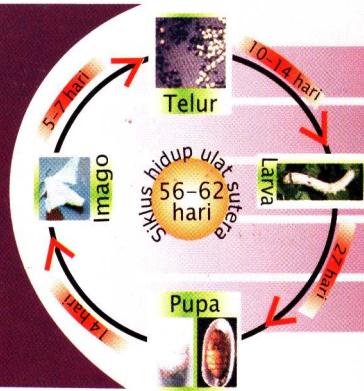
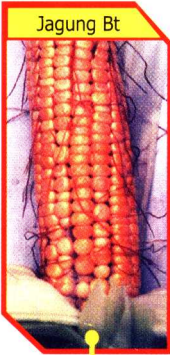


Perakitan dan Bioasai



Tanaman Transgenik Tahan Serangga Hama



.7
R



Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
 Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
 2004

632.7
PER

ISBN: 979-3919-05-1

G3/29

Perakitan dan Bioasai Tanaman Transgenik Tahan Serangga Hama

Penyusun

Muhammad Herman
Kusumawaty Kusumanegara
Diani Damayanti



Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan
Sumberdaya Genetik Pertanian

KATA PENGANTAR

Teknologi rekayasa genetik telah berkembang pesat dan telah memberikan manfaat antara lain dalam menghasilkan produk rekayasa genetik (PRG). PRG seperti tanaman transgenik sudah banyak dibudidayakan dan dipasarkan di berbagai negara. Pengkajian keamanan hayati sebelum tanaman transgenik dikomersialisasikan dilakukan untuk melihat kemungkinan adanya dampak negatif yang dapat mengganggu dan membahayakan lingkungan dan keanekaragaman hayati. Sesuai dengan pengaturan keamanan hayati dalam Keputusan Bersama Empat Menteri tentang Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan Produk Pertanian Hasil Rekayasa Genetik, sebelum dikomersialisasikan di Indonesia setiap tanaman transgenik harus dikaji keamanan hayatinya, khususnya melalui pengujian di Fasilitas Uji Terbatas (FUT).

Salah satu parameter yang diamati dalam pengujian tanaman transgenik di FUT adalah bioasai terhadap tanaman tersebut. Bioasai tanaman transgenik adalah suatu pengujian untuk mengetahui dampak tanaman transgenik terhadap organisme non target atau untuk mengetahui ekspresi dari suatu gen interes (misalnya gen ketahanan serangga hama) yang ditransformasikan ke dalam tanaman transgenik. Dalam bioasai tanaman transgenik yang tahan serangga hama, diperlukan jumlah serangga dengan umur yang seragam dan cukup untuk pengujian. Sehubungan dengan keperluan tersebut, serangga hama yang digunakan untuk bioasai perlu diperbanyak baik melalui pakan biasa maupun pakan buatan.

Buku ini disusun dari hasil *review* pustaka dan data yang terkumpul dari studi bioasai tanaman transgenik, serta pembiakan dan pemeliharaan serangga sejak tahun 1998 sampai 2003. Studi tersebut dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian yang dulu dikenal dengan Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan atau Balitbio. Dalam buku ini akan diuraikan tentang perakitan tanaman transgenik tahan serangga hama, penyiapan serangga uji, dan bioasai tanaman transgenik. Buku ini dapat dimanfaatkan oleh para peneliti yang melakukan perakitan tanaman transgenik.

Penyusun

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
PENDAHULUAN	1
PERAKITAN TANAMAN TRANSGENIK TAHAN SERANGGA HAMA	2
Teknik Transfer Gen	4
Gen Ketahanan terhadap Serangga Hama	6
PENYIAPAN SERANGGA UJI	8
Morfologi dan Biologi Serangga	8
Ulat Sutera	9
Hama Penggerek Batang Jagung	
Hama Penggerek Buah Kapas	13
Cara Pembiakan dan Pemeliharaan Serangga di Laboratorium	16
BIOASAI TANAMAN TRANSGENIK	21
Jagung Bt	21
Kapas Bt	29
UCAPAN TERIMA KASIH	33
DAFTAR PUSTAKA	34

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1.	Siklus hidup ulat sutera (<i>Bombyx mori</i> L.) dimodifikasi dari Anonymous (2003b) dan koleksi pribadi	11
Gambar 2.	Siklus hidup hama penggerek batang jagung [<i>Ostrinia furnacalis</i> (Guenee)] dimodifikasi dari Breithaupt (1993), Hoffmann (2005), dan Herbison-Evans dan Crossley (2005)	14
Gambar 3.	Siklus hidup hama penggerek buah kapas [<i>Helicoverpa armigera</i> (Hubner) Hardwicke] dimodifikasi dari Nappfast (2003) dan koleksi pribadi	16
Gambar 4.	Perbanyakan ulat sutera pada daun murbei	18
Gambar 5.	Perbanyakan <i>O. furnacalis</i> dalam pakan buatan	20
Gambar 6.	Infestasi ulat sutera pada daun murbei yang diberi polen/tepung sari jagung Bt	24
Gambar 7.	Uji dampak jagung Bt dan non Bt terhadap ulat sutera	25
Gambar 8.	Bioasai daun jagung Bt dan non Bt dengan <i>O. furnacalis</i> 5 hari setelah infestasi	26
Gambar 9.	Bioasai tongkol jagung Bt dan non Bt dengan <i>O. furnacalis</i> 3 minggu setelah infestasi	27
Gambar 10.	Bioasai daun jagung Bt dan non Bt dengan <i>H. armigera</i> 5 hari setelah infestasi	29
Gambar 11.	Bioasai daun kapas Bt dan non Bt dengan <i>H. armigera</i> 5 hari setelah infestasi	32
Gambar 12.	Infestasi <i>H. armigera</i> pada buah kapas Bt dan non Bt	33
Gambar 13.	Bioasai buah (<i>bol</i>) kapas Bt dan non Bt dengan <i>H. armigera</i> 2 minggu setelah infestasi	34

PENDAHULUAN

Perbaikan sifat tanaman dapat dilakukan melalui modifikasi genetik baik dengan persilangan tanaman secara konvensional maupun dengan bioteknologi melalui rekayasa genetik. Kehadiran teknologi rekayasa genetik memberikan wahana baru bagi pemulia tanaman untuk memperoleh kelompok gen baru yang lebih luas (Herman 1996). Teknik rekayasa genetik dapat digunakan sebagai mitra dan pelengkap teknik pemulia tanaman yang sudah mapan dan telah digunakan selama bertahun-tahun (Herman 2002b). Produk rekayasa genetik yang berupa tanaman transgenik sudah banyak ditanam dan dipasarkan di berbagai negara (James 2003). Tanaman transgenik tersebut memiliki sifat baru seperti ketahanan terhadap hama, penyakit, herbisida, atau peningkatan kualitas hasil (James 2003).

Pada tahun 2004, ada empat belas negara yang menanam tanaman transgenik (James 2004). Negara-negara tersebut adalah Amerika Serikat, Argentina, Kanada, Brazil, Cina, Paraguay, India, Afrika Selatan, Uruguay, Australia, Rumania, Meksiko, Spanyol, dan Filipina. Selama sembilan tahun dalam periode 1996-2004, secara global penanaman tanaman transgenik meningkat 47 kali dari luasan 1,7 juta hektar pada tahun 1996 menjadi 81,0 juta hektar pada tahun 2004 (James 2004). Peningkatan areal penanaman tanaman transgenik yang mencolok tersebut merupakan indikasi kuat bahwa para petani telah diuntungkan dengan menanam produk teknologi rekayasa genetik. Di samping hal positif dari tanaman transgenik, terdapat kekhawatiran dari sebagian masyarakat bahwa tanaman tersebut akan mengganggu, merugikan, dan membahayakan bagi keanekaragaman hayati dan lingkungan, serta kesehatan manusia (Herman 1999).

