupun yang belum sempat ditulis. Penulis menyadari bahwa tesis ini masih kurang dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan agar ke depannya bisa menjadi lebih baik. Akhir kata semoga tulisan ini dapat bermanfaat kepada pembaca khususnya penulis sendiri.

Makassar, Juli 2020

Penulis

ABSTRAK

IKRAENI SAFITRI. *Deteksi Dini Penyakit Penting Ulat Sutera (Bombyx mori L.) dengan Pendekatan Molekuler* (dibimbing oleh Sitti Nuraeni dan Siti Halimah Larekeng).

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dini penyakit pebrin dan virus pada ulat sutera dengan menggunakan pendekatan molekuler berbasis Polymerase Chain Reaction (PCR).

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin. Sampel ulat sutera yang diamati yakni telur dan larva. Sampel telur diperoleh dari Perum Perhutani Kabupaten Soppeng (Galur C3010), Balai Perhutanan Sosial dan Kemitraan Lingkungan (BPSKL) Bili-Bili Kabupaten Gowa telur indukan, hibrida F1 (Galur S01, S02, S03) dan Litbang Lingkungan Hidup dan Kehutanan (LHK) Bogor (Galur PS01). Sedangkan, sampel larva diperoleh dari pemeliharaan petani di Kabupaten Soppeng, Wajo dan Laboratorium Perlindungan dan Serangga Hutan. Ekstraksi DNA untuk deteksi patogen *BmNPV* dan *N. bombycis* yakni menggunakan KIT ekstraksi DNA DNeasy dari Qiagen. Analisis PCR untuk identifikasi patogen *BmNPV* didasarkan pada gen polihedrin (*polh*) dengan dua primer yaitu Polhefor (F) dan Polherev (R), sedangkan deteksi *N. bombycis* menggunakan primer NBEF 35 (F) dan NBEF 957 (R). Analisis data produk PCR dengan melihat hasil pembacaan dari gel agarose yang dilepaskan dari bak/tank elektroforesis yang di tempatkan di bawah sinar *Ultra Violet Transillug*.

Hasil penelitian menunjukkan patogen target terdeteksi pada optimasi suhu annealing untuk primer Polh yaitu 54,7°C pada 150 bp, sedangkan primer Nb (NBEF 35F dan NBEF 957R) yaitu 53,1°C pada 50 bp. Hasil amplifikasi pada fase telur negatif patogen *BmNPV* dan positif pebrin pada Galur S02, S03. *BmNPV* terdeteksi pada fase larva instar 5 Galur PS01 pemeliharaan Makassar dan Kab. Soppeng. Pebrin terdeteksi pada larva semua Galur kecuali PS01 pemeliharaan Kab. Wajo. Penelitian ini memberikan informasi bagi para pemangku kepentingan agar intervensi deteksi menggunakan Teknik molekuler harus dilakukan sehingga keberhasilan pemeliharaan ulat sutera lebih baik.

ABSTRACT

IKRAENI SAFITRI. Early Detection of Important Diseases of Silkworm (*Bombyx mori* L.) with a Molecular Approach (Supervised by Sitti Nuraeni and Siti Halimah Larekeng).

This study aims to detect early pebrine and viral diseases in silkworms by using a molecular approach based on Polymerase Chain Reaction (PCR).

This research was conducted at the Laboratory of Biotechnology and Tree Breeding, Faculty of Forestry, Hasanuddin University. The silkworm samples observed were eggs and larvae. Egg samples were obtained from Perum Perhutani, Soppeng Regency (Channel C3010), Center for Social Forestry and Environmental Partnership (BPSKL) Bili-Bili Regency, Gowa Regency, F1 hybrids (Strains S01, S02, S03) and Bogor Environmental and Forestry Research and Development (LHK) (PS01 strain). Meanwhile, larva samples were obtained from farmer rearing in Soppeng, Wajo and Forest Insect and Protection Laboratory. DNA extraction for detection of *BmNPV* and *N. bombycis* pathogens using the DNeasy DNA extraction KIT from Qiagen. PCR analysis for the identification of *BmNPV* pathogens was based on the polyhedrin gene (*polh*) with two primers, namely Polhefor (F) and Polherev (R), while the detection of *N. bombycis* used primers NBEF 35 (F) and NBEF 957 (R). Analysis of PCR product data by looking at the readings of the agarose gel released from the electrophoresis tank placed under Ultra Violet Transillug light.

The result show that the target pathogen is detected at the annealing temperature optimization for the *Polh* primer, which is 54.7°C at 150 bp, while the *Nb* primer (NBEF 35F and NBEF 957R) is 53.1°C at 50 bp. The amplification result in the egg phase are negative for *BmNPV* pathogens and positive for pebrine in S02, S03 lines. *BmNPV* is detected in the 5th instar larva stage, PS01 line rearing Makassar and Soppeng District. Pebrine is detected in the larvae of all strains except PS01 rearing Wajo District. This study provides information for stakeholders so that detection interventions using molecular technique should be carried out so that the success of silkworm rearing is better.