Di beberapa negara Asia seperti Filipina, India, Jepang, Malaysia, dan Thailand, beberapa tanaman transgenik seperti kapas Bt dan jagung Bt (tanaman transgenik tahan hama tertentu), serta kedelai RR (kedelai toleran herbisida) telah dinyatakan aman hayati dan aman pangan sesuai dengan peraturan yang berlaku di masing-masing negara tersebut (Herman 2002a; 2001). Sebelum dikomersialisasikan, setiap tanaman transgenik harus dikaji keamanan hayatinya, baik melalui pengujian di Fasilitas Uji Terbatas mau-

pun di Lapangan Uji Terbatas. Sehubungan dengan itu, pada tahun 1997 telah dikeluarkan Keputusan Menteri Pertanian No. 856/Kpts/HK.330/9/1997 tentang Ketentuan Keamanan Hayati Produk Bioteknologi Pertanian Hasil Rekayasa Genetik (Herman 1999). Karena di dalam Keputusan Menteri Pertanian tahun 1997 tersebut belum tercakup aspek keamanan pangan, maka pada tahun 1999 telah dikeluarkan Keputusan Bersama Menteri Pertanian, Menteri Kehutanan dan Perkebunan, Menteri Kesehatan dan Menteri Negara Pangan dan Hortikultura tentang Keamanan Hayati dan Keamanan Pangan Produk Pertanian Hasil Rekayasa Genetik (Herman 1999).

Sesuai dengan pengaturan keamanan hayati yang ada dalam Keputusan Bersama Empat Menteri tersebut, maka setiap tanaman transgenik yang akan dimanfaatkan harus diuji keamanan hayatnya di Fasilitas Uji Terbatas atau FUT (Herman 1999). Salah satu peubah yang diamati dalam pengujian tanaman transgenik di FUT adalah bioasai terhadap tanaman tersebut. Bioasai tanaman transgenik adalah suatu studi untuk mengetahui dampak tanaman transgenik terhadap organisme non target atau untuk mengetahui ekspresi dari suatu gen interes (misalnya gen ketahanan serangga hama) yang ditransformasikan ke dalam tanaman transgenik. Dalam bioasai tanaman transgenik yang tahan serangga hama, diperlukan serangga dalam jumlah yang cukup dengan umur yang seragam. Sehubungan dengan keperluan tersebut, serangga yang digunakan untuk bioasai perlu diperbanyak.

PERAKITAN TANAMAN TRANSGENIK TAHAN SERANGGA HAMA

Kehadiran teknologi rekayasa genetik memberikan wahana baru bagi pemulia tanaman untuk memperoleh kelompok gen baru yang lebih luas. Gen yang ditransfer ke dalam genom suatu tanaman untuk membentuk tanaman transgenik bisa berasal dari spesies lain seperti bakteri, virus, atau tanaman (Bennet 1993). Gen yang diperoleh dengan jalan sintesis secara kimia misalnya gen Bt, juga berhasil ditransformasikan ke tanaman. Pada dasarnya gen yang ditransfer tersebut haruslah gen yang bermanfaat yang belum ada atau belum dipunyai oleh tanaman. Hal ini menggambarkan ke-

kuatan dari rekayasa genetik dalam memperlebar lingkup atau kisaran transfer gen di luar jangkauan pemuliaan konvensional. Teknik rekayasa genetik dapat digunakan sebagai mitra dan pelengkap teknik pemuliaan tanaman yang sudah mapan dan telah digunakan selama bertahun-tahun (Herman 2002a).

Dalam memproduksi tanaman transgenik melibatkan beberapa tahap dalam teknik biologi molekuler dan seluler (Herman 1996). Suatu sifat yang diinginkan harus dipilih dan gen yang mengatur sifat tersebut harus diidentifikasi. Apabila gen yang diinginkan belum tersedia, maka gen harus diisolasi dari organisme donor. Organisme donor bisa berasal dari virus, bakteri, jamur, serangga, tanaman atau hewan. Supaya gen tersebut dapat berfungsi maka gen harus dimodifikasi secara molekuler, yaitu harus mengandung daerah pengaturan (*regulatory region*), sehingga dapat diekspresikan di tanaman dengan tepat dan benar (Bennet 1993; Watson *et al.* 1992). Gen yang sudah diisolasi harus dikonstruksi dalam suatu vektor plasmid untuk ditransfer ke dalam tanaman melalui suatu teknik transfer gen. Plasmid yang digunakan untuk transformasi tanaman tidak hanya mengandung gen dari sifat yang diinginkan tetapi juga gen marka untuk seleksi, seperti gen ketahanan terhadap herbisida atau antibiotik. Gen marka tersebut akan memudahkan seleksi sel atau jaringan yang tertransformasi. Untuk kesuksesan suatu transformasi, rangkaian gen yang diintroduksi ke dalam tanaman harus dapat diinsersikan ke dalam genom tanaman, diekspresikan, dan tetap terpelihara dalam seluruh proses divisi sel berikutnya. Pada tahap terakhir, sel atau jaringan tanaman yang ditransformasi harus dapat diregenerasi menjadi suatu tanaman. Regenerasi tanaman dapat dilakukan baik secara organogenesis maupun embriogenesis (Sticklen 1991; Zhong *et al.* 1991; 1992).

Tanaman transgenik perlu dikarakterisasi secara molekuler untuk mengkonfirmasi integritas gen yang diintroduksi dan menentukan jumlah kopinya di dalam genom tanaman. Tanaman tersebut juga perlu dikarakterisasi secara biokimia untuk menentukan apakah gen tersebut berfungsi dengan benar. Setelah tahapan biologi seluler dan molekuler dilalui, tanaman transgenik perlu dikarakterisasi sifat yang diinginkan di laboratorium dan

rumah kaca (Herman 1999). Untuk mengkonfirmasi apakah sifat baru yang diinginkan tersebut dapat diturunkan maka perlu dilakukan persilangan genetik. Dalam buku ini hanya akan diuraikan perakitan tanaman transgenik tahan serangga hama.

Teknik Transfer Gen

Teknologi transfer gen dibedakan menjadi dua, yaitu langsung dan tidak langsung (Bennet 1993). Contoh transfer gen secara langsung adalah penembakan eksplan gen dengan *gene gun* atau *divortex* dengan *silicon carbide* (karbid silikon), dan perlakuan pada protoplas tanaman dengan elektroporasi atau dengan *poly-ethyleneglycol* (PEG). Sedangkan transfer gen secara tidak langsung adalah melalui vektor *Agrobacterium*.

Transfer Gen secara Langsung

- Penembakan partikel (*particle bombardment*)

Teknik paling modern dalam transformasi tanaman adalah penggunaan metode penembakan partikel (*particle bombardment*) atau *gene gun*. Metode transfer gen ini dioperasikan secara fisik dengan menembakkan partikel DNA-*coated* langsung ke sel atau jaringan tanaman (Klein *et al.* 1988). Dengan cara demikian, partikel dan DNA yang ditransformasikan menembus dinding sel dan membran, kemudian DNA melarut dan tersebar di dalam sel secara independen. Telah didemonstrasikan bahwa teknik ini efektif untuk mentransfer gen pada bermacam-macam eksplan. Penggunaan *particle bombardment* membuka peluang dan kemungkinan lebih mudah dalam memproduksi tanaman transgenik dari berbagai spesies yang sebelumnya sukar ditransformasi dengan *Agrobacterium*, khususnya tanaman monokotil seperti padi, jagung, dan *turfgrass*.

- *Silicon carbide*

Metode transfer gen lain yang kurang umum digunakan dalam transformasi tanaman tetapi telah dilaporkan berhasil mentransformasi jagung dan *turfgrass* adalah penggunaan karbit silikon. Suspensi sel tanaman yang akan ditransformasi dicampur dengan serat karbit silikon dan DNA



plasmid dari gen yang diinginkan dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* kemudian dilakukan pencampuran dan pemutaran dengan *vortex* (Kaepler *et al.* 1990). Serat karbit silikon berfungsi sebagai jarum injeksi mikro (*microinjection*) untuk memudahkan transfer DNA ke dalam sel tanaman.

- Elektroporasi

Metode transfer DNA yang umum digunakan pada tanaman monokotil adalah elektroporasi dari protoplas, perlakuan *polyethylene glycol* (PEG) pada protoplas dan kombinasi antara dua perlakuan tersebut (Joersbo dan Brunstedt 1991). PEG memudahkan presipitasi DNA dan membuat kontak lebih baik dengan protoplas, juga melindungi DNA plasmid dari degradasi oleh enzim *nuclease* (Mass dan Werr 1989). Sedangkan elektroporasi dengan perlakuan listrik voltase tinggi menyebabkan permeabilitas tinggi untuk sementara pada membran sel dengan membentuk pori-pori sehingga DNA mudah masuk ke dalam protoplas. Integritas membran kembali membaik seperti semula dalam beberapa detik sampai semenit setelah perlakuan listrik. Jagung dan padi telah berhasil ditransformasi melalui elektroporasi dengan efisiensi antara 0,1-1%. Kelemahan penggunaan protoplas sebagai *explant* untuk transformasi adalah sulitnya protoplas beregenerasi dan ekstra komplikasi, serta variasi somaklonal akibat panjangnya periode kultur.

Transfer Gen secara Tidak Langsung

Dari banyak teknik transfer gen yang berkembang, teknik menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* paling sering digunakan untuk mentransformasi tanaman dikotil. *A. tumefaciens* mampu mentransfer gen ke dalam genom tanaman melalui eksplan baik yang berupa potongan daun (*leaf discs*) maupun bagian lain dari jaringan tanaman yang mempunyai potensi beregenerasi tinggi (Hinchee *et al.* 1988; Mullins *et al.* 1990).

Gen yang ditransfer terletak pada plasmid Ti (*tumor inducing*). Segmen spesifik DNA plasmid Ti disebut DNA T (transfer DNA) yang berpindah dari bakteri ke inti sel tanaman dan berintegrasi ke dalam genom tanaman.

Karena *A. tumefaciens* merupakan patogen tanaman maka *Agrobacterium* yang digunakan sebagai vektor untuk transformasi tanaman adalah bakteri dari jenis plasmid Ti yang dilucuti virulensinya (*disarmed*), sehingga sel tanaman yang ditransformasi oleh *Agrobacterium* dan yang mampu beregenerasi akan membentuk suatu tanaman sehat hasil rekayasa genetik. Tanaman tersebut akan menurunkan DNA T yang *disarmed* dan gen asing (dari sifat yang diinginkan) ke keturunannya. Teknik transformasi menggunakan vektor *Agrobacterium* pada tanaman dikotil telah berhasil dilakukan tetapi sebaliknya tidak umum digunakan pada tanaman monokotil. Meskipun demikian, beberapa peneliti melaporkan bahwa beberapa strain *Agrobacterium* berhasil mentransformasi tanaman monokotil seperti jagung dan padi.

Gen Ketahanan terhadap Serangga Hama

Gen ketahanan untuk memproduksi tanaman tahan serangga difokuskan pada protein yang mengandung kode gen tunggal, seperti Bt *endotoxins* (Cheng *et al.* 1992), *proteinase inhibitor* (Hilder *et al.* 1993; Johnson *et al.* 1989; Ryan 1990), *cowpea trypsin inhibitor* dan *pea seed lectin* (Gatehouse *et al.* 1991), *snow drop lectin* (Rao *et al.* 1998), *amylose inhibitor* (Ishimoto *et al.* 1996; Schroeder *et al.* 1995; Shade *et al.* 1994). Protein dengan kode gen tunggal lebih mudah diintroduksi ke dalam tanaman. Dalam buku ini akan diuraikan dua jenis gen, yaitu gen Bt dan gen dari kelompok *inhibitor*.

Gen Bt

Gen Bt merupakan hasil isolasi bakteri tanah *Bacillus thuringiensis*. Bakteri ini telah digunakan oleh petani di negara maju sebagai insektisida hayati yang aman sejak puluhan tahun yang lalu (Shaddock 1983, McClintock *et al.* 1995). Istilah populer *cry* (Held *et al.* 1982) merupakan singkatan dari *crystal* sebagai representasi gen dari strain Bt yang memproduksi protein kristal yang bekerja sebagai insektisida (*insecticidal crystal protein*) yang dapat mematikan serangga hama (MacIntosh *et al.* 1990). Sampai saat ini telah diisolasi gen Bt yang dimasukkan ke dalam delapan kelompok atau kelas *cry* (Rajamohan dan Dean 1995; Krattiger 1997, Crickmore *et al.* 1998). Kelas *cry* tersebut dikelompokkan berdasarkan virulensi-



nya yang spesifik terhadap kelompok serangga sasaran. Sebagai contoh *cryI*, *cryIX*, dan *cryX* mematikan serangga ordo Lepidoptera, *cryV* bisa mematikan serangga ordo Lepidoptera dan Coleoptera. Kristal protein tersebut hanya akan bekerja secara aktif apabila bertemu sinyal penerima (*receptor*) di dalam usus serangga dari ordo yang sesuai dengan kelas virulensinya, misalnya *cryI* hanya bisa aktif dan beracun pada serangga ordo Lepidoptera (Van Rie *et al.* 1990).

Semua gen yang menyandi 130-140 kDa *protoxin* dan aktif terhadap larva Lepidoptera digolongkan ke dalam kelas *cryI* yang selanjutnya dibagi dalam beberapa subkelas A sampai G. Berdasarkan identitas asam aminonya (>80%), subkelas gen *cryIA* dibagi menjadi IA(a), IA(b), dan IA(c). Tipe gen subkelas *cryII* yang memproduksi 66 kDa *protoxin* aktif terhadap Lepidoptera (*cryIIB*) saja atau aktif pada larva Lepidoptera dan Diptera (*cryIIA*). Gen *cryIII* menghasilkan 73 kDa protein aktif terhadap larva Coleoptera. Gen *cryIV* telah diisolasi dari subspecies *israelensis* dan menghasilkan 135, 128, 74, dan 72 kDa protein aktif terhadap larva Diptera. Gen baru telah diisolasi dari *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* dan diberi nama *cryV*. Gen tersebut menghasilkan 80 kDa protein aktif terhadap Lepidoptera dan Coleoptera. Gen yang aktif terhadap nematoda dimasukkan ke dalam klas *cryVI*.

Dari penelitian yang ada, umumnya tanaman tahan serangga yang berhasil ditransformasi berasal dari gen *cryBt* yang bersifat meracuni hama serangga dari ordo Coleoptera atau Lepidoptera (Barton *et al.* 1987; Cheng *et al.* 1992; Delannay *et al.* 1989; Perlak *et al.* 1990; Warren *et al.* 1992; Wilson *et al.* 1992). Racun Bt akan melekat pada *epithelial glycoprotein* dalam usus serangga, khususnya pada usus tengah. Keadaan tersebut akan menyebabkan bocornya usus sehingga cairan yang ada akan merembes ke luar ke daerah antara usus dan *hemocoel* dan mengakibatkan matinya serangga (Hilder *et al.* 1993). Ada beberapa gen *cry* yang ditransformasikan ke kapas transgenik, yaitu *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)*, *cryIF*, dan *cryIIA(b)* (Benedict dan Altman 2001; James 2002).

Gen dari Kelompok *Inhibitor*

Kelompok yang lain dari gen tahan serangga adalah *proteinase inhibitor*. Protein penghambat akan mengganggu sistem pencernaan pakan serangga, dengan menghasilkan senyawa antinutrisi yang menghambat kerja enzim proteinase. Supaya fungsi gen penghambat (*inhibitor*) tersebut efektif, gen harus diekspresikan di jaringan tanaman pada bagian yang diserang. Gen *proteinase inhibitor* II (dari kentang) yang diintroduksi ke tembakau telah meningkatkan ketahanan tanaman tembakau transgenik. Hal tersebut ditunjukkan melalui bioasai terhadap serangga *Manduca sexta* (Johnson *et al.* 1989).

Azuki bean yang dimasuki gen α -*amylase inhibitor* yang diperoleh dari *common bean*, telah menunjukkan ketahanan terhadap hama kumbang *Bruchus* (Ishimoto *et al.* 1996). Pada penelitian lain oleh Schroeder *et al.* (1995) dan Shade *et al.* (1994) gen α -*amylase inhibitor* dari *common bean* berhasil ditransformasikan ke kacang *pea* (*Pisum sativum* L.) dan menunjukkan ketahanan terhadap kumbang *Bruchus* (*Bruchus pisorum*).