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Kegunaan Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Ulat Sutera (<i>Bombyx mori</i> L.)	5
B. Penyakit Ulat Sutera	10
C. Teknik <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	13
D. Deteksi Pebrin dan NPV dengan Teknik <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	15
E. Kerangka Pikir	16
BAB III. METODE PENELITIAN	18
A. Lokasi dan Waktu Penelitian	18
B. Bahan dan Alat	18

C.	Prosedur Penelitian	19
D.	Analisis Data	24
BAB IV.	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	24
BAB V.	KESIMPULAN DAN SARAN	40
A.	Kesimpulan	40
B.	Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	45
Lampiran 1.	Amplifikasi Sampel Larva Deteksi patogen <i>BmNPV</i> dan <i>N. bombycis</i>	45
Lampiran 2.	Sampel yang Digunakan	46
Lampiran 3.	Pengamatan Spora Menggunakan Mikroskop	46
Lampiran 4.	Isolasi DNA	47
Lampiran 5.	Analisis PCR	48
Lampiran 6.	Elektroforesisi	48
Lampiran 7.	Analisis Data	49

DAFTAR TABEL

Nomor		halaman
1.	Kondisi ruangan pemeliharaan larva ulat sutera	9
2.	Primer PCR yang digunakan	22
3.	komposisi bahan untuk reaksi PCR	22
4.	Tahapan-tahapan dalam proses optimasi suhu primer <i>Polh</i> dan <i>Nb</i>	23
5.	Tahapan-tahapan dalam proses PCR primer <i>Polh</i>	23
6.	Tahapan-tahapan dalam proses PCR primer <i>Nb</i>	23
7.	Suhu optimal <i>annealing</i> sampel telur dan larva	29
8.	Hasil amplifikasi sampel telur untuk deteksi patogen <i>BmNPV</i> ulat Sutera	31
9.	Hasil amplifikasi sampel larva untuk deteksi patogen <i>BmNPV</i> ulat Sutera	32
10.	Hasil amplifikasi sampel telur untuk deteksi patogen <i>N.</i> <i>bombycis</i> ulat Sutera	35
11.	Hasil amplifikasi sampel larva untuk deteksi patogen <i>N.</i> <i>bombycis</i> ulat Sutera	36

DAFTAR GAMBAR

Nomor	halaman
1. Siklus Hidup Ulat Sutera	7
2. Ulat Sutera yang terserang penyakit pebrine (BPA, 2011)	12
3. Larva instar V yang terinfeksi BmNPV (Nuraeni <i>et al.</i> 2015)	13
4. Kerangka Pikir Penelitian	17
5. a) Bentuk <i>BmNPV</i> di bawah mikroskop cahaya 400x; b) Polyhedra perbesaran 400x (Nuraeni <i>et al.</i> 2016)	25
6. a) Bentuk <i>N. bombycis</i> di bawah mikroskop cahaya 400x, b) Perbesaran 1000x	26
7. Produk PCR dengan gradient suhu <i>annealing</i> patogen <i>BmNPV</i> . M = Marker (100 bp), 1-5 (sampel telur), 6-12 (sampel larva)	28
8. Produk PCR dengan gradient suhu <i>annealing</i> patogen <i>N. bombycis</i> . M = Marker (100 bp), 1-5 (sampel telur), 6-12 (sampel larva). Ta (°C) = suhu <i>annealing</i>	28
9. Produk PCR deteksi <i>BmNPV</i> telur ulat sutera pada beberapa galur. M = Marker (100 bp); K. Kontrol Positif (<i>BmNPV</i> dimurnikan); 1. Galur C301 (Produsen); 2. Galur PS01 (Produsen); 3-5. Galur S01, S02, S03 (Produsen); 6. Galur PS01 (Produsen); 7. Galur S01 (Produsen); 8. Telur Impor; 9-11. Galur S01, S02, S03; 12-13 (Produsen). Galur telur indukan dan Hibrida F1 (Produsen)	34
10. Produk PCR deteksi <i>BmNPV</i> larva ulat sutera pada beberapa galur. M = Marker (100 bp); K. Kontrol Positif (<i>BmNPV</i> dimurnikan); 1. Larva C301 instar 2; 2-3. Larva PS01 instar 4; 4-5. Larva PS01 instar 5; 6. Larva PS01 instar 3; 7. Larva PS01 instar 4; 8. Larva S01 instar 3; 9-10. Larva S02 instar 3; 11. Larva S02 instar 2; 12. Larva S03 instar 3; 13. Larva S01 instar 5; 14. Larva PS01 instar 5	34
11. Produk PCR deteksi <i>N. bombycis</i> telur ulat sutera pada beberapa galur. M = Marker (50 bp); K. Kontrol Positif; 1.	

Galur C301 (Produsen); 2. Galur PS01 (Produsen); 3-5. Galur S01, S02, S03 (Produsen); 6. Galur PS01 (Produsen); 7. Galur S01 (Produsen); 8. Telur Impor; 9-11. Galur S01, S02, S03; 12-13 (Produsen). Galur telur indukan dan Hibrida F1 (Produsen)	38
12. Produk PCR deteksi patogen <i>N. bombycis</i> larva ulat sutera pada beberapa galur. M = Marker (50 bp); K. Kontrol Positif; 1. Larva C301 instar 2; 2-3. Larva PS01 instar 4; 4-5. Larva PS01 instar 5; 6. Larva PS01 instar 3; 7. Larva PS01 instar 4; 8. Larva S01 instar 3; 9-10. Larva S02 instar 3; 11. Larva S02 instar 2; 12. Larva S03 instar 3; 13. Larva S01 instar 5; 14. Larva PS01 instar 5	38

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		halaman
1.	Amplifikasi Sampel Larva Deteksi patogen <i>BmNPV</i> dan <i>N. bombycis</i>	45
2.	Sampel yang digunakan	46
3.	Pengamatan Spora Menggunakan Mikroskop	46
4.	Isolasi DNA	47
5.	Analisis PCR	48
6.	Elektroforesis	48
7.	Analisis Data	49

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Ulat sutera (*Bombyx mori* L.) adalah salah satu serangga yang dibudidayakan penghasil benang sutera dalam bentuk kokon dengan mengkonsumsi daun murbei selama periode larva (Rahmatulla, 2012). Sutera alam merupakan salah satu komoditas untuk memenuhi kebutuhan di dalam negeri maupun untuk pengembangan ekspor, baik berupa kokon, benang maupun barang jadi (Nurjayanti, 2011). Dinas Kehutanan Prov. SulSel (2011), kegiatan persuteraan alam ini mempunyai peran yang cukup strategis, antara lain karena: 1) dapat melibatkan tenaga kerja, termasuk petani; 2) membuka kesempatan usaha; 3) memberi kesempatan mengembangkan ekonomi kerakyatan; 4) meningkatkan pendapatan petani; 5) meningkatkan devisa; dan 6) membuka peluang di bidang jasa.

Produktivitas sutera alam nasional di Indonesia mengalami penurunan setelah mengalami epidemi penyakit. Ulat sutera dipengaruhi oleh sejumlah penyakit yang disebabkan oleh virus, bakteri, jamur dan microsporidia (Jiang dan Xia, 2014; Babu *et al.*, 2009; Martinez-Zubaziur *et al.*, 2016). Namun ada penyakit setiap periode pemeliharaan yang dapat menggagalkan panen kokon yaitu penyakit pebrin dan *Bombyx mori* Nuclearpolyhedrosis Virus (*BmNPV*) (JICA, 1985; Yup-lian, 1991; Etebari *et al.* 2007; Hussain dan Buhroo, 2011; Nath *et al.* 2012; Nuraeni, 2017).

Penyakit pebrin disebabkan oleh infeksi *Nosema bombycis* yang pernah menggagalkan industri serikultur di Eropa, terutama di Perancis dan Italia pada pertengahan abad ke-19 (Bechnel *et al.* 1999; Chakrabarty *et al.* 2016). Penyakit pebrin pertama kali terjadi di Indonesia pada tahun 1973 (Gitosewojo, 1995 ; Disperindag Sulsel, 2006, Nuraeni, 2017) sampai akhir tahun 2010 beberapa sentra pemeliharaan melakukan moratorium pemeliharaan ulat sutera seperti di Kabupaten Enrekang, Majalengka, Bogor dan beberapa sentra pemeliharaan di Jawa Barat dikarenakan intensitas serangan penyakit yang sangat berat (Nuraeni, 2017).

Pengendalian penyakit pebrin selama ini hanya dengan tindakan preventif. Pemeriksaan penyakit pebrin yang selama ini hanya dilakukan melalui induk betina setelah meletakkan telur. Jika ditemukan adanya spora *N. bombycis* pada induknya maka semua telur yang diletakkan harus dimusnahkan (Mishra, 2017).