PENYIAPAN SERANGGA UJI

Dalam buku ini akan diuraikan morfologi dan biologi serangga serta cara pembiakan dan pemeliharaan serangga di laboratorium. Serangga uji yang diuraikan adalah ulat sutera, hama penggerek batang jagung, dan hama penggerek buah kapas. Ulat sutera merupakan serangga non target atau serangga berguna, sedangkan hama penggerek batang jagung dan hama penggerek buah kapas digunakan dalam pengujian untuk mengetahui ekspresi gen interes, yaitu gen ketahanan serangga hama yang ditransformasikan ke dalam tanaman transgenik.

Morfologi dan Biologi Serangga

Morfologi dan biologi serangga yang akan diuraikan adalah ulat sutera, hama penggerek batang jagung, dan penggerek buah kapas. Setiap



serangga akan diuraikan morfologi dan biologi setiap fase telur, larva, pupa, dan imago, serta siklus hidupnya.

Ulat Sutera [*Bombyx mori* (L.)]

Ordo : Lepidoptera

Famili : Bombycidae

- **Telur**

Lama stadium telur 10-14 hari (Anonymous 2003b). Telur berbentuk bulat pipih, berukuran panjang 1,33 mm, lebar sekitar 1 mm, tebal 0,5 mm, dan bobot sekitar 0,5 mg. Ukuran dan bobotnya dapat bervariasi tergantung pada ras dan lingkungan tempat induk ulat dipelihara. Warna telur pada saat diletakkan kuning muda, dalam 2-3 hari telur mulai berubah sesuai dengan rasnya, yang pada umumnya berwarna abu-abu muda, abu-abu atau kehijauan. Di alam, telur diletakkan pada daun murbei (Atmosoedarjo *et al.* 2000).

- **Larva**

Larva *B. mori* biasanya disebut sebagai ulat sutera, bersifat monofagus, hanya memakan daun murbei. Larva akan berganti kulit sebanyak empat kali sebelum memintal kokon sutera, yang berasal dari satu serat, untuk berpupa (Anonymous 2003a). Lama stadium larva 27 hari (Anonymous 2003b). Larva yang baru keluar dari telur yang menetas panjangnya 3 mm, mempunyai banyak ruas di permukaan tubuhnya dan pada umumnya berwarna hitam. Larva umur sehari panjang tubuhnya menjadi 7 mm dengan permukaan kulit mengkilat. Setelah berumur 2 hari, ruas menjadi kurang jelas. Setelah itu larva berhenti makan sekitar 24 jam. Pada saat itu larva mengganti kulit lama dengan kulit baru. Peristiwa ini dikenal dengan istilah ganti kulit atau ekdisis. Karena selama stadium larva ganti kulit berlangsung sebanyak 4 kali, maka terdapat 5 periode makan atau instar. Pada instar V larva mencapai panjang maksimum 70 mm dan sangat rakus. Ketika larva telah berkembang penuh dan berhenti makan, kulit larva berubah menjadi transparan (Atmosoedarjo *et al.* 2000).

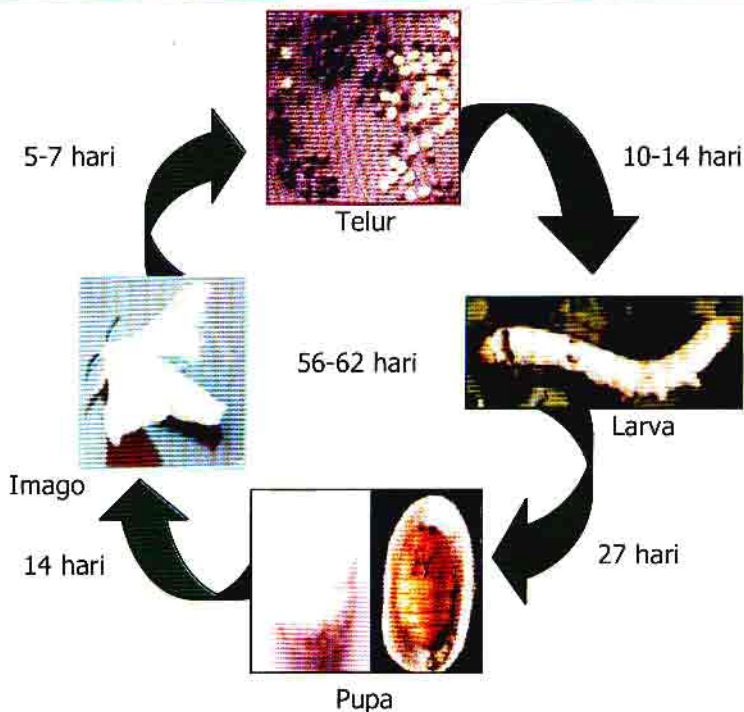
- Pupa

Lama stadium pupa 14 hari (Anonymous 2003b). Kokon sutera merupakan pelindung pupa, berwarna putih, putih kekuningan atau kuning tergantung pada faktor genetik ulat sutera. Perubahan dari larva menjadi pupa terlihat pertama kali dengan berhentinya makan. Tepat setelah selesai ekdisis/pengelupasan kulit, kulit pupa lunak dan berwarna kuning muda tetapi 2-3 jam kemudian kulit mengeras dan berwarna coklat (Atmosoedarjo *et al.* 2000).

- Imago

Lama stadium imago 5-7 hari (Anonymous 2003b). Imago mempunyai tubuh yang berat, membulat, tertutup bulu dan tidak dapat makan karena alat mulutnya tidak berkembang. Tubuh terdiri atas tiga bagian, yaitu kepala, thoraks, dan abdomen. Pada bagian kepala terdapat antena yang terdiri atas 35-40 segmen kecil yang ditumbuhi bulu-bulu dan sepasang mata majemuk. Thoraks terdiri atas tiga segmen, yaitu prothoraks, mesothoraks, dan metathoraks. Pada setiap segmen ada sepasang kaki thoraks. Pada mesothoraks dan metathoraks masing-masing mempunyai sepasang sayap. Abdomen terdiri atas delapan segmen pada imago jantan dan tujuh segmen pada imago betina. Ukuran tubuh imago betina lebih besar daripada imago jantan (Atmosoedarjo *et al.* 2000). Sayap dan tubuh biasanya berwarna putih tapi dapat bervariasi hingga coklat terang. Imago mempunyai sayap depan dengan ujung berkait yang menjadi ciri khusus famili Bombycidae, dan tidak dapat terbang. Panjang rentangan sayapnya 1,5-2,5 inchi (4-6 cm) (Anonymous 2003a). Seekor imago betina setelah kawin dapat menghasilkan 300-500 telur dalam beberapa kali peletakkan telur dan akan mati 2-3 hari setelah peletakkan telur. Siklus hidup ulat sutera berlangsung selama 56-62 hari (Anonymous 2003b) (Gambar 1).





Gambar 1. Siklus hidup ulat sutera (*Bombyx mori* L.) dimodifikasi dari Anonymous (2003b) dan koleksi pribadi

Hama Penggerek Batang Jagung [*Ostrinia furnacalis* (Guenee)]

Ordo : Lepidoptera

Famili : Bombycidae

- **Telur**

Lama stadium telur rata-rata 3,5 hari (Valdez dan Adalla 1983). Telur berbentuk pipih agak oval. Telur berwarna putih kekuningan (Kalshoven 1981) yang kemudian berubah menjadi hitam ketika akan menetas (Sudarmo 1991). Telur mulai diletakkan pada umur tanaman satu bulan. Puncak peletakan telur terjadi sebelum keluar rambut tongkol (*silking*). Telur diletakkan secara berkelompok seperti sisik ikan (OISAT 2005)

pada permukaan bawah daun dekat tulang daun, terutama pada daun muda, yaitu tiga daun teratas (Kalshoven 1981; Nafus dan Schreiner 1987). Pada satu daun tanaman dapat ditemukan 2-3 atau lebih kelompok telur. Satu kelompok telur terdiri atas 5-50 telur (OISAT 2005). Jumlah telur yang dihasilkan imago pada makanan campuran tongkol dan kacang hijau mencapai 407,4 butir (Bedjo 1990).