Sedangkan upaya pengendalian penyakit *BmNPV* masih sulit dilakukan karena tidak termasuk dalam pengendalian secara preventif (Nuraeni, 2016). Di negara tropis penyakit *BmNPV* adalah penyakit yang sangat merusak dan virus berkembangbiak di dalam inti sel yang terinfeksi (Joshi dan Raja, 2016). Kaewwises *et al.* (2006) menyatakan bahwa ulat sutera yang terinfeksi *BmNPV* menunjukkan gejala selama tahap perkembangan larva dan mati tanpa membentuk kokon. Intensitas serangan *BmNPV* di Sulawesi Selatan pada sentra pemeliharaan ulat

sutera mencapai 42,5-73,9% bahkan dapat menggagalkan total produksi kokon yang akan dipanen (Anwar, 1985 ; Nuraeni, 2016).

Dengan pendekatan molekuler deteksi dapat dilakukan pada telur setelah diletakkan. Penggunaan metode molekuler berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggantikan metode konvensional dalam mendeteksi dini penyakit ulat sutera termasuk pebrin dan *BmNPV* yang tingkat akurasi lebih tinggi (Hatakeyama dan Hayasaka, 2002; Nuraeni, 2016). Meskipun memiliki biaya yang tinggi namun penyediaan bahan dapat digunakan pada banyak sampel, hasil dapat diketahui dengan cepat, serta tingkat akurasi yang tinggi sehingga dapat dilakukan pada fase telur, juga memungkinkan deteksi DNA penyakit tingkat rendah (Kaewwises *et al.*, 2006).

Metode dengan teknik PCR dapat menjadi cara untuk mendeteksi patogen ulat sutera pada fase telur dan larva. Demikian pula pada virus seperti *BmNPV* yang belum ada prosedur standar operasionalnya, sehingga dengan menggunakan teknik PCR ini memungkinkan untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. Penelitian deteksi patogen ulat sutera setelah di ruang pemeliharaan petani belum dilakukan sehingga penelitian ini penting dengan menggunakan pendekatan molekuler agar petani dapat melakukan sanitasi lingkungan dan disinfeksi larva selama pemeliharaan ulat sutera.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang maka rumusan masalah yang perlu dijawab pada penelitian ini yaitu:

1. Apakah terdapat patogen penyakit pebrin dan *BmNPV* pada telur ulat sutera dari beberapa sumber telur?
2. Apakah terdapat penyakit pebrin dan *BmNPV* pada larva ulat sutera setelah dipelihara oleh petani?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini yaitu untuk mendeteksi penyakit pebrin dan *BmNPV* dengan menggunakan pendekatan molekuler berbasis Polymerase Chain Reaction (PCR) pada ulat sutera fase telur dan larva di beberapa lokasi penelitian.

D. Kegunaan Penelitian

Kegunaan pada penelitian ini yaitu diharapkan dapat menjadi salah satu pengembangan deteksi dini penyakit pebrin dan virus pada ulat sutera dengan teknik PCR untuk mengembangkan keterampilan dan menyesuaikan perkembangan IPTEKS. Sehingga mengembalikan kejayaan persuteraan alam di Sulawesi Selatan sebagai produksi sutera nasional terutama di Kabupaten Soppeng dan Wajo.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Ulat Sutera (*Bombyx mori* L.)

1. Klasifikasi Ulat Sutera (*Bombyx mori* L.)

Ulat sutera pertama kali ditemukan di China. Adapun taksonomi ulat sutera menurut Stoetzel (1989) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Phylum : Arthropoda

Class : Hexapoda/Insecta

Subclass: Pterygota

Ordo : Lepidoptera

Family : Bombycidae

Genus : Bombyx

Species : *Bombyx mori* (Linnaeus)

Ulat sutera dapat diklasifikasikan berdasarkan daerah asalnya, sebagai berikut: Ras Jepang: Mempunyai siklus hidup yang panjang, ngengat bertelur banyak, stadium ulatnya lama dan ukurannya kecil, kokon lonjong dan berlekuk di tengahnya seperti bentuk kacang tanah, tetapi kualitas kokonnya tinggi. Sementara itu, Ras Eropa: Siklus hidupnya panjang, telur dan ulatnya berukuran besar, kokonnya besar dan berwarna putih, serat suteranya panjang, ngengat tidak tahan panas. Selanjutnya adalah Ras China: Telurnya berwarna kekuning-kuningan, peka terhadap

kelembaban yang tinggi, kokonnya bulat lonjong, berwarna hijau dan berbulu. Ras India: ukuran telur besar dan berat, ulatnya tahan suhu dan kelembaban tinggi, kokonnya bulat lonjong, berwarna hijau dan berbulu. Ras Lokal juga tak kalah menarik untuk dikaji lebih dalam tentang persilangannya dengan ras lainnya, yang ada dibelahan bumi yang lain. Ras Lokal (Indonesia): tahan terhadap suhu panas, kokonnya kecil, berwarna putih, kualitas kokon rendah tetapi tahan terhadap penyakit (Hartati, 2015).