- Larva

Lama stadium larva yang diberi makanan buatan di laboratorium 19-22 hari (Bedjo 1990). Larva yang baru keluar dari telur yang menetas berwarna keungu-unguan dengan kepala berwarna hitam atau coklat dan badannya berwarna gelap berbintik agak sirkuler (Sudarmo 1991). Instar pertama langsung berpencar ke bagian tanaman yang lain. Pada stadium pembentukan malai, larva instar I hingga instar III akan makan daun muda yang masih menggulung dan pada permukaan daun yang terlindung dari daun yang telah membuka. Pada stadium lanjut dari tanaman jagung, larva instar I dan II berada pada bunga jantan. Sebagian besar larva instar III masih berada pada bunga jantan, meskipun sudah ada yang berada pada bagian tanaman lain. Instar IV dan VI mulai membor pada bagian buku, masuk ke dalam batang dan membor ke bagian atas. Dalam satu lubang dapat ditemukan lebih dari satu larva. Pada tongkol juga sering ditemukan larva instar I-III dan makan pada pucuk tongkol dan rambut jagung. Instar berikutnya makan pada tongkol dan biji (Baco dan Tandiang 1988). Larva yang sudah tumbuh sempurna berwarna krem dan putih kotor dengan sejumlah bintik kecil coklat (Sudarmo 1991). Setelah mendekati masa berpupa, lubang keluar disiapkan pada batang, tertutup oleh satu lapis epidermis (Kalshoven 1981).

- Pupa

Lama stadium pupa 6-8 hari (Bedjo 1990). Pupa terbentuk di dalam batang atau rambut jagung tempat larva makan (OISAT 2005). Pupa menyerupai gelendong dan meruncing pada bagian posterior, berwarna coklat sampai coklat gelap (Sudarmo 1991) dan panjangnya 2-2,5 cm (OISAT 2005).

- Imago

Lama stadium imago sekitar 7 hari (Kalshoven 1981), warnanya bervariasi mulai kuning pucat sampai coklat cerah. Imago betina berwarna coklat-kuning pucat dengan tanda seperti pita tak beraturan melintang pada sayapnya. Imago jantan mempunyai tanda yang sama tetapi berwarna lebih gelap. Panjang imago jantan 13,5 mm dengan rentangan sayap 25 mm. Imago betina lebih gemuk dengan panjang sekitar 14,5 mm dengan rentangan sayap 29 mm (Sudarmo 1991). Serangga dewasa akan muncul pada malam hari pukul 20.00-22.00 dan langsung kawin serta meletakkan telur pada malam yang sama hingga satu minggu sesudahnya. Seekor imago betina dapat meletakkan telur 300-500 butir. Imago dapat terbang sejauh 300-400 m (Kalshoven 1981; Baco dan Tandiabang 1988). Siklus hidup hama penggerek batang jagung berlangsung selama 35-40 hari (Gambar 2).

Hama Penggerek Buah Kapas
[*Helicoverpa armigera* (Hubner) Hardwicke]

Ordo : Lepidoptera

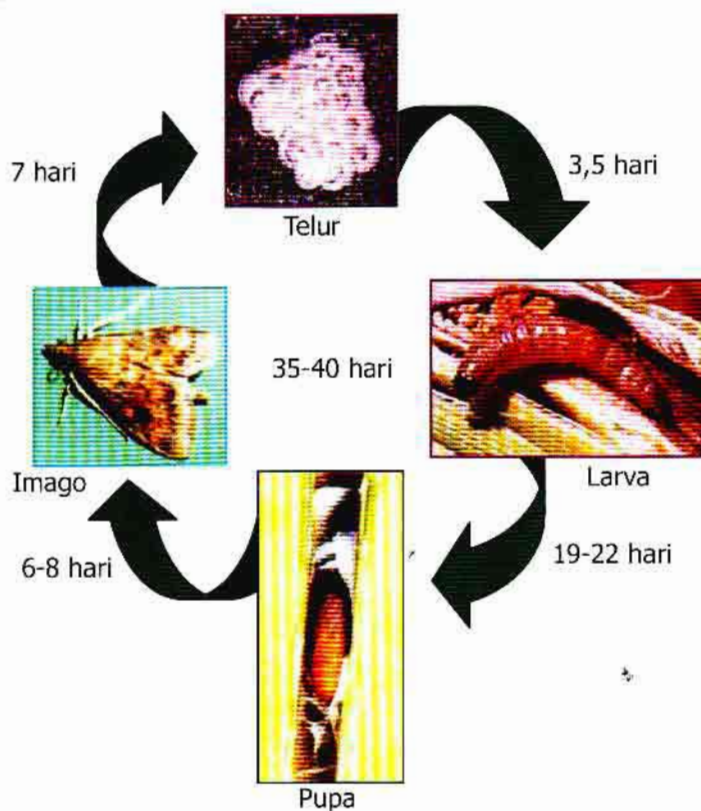
Famili : Noctuidae

- Telur

Lama stadium telur 4 hari (Soebandrijo 2003). Telur berbentuk seperti kubah dengan permukaan yang kasar (Deuter *et al.* 2004), berdiameter sekitar 0,5 mm dan berwarna putih sampai coklat. Telur diletakkan secara terserak satu per satu pada daun muda, pucuk tanaman, dan kelopak badan buah (Soebandrijo 2003). Produksi telur yang diberi makanan buatan di laboratorium berkisar 96-113,6 butir per induk betina (Bedjo 1990).

- Larva

Lama stadium larva 13-19 hari, mengalami 5 kali pergantian kulit, dan mampu merusak 10-12 buah muda (Soebandrijo 2003). Larva mempunyai warna yang sangat bervariasi, yaitu hijau kekuningan, hijau, coklat,



Gambar 2. Siklus hidup hama penggerek batang jagung [*Ostrinia furnacalis* (Guenee)] dimodifikasi dari Breithaupt (1993), Hoffmann (2005), dan Herbison-Evans dan Crossley (2005)

agak hitam, dan kuning (Soejitno *et al.* 1990). Larva yang baru keluar dari telur yang menetas panjangnya 1,44 mm dan berwarna putih kekuning-kuningan dengan kepala berwarna hitam (Baco dan Tandiang 1988; Sudarmo 1991). Larva muda akan makan jaringan daun, setelah memasuki instar III akan menyerang buah kapas apabila tanaman sudah berbuah. Tanda serangan pada buah kapas berupa lubang bekas gerakan dan serbuk kotoran berwarna coklat dekat lubang gerakan. Pada kedelai, larva akan makan jaringan daun dan menuju polong kedelai untuk me-

makan biji. Pada waktu makan biasanya kepala dan sebagian badannya masuk ke dalam polong. Tanda serangannya berbeda dengan *Etiella* spp. yaitu bentuk lubang bekas makannya tidak beraturan, lebih besar, dan tidak dijumpai larva dan kotoran di dalam polong yang bijinya terserang. Serangga ini termasuk polifagus dan dapat merusak kacang hijau, kacang buncis, tomat, jagung, tembakau, sorgum, jeruk, bunga matahari, jarak, linum, pupuk hijau, flax, dan tanaman hortikultura lainnya. Tanaman sorgum lebih disukai sebagai tempat meletakkan telur, tetapi hanya 25 persen yang mencapai stadium imago (Soejitno *et al.* 1990). Pada jagung, larva merusak rambut atau menggerek kelobot kemudian memakan tongkol dan jagung muda (Suprpto dan Marzuki 2002). Larva instar III biasanya kanibal dan jarang ditemukan lebih dari 2 ekor larva pada tongkol yang sama. Larva yang sudah tumbuh sempurna panjangnya 34,5 mm (Sudarmo 1991). Setelah mencapai instar akhir, larva meninggalkan tongkol dan berpupa di dalam tanah (Kalshoven 1981).