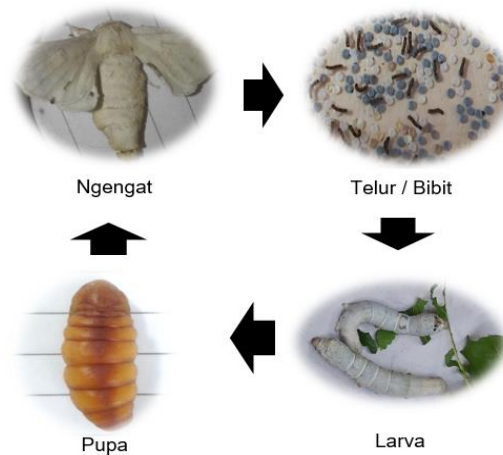
2. Siklus Hidup Ulat Sutera

Siklus hidup ulat sutera terdiri atas telur atau bibit, larva, pupa dan ngengat (Gambar 1). Rangkaian peristiwa ini dikenal dengan istilah metamorfosis sempurna dan terjadi dalam waktu kurang lebih satu bulan. Ngengat menghasilkan telur berkisar antara 400-500 butir dan umumnya menetas setelah 10 hari masa inkubasi. Larva ulat sutera terdiri atas lima instar yang dihitung berdasarkan umur sampai akhir instar kelima sesudah mengalami masa empat kali moulting, yaitu:

- Instar I (ulat kecil), umur : kisaran antara 3-4 hari
- Instar II (ulat kecil), umur : kisaran antara 2-3 hari
- Instar III (ulat kecil), umur : kisaran antara 3-4 hari
- Instar IV (ulat besar), umur : kisaran antara 4-5 hari
- Instar V (ulat besar), umur : berkisar antara 6-7 hari

Pada akhir instar kelima, ulat tidak mengalami pergantian kulit lagi, tetapi mulai membentuk kokon sebagai tempat berlindung saat berbentuk

pupa. Ulat sutera membuat kokon pada umumnya selama 2 hari mengokon. Setelah ulat sutera membuat kokon, ulat sutera akan berubah menjadi pupa kurang lebih 12 hari. Ngengat keluar dari kokon setelah 10-12 hari mengokon (Hartati, 2015).



Gambar 1. Siklus hidup ulat sutera

3. Pemeliharaan

Pakan untuk ulat sutera adalah daun murbei untuk ulat kecil daun yang baik berumur pangkasan 25 – 30 hari dengan waktu pengambilan pagi atau sore hari. Cara pengambilan daun untuk tiap instar pada ulat kecil berbeda, untuk instar 1 duduk daun lembar 3 – 5 dari pucuk, untuk instar 2 duduk daun lembar 5 – 7 dari pucuk, dan instar 3 duduk daun 8 – 12 dari pucuk. Untuk menjaga supaya ulat kecil tidak terkontaminasi bakteri/penyakit maka dilakukan disinfeksi tubuh ulat. Disinfeksi digunakan dengan menggunakan campuran kaporit dan kapur yang ditaburkan tipis dan merata pada tubuh ulat dengan saringan (Hartati, 2015).

Sebelum *hakitake* (pemberian makan pertama pada ulat yang baru menetas) pada awal instar 2 dan awal instar 3. Dalam pemberian pakan,

daun yang diberikan harus daun yang baik, tidak basah, segar dan bersih. Setelah hakitake selanjutnya ulat kecil diberi makan sehari tiga kali. Bila sisa makan sudah banyak, dilakukan pembersihan tempat ulat sebelum pemberian pakan, kecuali selama instar 1 tempat ulat tidak perlu dibersihkan karena kotoran ulat masih sedikit.

Bila pemeliharaan ulat besar dilakukan di tempat lain maka penyaluran ulat dilakukan pada sore hari pada saat ulat instar 3, sehingga ulat tidak mengalami gangguan yang akan mengganggu kondisi fisiknya. Sebelum pemeliharaan ulat besar, ruangan harus didisinfeksi dengan larutan kaporit yang disemprotkan secara merata ke seluruh ruangan. Bangunan untuk pemeliharaan ulat besar terdiri dari ruangan tempat daun dan tempat pemeliharaan. Pakan untuk ulat besar adalah daun berumur pangkas 2,5 – 3 bulan. Pengambilan daun dilakukan pagi dan sore hari. Daun pakan yang diberikan harus baik, tidak basah, segar dan bersih (Dinas Kehutanan Prov. Sulsel, 2011).