- Pupa

Lama stadium pupa 10-12 hari (Soebandrijo 2003). Pupa terbentuk di dalam sel/bilik kecil di dalam tanah pada kedalaman 5-10 cm (Deuter *et al.* 2004), panjangnya 14-20 mm (Soejitno *et al.* 1990), berwarna kemerah-merahan atau coklat cerah, gemuk, dan mengkilat (Sudarmo 1991).

- Imago

Penggerek buah kapas muncul sejak tanaman berumur 35 HST sampai buah-buah menjelang tua. Lama stadium imago 6-10 hari (Soebandrijo 2003), panjang tubuhnya 20-30 mm dengan rentangan sayap 35-40 mm, warnanya bervariasi mulai abu-abu-hijau sampai oranye-coklat. Sayap depan mempunyai garis gelap dan pita coklat yang melebar dari depan hingga ke belakang. Sayap belakang suram dengan tepi berwarna coklat gelap yang lebar, vena sayap berwarna coklat, dan sebuah tanda gelap berbentuk seperti koma pada bagian tengahnya (Soejitno *et al.* 1990). Imago terbang pada malam hari dan sangat tertarik pada cahaya. Pada saat istirahat, sayap diletakkan melipat di atas tubuhnya (Deuter *et al.*

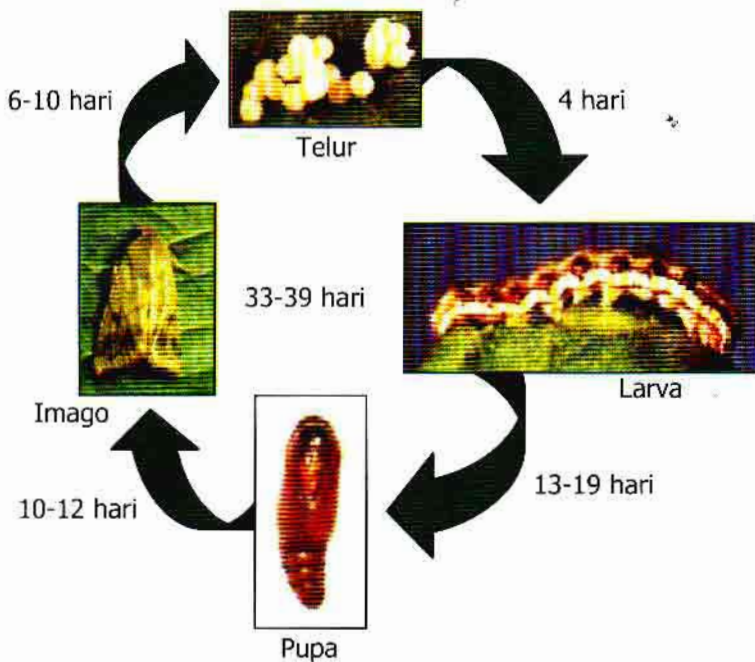
2004). Imago betina meletakkan telur pada malam hari dan dapat menghasilkan 1.062 telur (Soejitno *et al.* 1990). Siklus hidup hama penggerek buah kapas berlangsung selama 33-39 hari (Soebandrijo 2003) (Gambar 3).

Cara Pembiakan dan Pemeliharaan Serangga di Laboratorium

Ulat Sutera (*B. mori*)

- Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang diperlukan untuk pembiakan dan pemeliharaan ulat sutera adalah telur ulat sutera (*B. mori*), daun murbei untuk pakan larva (Gambar 4), madu encer (1 : 1) secukupnya untuk pakan imago, pisau dan alas untuk memotong, pinset dan gunting, kotak plastik (berukuran

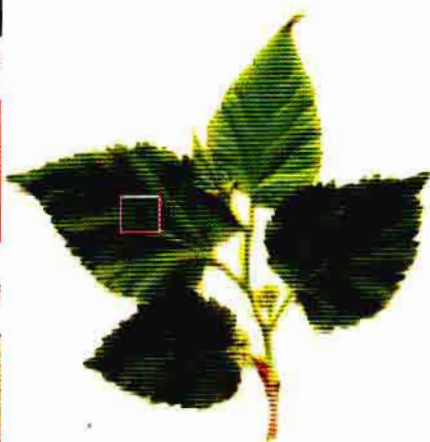
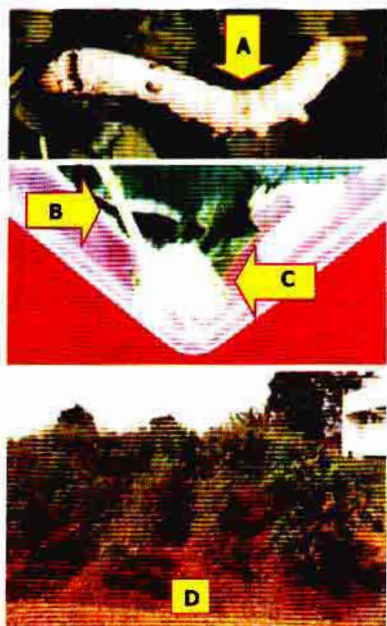


Gambar 3. Siklus hidup hama penggerek buah kapas [*Helicoverpa armigera* (Hubner) Hardwicke] dimodifikasi dari Nappfast (2003) dan koleksi pribadi

panjang 39 cm, lebar 31 cm, dan tinggi 10,5 cm), toples plastik untuk peletakan telur (berdiameter 14 cm dan tinggi 18 cm), serta toples plastik berukuran sedang (berdiameter 17 cm dan tinggi 11 cm) dan kecil (berdiameter 12 cm dan tinggi 8 cm). Bagian tengah tutup toples dimodifikasi dengan kain kasa sehingga tidak kedap udara. Selain itu, diperlukan bahan lain seperti kertas, kertas saring, kardus untuk sekat, kain kasa, kapas, dan kawat.

- Cara

Cara yang dilakukan untuk pembiakan dan pemeliharaan ulat sutera adalah toples plastik kecil diberi alas kertas saring, daun murbei muda ditaburkan ke dalam toples. Larva yang baru keluar dari telur yang menetas diinfestasikan ke dalam toples, kemudian toples ditutup rapat dan larva dipelihara hingga mencapai instar III. Pemberian pakan dilakukan 3 kali dalam sehari. Sebelum diberikan sebagai pakan, daun murbei dirajang halus agar larva kecil dapat memakan helaian daun. Ukuran baku dari potongan daun antara 0,5-1 cm untuk instar I, 1,5-2 cm untuk instar II, dan 3-4 cm untuk instar III. Perlu disiapkan keranjang plastik yang seluruh permukaannya dilapisi kertas, daun murbei yang telah dirajang ditaburkan ke dalamnya. Larva yang telah mencapai instar III dipindahkan ke dalam keranjang plastik tersebut dan dipelihara hingga mencapai instar V. Kepadatan larva di dalam keranjang plastik tergantung pada ukuran larva, yaitu berkisar 50-200 ekor. Larva instar akhir dipindahkan ke dalam keranjang plastik yang telah diberi sekat untuk tempat berpupa/berkokon (Gambar 4). Disiapkan toples plastik untuk peletakan telur: dindingnya dilapisi kain kasa, kemudian kapas yang telah diberi madu encer digantungkan di dalamnya. Imago yang baru keluar dari kokon dimasukkan ke dalam toples tersebut. Imago betina akan meletakkan telur di permukaan kain kasa. Kain kasa berisi telur disimpan di dalam toples plastik kecil hingga telur menetas menjadi larva yang siap digunakan untuk studi atau pengujian.



A = larva, B = larva, C = pupa, D = pertanaman murbei, E = daun murbei

Gambar 4. Perbanyakan ulat sutera pada daun murbei

Hama Penggerek Batang Jagung (*O. furnacalis*)

- **Bahan dan Alat**

Bahan dan alat yang diperlukan untuk pembiakan dan pemeliharaan hama penggerek batang jagung adalah larva penggerek batang jagung (*O. furnacalis*) koleksi dari lapang, pakan buatan untuk pakan larva, madu encer (1 : 1) secukupnya untuk pakan imago, kuas nomor 1, pinset, dan gunting, serta toples plastik untuk peletakan telur (berdiameter 14 cm dan tinggi 18 cm), toples plastik berukuran sedang (berdiameter 17 cm dan tinggi 11 cm), dan kecil (berdiameter 12 cm dan tinggi 8 cm). Bagian tengah tutup toples dimodifikasi dengan kain kasa sehingga tidak kedap udara. Selain itu, diperlukan *tray*/wadah plastik (berukuran panjang 29 cm, lebar 21 cm, dan tinggi 6 cm), cawan petri kecil (berdiameter 9 cm), kain kasa, kertas, kapas, dan kawat.