4. Kebutuhan Lingkungan untuk Pemeliharaan Ulat Sutera

Telur biasanya menetas 10 hari setelah perlakuan khusus, pada suhu 24-25°C dan kelembaban udara 80–85% (Hartati, 2015), cahaya terang selama 17-18 jam/hari dan keadaan gelap selama 6-7 jam/hari. Pemeliharaan ulat kecil memerlukan suhu 26-28°C dengan kelembaban 90% dan untuk ulat besar antara 23-25°C dengan kelembaban 70-80%, selanjutnya ulat mengokon memerlukan suhu 22-23°C dengan kelembaban 60-70% (Kaomini, 2002; Andadari *et al.*, 2013). Kebutuhan lingkungan

untuk pemeliharaan untuk ulat kecil dan ulat besar dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kondisi ruangan pemeliharaan larva ulat sutera

Instar	Temperatur (°C)	Kelembaban (%)	Waktu (Hari)
I	27-28	85-90	3-4
II	26-27	85-90	2-3
III	25-26	80-85	3-4
IV	25-26	75	4-5
V	24-25	70	6-7

Sumber: Andadari *et al.* (2013)

5. Faktor Lingkungan Ulat Sutera

Pertumbuhan dan perkembangan ulat sutera sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Suhu dan kelembaban, sirkulasi udara, gas, cahaya menunjukkan interaksi yang signifikan terhadap fisiologi ulat tergantung faktor dan tahapan perkembangan yang mempengaruhi pertumbuhan dan kualitas sutera. Secara biologis karakter yang berhubungan dengan kepompong dipengaruhi oleh suhu sekitar tempat pemeliharaan ulat, musim pemeliharaan, kualitas daun murbei, dan genetik ulat sutera (Rahmatullah, 2012).

Suhu memiliki korelasi langsung terhadap pertumbuhan ulat sutera, penurunan dan naiknya temperatur berbahaya bagi perkembangan ulat sutera. Meningkatnya suhu selama pemeliharaan mempercepat pertumbuhan larva sedangkan suhu yang rendah memperlambat pertumbuhan larva. Suhu rendah dan kelembaban yang tinggi (kurang baik)

berpengaruh terhadap kesehatan larva (larva menjadi lemah), untuk ulat besar suhu dan kelembaban yang melebihi kebutuhannya dapat menyebabkan nafsu makan berkurang, kokon yang dihasilkan menjadi kurang baik (kecil-kecil, kurang dari 1,5 g) dan kadar sutera berkurang. Berat kokon yang baik berkisar ± 2 g (Andadari *et al.*, 2013). Suhu di atas 30°C secara langsung mempengaruhi kesehatan larva dan suhu di bawah 20°C mempengaruhi proses pertumbuhan, pada instar awal, larva menjadi lemah dan rentan terhadap berbagai penyakit (Rahmatullah, 2012).

B. Penyakit Ulat Sutera

1. Penyakit Pebrin

Pebrin adalah penyakit ulat sutera yang disebabkan oleh mikrosporidia dan ditakuti karena spora dapat bertahan hidup selama beberapa tahun. Patogen *N. bombycis* merupakan mikrosporidia yang ditularkan melalui daun terkontaminasi atau dari induk ngengat melalui telur (Mishra, 2017). *Neosema* berkembang biak dengan spora dan juga membelah diri, sporoplasma berkembang biak dengan membelah diri di dalam haemolympha melalui ruang-ruang antar sel yang tersebar di seluruh tubuh larva, tinggal disitu terutama bagian tubuh yang berlemak dan jaringan otot). Penyakit ini menular pada ulat sutera sehingga dapat menyebabkan kerugian besar. Ketahanan terhadap penyakit tersebut sangat ditentukan oleh jenis ulat sutera dan cara pemeliharaannya.

Gejala penyakit pebrin yang ditimbulkan pada beberapa fase (Balai Persuteraan Alam, 2011), antara lain:

- a. Pada fase larva; nafsu makan ulat berkurang, pertumbuhan ulat tidak seragam, pergantian kulit tidak seragam/serentak, perkembangan selanjutnya pada ulat mengecil, gerakannya lambat yang pada akhirnya mengalami kematian, gejala khusus terdapat bintik–bintik coklat kehitam hitaman, besar atau kecil pada permukaan tubuh ulat atau warna hitam pada bagian kaki abdomen (Gambar 2).
- b. Pada fase pupa; bagian abdomen membengkak dan lembek, warna pupa hitam, serta di bagian samping tempat bakal sayap nampak bintik hitam.
- c. Pada fase ngengat; gejala dilihat dari terlambatnya keluar ngengat dari kokon, ngengat tidak mempunyai sayap atau tidak lengkap, sisik mudah rontok, perut bengkak dan gerakannya lambat serta kemampuan bertelur sangat rendah.
- d. Pada fase telur; bentuk telur tidak seragam, daya rekat rendah, presentase telur yang tidak dibuahi tinggi, telur menetas tidak serempak serta telur bertumpuk dan berdempetan.