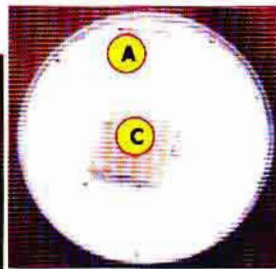
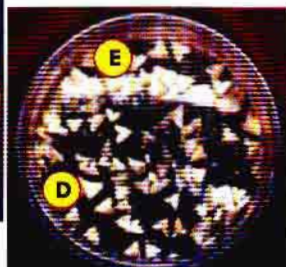
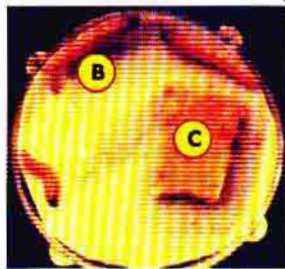
- Cara

Cara yang dilakukan untuk pembiakan dan pemeliharaan hama penggerek batang jagung adalah pakan buatan dibuat dan dicetak ke dalam *tray*. Disiapkan toples berukuran sedang yang diberi alas kertas. Pakan buatan dimasukkan secukupnya ke dalam toples tersebut. Larva yang baru keluar dari telur yang menetas diinfestasikan ke dalam toples, kemudian toples ditutup rapat. Pakan larva diganti setiap minggu hingga larva mencapai instar V. Selain itu, disiapkan toples berukuran sedang untuk tempat berpupa: diberi alas kertas, kertas yang dilipat-lipat memanjang dimasukkan ke dalamnya. Larva instar akhir dipindahkan ke dalam toples tersebut, kemudian toples ditutup rapat. Kepadatan larva di dalam toples tergantung pada ukuran larva, yaitu berkisar 100-200 ekor. Setelah larva berkembang menjadi pupa, pupa dipindahkan ke dalam cawan petri kecil. Disiapkan toples plastik untuk peletakan telur: dindingnya dilapisi kertas, kemudian kapas yang telah diberi madu encer digantungkan di dalamnya. Imago yang baru keluar dari pupa dimasukkan ke dalam toples tersebut. Imago betina akan meletakkan telur di permukaan kertas. Kertas berisi telur disimpan di dalam toples plastik kecil hingga telur menetas menjadi larva yang siap digunakan untuk studi atau pengujian. Contoh pakan buatan, larva, pupa, dan imago dapat dilihat pada Gambar 5.

Hama Penggerek Buah Kapas (*H. armigera*)

- Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang diperlukan untuk pembiakan dan pemeliharaan hama penggerek buah kapas adalah larva penggerek buah kapas (*H. armigera*) koleksi dari lapang, pakan buatan untuk larva, madu encer (1 : 1) secukupnya untuk pakan imago, kuas nomor 1, pinset, dan gunting, serta toples plastik untuk peletakan telur (berdiameter 14 cm dan tinggi 18 cm), dan kecil (berdiameter 12 cm dan tinggi 8 cm). Bagian tengah tutup toples dimodifikasi dengan kain kasa sehingga tidak kedap udara. Selain itu, diperlukan *cup/mangkuk* plastik kecil (diameter 2,5-4 cm dan tinggi 4 cm) dan tutupnya, cawan petri kecil (berdiameter 9 cm), kain kasa, kertas coklat, kapas, dan kawat.



A = larva instar IV, B = larva instar IV akhir, C = pakan buatan, D = pupa, E = imago

Gambar 5. Perbanyak *O. furnacalis* dalam pakan buatan

- Cara

Cara yang dilakukan untuk pembiakan dan pemeliharaan hama penggerek buah kapas adalah pakan buatan dibuat dan dituang ke dalam *cup* sebanyak lebih kurang setengah volúmenya. Setelah pakan buatan dingin, karena bersifat kanibal, hanya satu ekor larva yang diinfestasikan ke dalam setiap *cup*, kemudian *cup* ditutup rapat. Satu *cup* pakan buatan cukup untuk pakan larva mulai instar I hingga berpupa. Pupa dibersihkan dari sisa-sisa pakan buatan dan dikumpulkan ke dalam cawan petri kecil. Disiapkan toples plastik untuk peletakan telur: dindingnya dilapisi kertas coklat dan kain kasa, kemudian kapas yang telah diberi madu encer digantungkan di dalamnya. Imago yang baru keluar dari pupa dimasukkan ke dalam toples tersebut. Imago betina akan meletakkan telur di permukaan kain kasa. Kain kasa yang berisi telur disimpan di dalam toples plastik kecil hingga telur menetas menjadi larva yang siap digunakan untuk studi atau pengujian.

Pakan Buatan untuk *O. furnacalis* dan *H. armigera*

- Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang diperlukan dalam pembuatan pakan buatan untuk *O. furnacalis* dan *H. armigera* adalah panci dan kompor, blender, timbangan digital, gelas ukur 1000 ml, *tray*/wadah plastik (berukuran panjang 29 cm, lebar 21 cm dan tinggi 6 cm) atau *cup*/mangkuk plastik kecil

(diameter 2,5-4 cm dan tinggi 4 cm) dan tutupnya, sendok plastik, pengaduk kayu dan *aluminium foil*. Selain itu, diperlukan bahan-bahan seperti agar-agar kertas (48 g), kacang merah (250 g), dedak/tepung gandum (200 g), *casein* (100 g), *yeast fermipan* (125 g), *ascorbic acid* (12 g), *sorbic acid* (6 g), *methyl paraben* (10 g), *tetracyclin* (0,25 g), *vitamin mix* (20 g), dan akuades (3000 ml).

- Cara

Cara yang dilakukan dalam pembuatan pakan buatan untuk *O. furnacalis* dan *H. armigera* adalah agar-agar kertas direndam dalam akuades hingga mengembang, kemudian air rendaman dibuang. Agar-agar dimasak dengan 1000 ml akuades hingga mendidih. Kacang merah diblender hingga halus. Kacang merah yang telah dihaluskan dicampur dengan dedak, *casein*, *yeast fermipan*, *ascorbic acid*, *sorbic acid*, *methyl paraben*, dan 1000 ml akuades hingga rata. Bahan-bahan tersebut dicampurkan dengan agar-agar di dalam panci dan dimasak selama lebih kurang 2 menit. Setelah campuran bahan hangat, campuran *tetracyclin* dan *vitamin mix* dimasukkan ke dalamnya. Campuran bahan dicetak ke dalam *tray* atau *cup* dan setelah dingin disimpan di dalam lemari pendingin.

BIOASAI TANAMAN TRANSGENIK

Bioasai tanaman transgenik adalah suatu pengujian untuk mengetahui dampak tanaman transgenik terhadap organisme non target atau untuk mengetahui ekspresi dari suatu gen interes (misalnya gen ketahanan serangga hama) yang ditransformasikan ke dalam tanaman transgenik. Dalam buku ini akan diuraikan studi dampak jagung Bt dan kapas Bt terhadap ulat sutera dan ekspresi gen ketahanan dua tanaman transgenik tersebut terhadap serangga hama tertentu.