Gambar 2. Ulat sutera yang terserang penyakit pebrin (BPA, 2011)

2. Penyakit *Bombyx mori* Nucleopolyhedrosis Virus (*BmNPV*)

Penyakit *BmNPV* tersebut dikenal sebagai penyakit 'Jaundice' di Amerika, penyakit 'grasseries' di Prancis, penyakit 'Giallume' di Italia, penyakit 'gelbsucht' atau 'fettsucht' di Austria dan Jerman. Penyakit 'Nobyu' di Jepang (Steinhaus, 1963; Tanada dan Kaya, 1993; Nuraeni, 2019). Selain penyakit pebrin yang menyerang ulat sutera, penyakit *BmNPV* juga menyebabkan kerugian ekonomi bagi petani setelah penyakit pebrin.

Ulat sutera yang terinfeksi *BmNPV* akan mengalami pembengkakan antara segmen, kulitnya berwarna putih susu dan mengkilap, haemolimnya keruh berwarna putih susu. Gejala akan berbeda pada tahap perkembangannya, jika terjadi infeksi sebelum ganti kulit maka larvanya tidak dapat ganti kulit. Infeksi yang terjadi setelah ganti kulit maka terjadi pembengkakan pada membrane intersegmental pada instar keempat dan kelima (Nuraeni, 2019). Hasil penelitian Nuraeni *et al.*, (2015) gejala luar pada bibit ulat sutera yang terkena virus *BmNPV* yaitu berkurangnya selera makan dari ulat, selalu bergerak mondar mandir, terjadinya pembengkakan tubuh diantara ruas-ruasnya (Gambar 3), selain itu gejala yang lebih lanjut

adalah kutikulanya menjadi rapuh, haemolimpanya menjadi keruh atau putih seperti susu, bila kutikulanya pecah akan keluar semua cairan tubuhnya yang berwarna putih seperti "nanah" dengan demikian ulatnya mati dan menjadi sumber infeksi. Ulat yang telah mati cepat membusuk dan hancur sehingga sukar dipindahkan atau dibuang.



Gambar 3. Larva instar V yang terinfeksi *BmNPV* (Nuraeni *et al.* 2015)

Penyebab penyakit yaitu *Borrelina virus* yang akan membentuk polyhidra di dalam inti sel yang menyebabkan cairan tubuh ulat-ulat yang diserang penyakit ini menjadi keruh (Andadari *et al.*, 2013). *B. mori* Nucleopolyhedro Virus (*BmNPV*) secara selektif menginfeksi ulat sutera domestik dan menyebabkan kerugian besar serikultur. Di Kuba kondisi cuaca cocok untuk pembangan penyakit ulat sutera, saat berkembangbiak ulat sutera yang terpapar dalam kondisi stress seperti suhu, kelembaban, kekurangan udara dan nutrisi meningkat hingga 10% (Martínez-Zubiaur *et al.*, 2016).

C. Teknik *Polymeraceae Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reacton (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk

mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam (Kadri, 2019). PCR melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linear seperti tampak pada bagan di atas (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida ($MgCl_2$) dan enzim polimerase DNA. Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA templat; (3) penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) pemanjangan primer (*extension*) dan (5) pemantapan (*postextension*). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di

mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

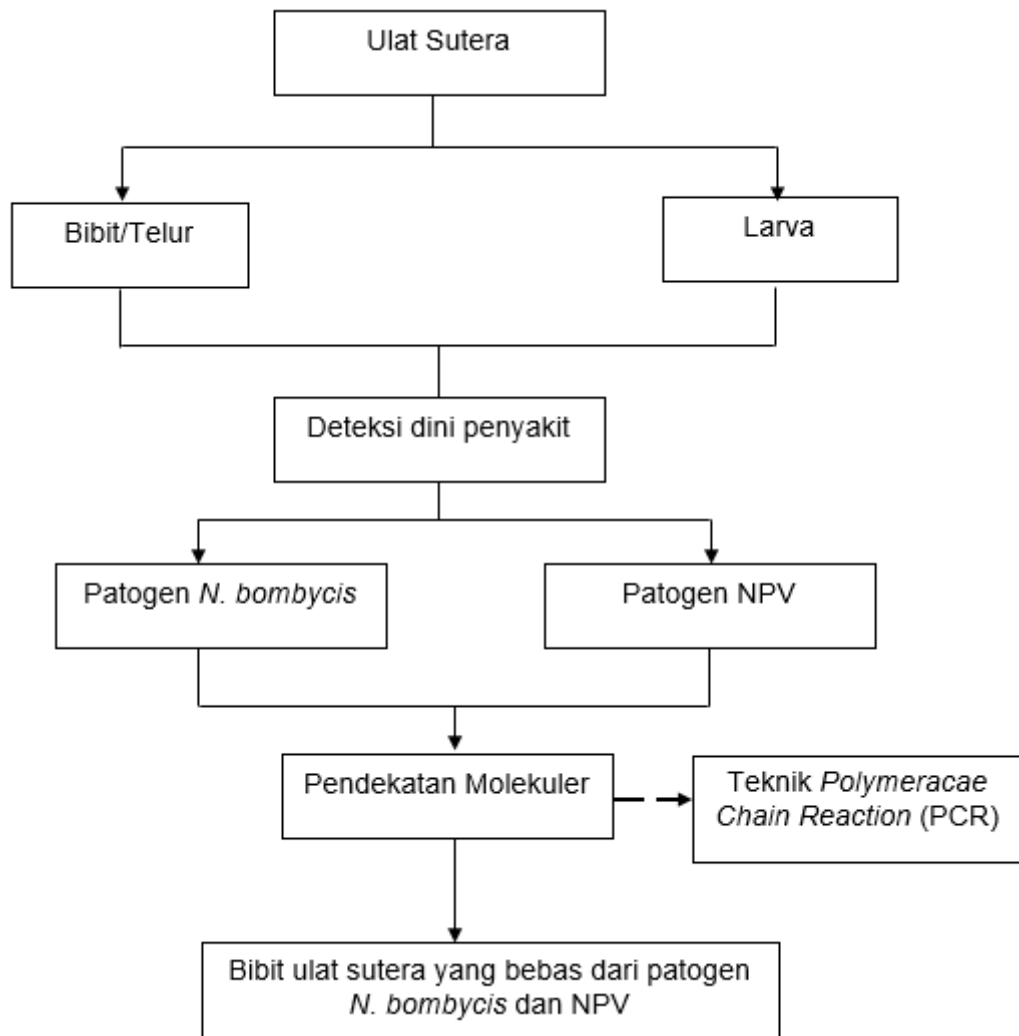
D. Deteksi Pebrin dan *BmNPV* dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Pemanfaatan PCR untuk deteksi dini memiliki keuntungan yakni tingkat kepekaan yang tinggi, hasil yang lebih cepat, sensitifitas yang lebih besar dibandingkan mikroskop konvensional (Chakrabarty *et al.*, 2016). Teknik PCR dapat menjadi cara yang digunakan untuk mendeteksi patogen pada ulat sutera dalam pemeliharaan petani ataupun produsen telur dan menganalisis penularan penyakit, seperti yang dilaporkan Kawakami *et al.*, (1995), Hatakeyama dan Hayakasa (2002, 2003), Kaewwises *et al.*, (2006), Saez *et al.* (2014), Tekin *et al.*, (2014), Nuraeni (2016) dan Martínez-Zubiaur (2016). Teknik lain yang telah dikembangkan yakni PCR multiplex dilakukan oleh Hatakeyama dan Hayakasa (2002) untuk mendeteksi patogen yang berbeda.

Patogen *N. bombicis* dapat dideteksi dengan PCR pada semua tingkatan fase siklus hidup ulat sutera, yaitu mulai pada telur, larva, pupa dan ngengat. Namun pada *BmNPV* hanya dapat dideteksi pada fase larva dan pupa (Ravikumar *et al.*, 2011; Gaganidze *et al.*, 2014; Nuraeni, 2016). Hasil penelitian Nuraeni (2016) sampel telur, exuvia, pupa, sekremen dan tanah tidak ditemukan *N. bombicis* dan *BmNPV* kecuali pada larva instar 5 dari pengambilan sampel petani pada tahun 2014.

E. Kerangka Pikir

Ulat sutera (*B. mori* L.) termasuk salah satu jenis serangga Ordo Lepidoptera. Serangga ini memiliki nilai ekonomis yang sangat tinggi karena di akhir fase larvanya dapat membentuk kokon dari ulat sutera. Bahan baku sutera digunakan dalam industri tekstil, benang dan keperluan lainnya. Ulat sutera memiliki siklus hidup yakni telur, larva, pupa dan ngengat. Serangan penyakit adalah salah satu faktor penyebab menurunnya produksi kokon. Jenis penyakit yang menyerang ulat sutera yakni patogen pebrin dan virus. Patogen pebrin dapat ditularkan melalui mulut, melalui daun dari lingkungan pemeliharaan yang terkontaminasi, sementara upaya pengendalian sulit dilakukan karena termasuk dalam prosedur pengendalian secara preventif. Oleh karena itu, dengan Pendekatan molekuler dapat mendeteksi patogen *N. bombycis* dan *BmNPV* pada fase bibit/telur serta larva melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), sehingga dapat tersedia bibit ulat sutera yang bebas dari patogen *N. bombycis* dan *BmNPV*.



Gambar 4. Kerangka Pikir Penelitian