Jagung Bt

Jagung Bt adalah jagung transgenik yang mengandung gen *cryIA(b)*. Gen *cryIA(b)* ditransferkan ke tanaman jagung melalui penembakan gen

(*particle bombardment*). Selain gen *cryIA(b)*, bahan atau materi genetik eksogenus (*exogenous*) yang ditransformasikan ke dalam jagung Bt adalah 35S (dari virus kembang kol atau CaMV) sebagai promoter dengan duplikasi enhancer (E35S) dan sebuah intron *hsp* (*heat shock protein*) 70 untuk meningkatkan ekspresi gen *cryIA(b)*. Dengan menggunakan promoter 35S, gen *cryIA(b)* akan diekspresikan ke seluruh bagian atau jaringan tanaman jagung seperti batang, daun, bunga, serbuk sari atau pollen, dan tongkol jagung. Apabila ada ulat dari ordo Lepidoptera yang mempunyai *receptor* memakan bagian-bagian jagung tersebut, ulat akan mati, karena bagian tersebut mengandung gen kristal protein Bt. Sasaran (*target*) utama serangga hama yang dituju dalam penggunaan jagung Bt adalah penggerek batang jagung (*O. furnacalis* dan *H. armigera*). Pada bab bioasai jagung Bt ini akan dijelaskan studi dampak jagung Bt terhadap ulat sutera dan studi ekspresi ketahanan jagung Bt terhadap *H. armigera* dan *O. furnacalis*.

Studi Dampak Jagung Bt terhadap Ulat Sutera (*B. mori*)

Studi ini ditujukan untuk mengetahui apakah jagung Bt akan berdampak negatif terhadap ulat sutera. Studi dampak tanaman transgenik ini diilhami oleh adanya suatu "kasus" penelitian yang dilakukan oleh Losey *et al.* (1999) di Cornell University, Amerika Serikat. Studi tersebut mereka lakukan karena jagung Bt yang ada di pasaran menggunakan promoter 35S.

Losey dan kawan-kawan melakukan *feeding study* dengan menggunakan pakan buatan yang terdiri atas campuran daun *milkweed* dan serbuk sari jagung Bt pada ulat kupu-kupu *Monarch*. Hasil penelitian Losey menunjukkan bahwa 44% ulat kupu-kupu *Monarch* yang diberi pakan buatan yang dicampur dengan serbuk sari jagung Bt mati (Losey *et al.* 1999). Losey mengatakan bahwa *tidak ada bukti langsung* yang bisa ditunjukkan atau dijadikan bukti langsung bahwa racun Bt dari serbuk sari jagung Bt adalah penyebab kematian ulat *Monarch*. Losey juga mengatakan bahwa "*penelitian kami dilakukan di dalam laboratorium dan menimbulkan isu penting, tetapi akan kurang tepat kalau diambil suatu keputusan mengenai populasi kupu-kupu Monarch di lapang hanya berdasarkan pada hasil penelitian awal studi kami*". Pernyataan tersebut memang dikaitkan dengan kehidupan yang sebenarnya dari kupu-kupu *Monarch* di alam.

Ada kelemahan dari penelitian awal Losey dan kawan-kawan tersebut, karena pengujian dilakukan di laboratorium terhadap larva atau ulat kupu-kupu *Monarch* yang diberi pakan buatan yang dipaksakan dan dalam jumlah serbuk sari yang begitu besar sehingga ulat kupu-kupu *Monarch* tidak mempunyai alternatif lain selain memakannya (Loedin 2000). Shelton dan Roush (1999) menyatakan bahwa hasil penelitian Losey di laboratorium tersebut tidak dapat digunakan sebagai kesimpulan terhadap keadaan kupu-kupu *Monarch* di alam. Seperti diketahui bahwa pakan utama ulat *Monarch* adalah *milkweed* (*Asclepias syriaca*, sebangsa gulma) yang tumbuh di daerah padang rumput, tepi hutan, tepi sungai, tepi jalan, dan secara umum tidak dijumpai di daerah peladangan jagung.

Penelitian Hansen (1999) lebih realistis dan relevan (Suwanto 2000) karena dilaksanakan di lapang dengan mengambil langsung contoh daun *milkweed*. Di lokasi kupu-kupu *Monarch* ditemukan, tidak banyak serbuk sari jagung yang dijumpai dan menempel di daun *milkweed* (Hansen 1999), serta jumlahnya jauh lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah yang digunakan dalam penelitian Losey *et al.* (1999). Di samping itu, telah diteliti di *Iowa State University* bahwa kepadatan penyebaran serbuk sari jagung adalah di dalam areal tanaman jagung, kepadatan serbuk sari berkurang 70% pada tepi ladang dan 90% pada jarak 3 m dari tepi ladang jagung (Hansen dan Obrycki 1999). Menurut hasil penelitian Kendall (1999), diperlukan 500 butir serbuk sari jagung Bt/cm² untuk membuat sakit larva kupu-kupu *Monarch*, tetapi ternyata di lapang hanya ditemukan rata-rata 78 butir serbuk sari jagung pada tanaman *milkweed* yang tumbuh berdekatan dengan ladang jagung.

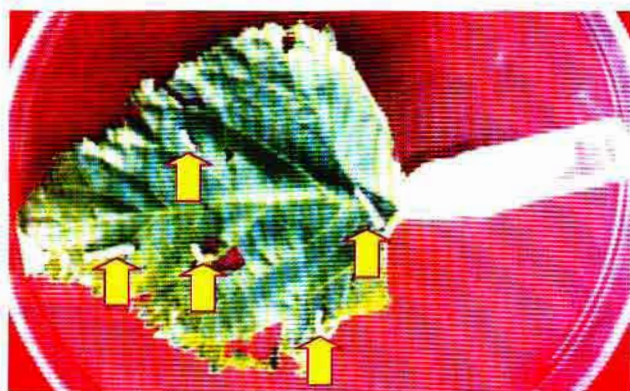
- Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang diperlukan untuk studi dampak jagung Bt adalah ulat sutera instar II, serbuk sari jagung Bt dan non Bt, daun murbei, akuades, alkohol 70%, kertas saring, kertas *tissue*, kapas, parafilm, label, botol kecil (berdiameter 1,3 cm dan tinggi 4 cm), cawan petri kecil (berdiameter 9 cm) dan toples plastik kecil (berdiameter 12 cm dan tinggi 8 cm). Bagian tengah tutup toples dimodifikasi dengan kain kasa sehingga

tidak kedap udara. Selain itu, diperlukan kuas nomor 1, pinset, pipet plastik, dan gunting.

- Cara

Cara yang dilakukan untuk studi dampak jagung Bt adalah pemurnian serbuk sari jagung menggunakan metode Hellmich *et al.* (2001). Serbuk sari murni dibuat suspensi menggunakan akuades steril dengan kerapatan $6,5 \times 10^2$ serbuk sari/ml (Pleasant *et al.* 2001), kemudian diusapkan pada permukaan atas daun murbei. Daun murbei yang digunakan adalah daun termuda yang telah membuka penuh. Studi ini membandingkan kemungkinan dampak tiga perlakuan terhadap mortalitas ulat sutera, yaitu daun murbei + serbuk sari jagung Bt, daun murbei + serbuk sari jagung non Bt, dan daun murbei sebagai kontrol. Tangkai daun dibalut dengan kapas, dimasukkan ke dalam botol kecil berisi akuades kemudian mulut botol ditutup dengan parafilm (Gambar 6). Botol kecil tersebut diletakkan dalam cawan petri kecil. Sebelum digunakan, cawan petri disterilasi dengan alkohol 70%. Lima ekor ulat sutera instar II diinfestasikan ke dalamnya dengan menggunakan kuas, kemudian cawan petri tersebut ditutup rapat. Cawan petri diinkubasikan pada suhu 25°C dan kelembaban 90%. Perlu disiapkan toples plastik kecil yang diberi alas kertas saring



Panah kuning menunjukkan ulat sutera yang diinfestasikan

Gambar 6. Infestasi ulat sutera pada daun murbei yang diberi polen/tepung sari jagung Bt

yang telah dibasahi dengan akuades. Daun murbei tanpa serbuk sari dimasukkan ke dalam toples tersebut. Setelah 48 jam perlakuan, larva hidup dipindahkan ke daun murbei di dalam toples dan ditutup rapat. Pengamatan dilakukan pada hari ke-5 setelah pemindahan larva (Gambar 7). Peubah yang diamati adalah banyaknya dan bobot larva hidup. Pengujian diulang sebanyak 10 kali. Data yang didapat dianalisis menggunakan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf signifikansi 5%.

Studi Ekspresi Gen Ketahanan Jagung Bt terhadap *O. furnacalis*

- Bahan dan Alat

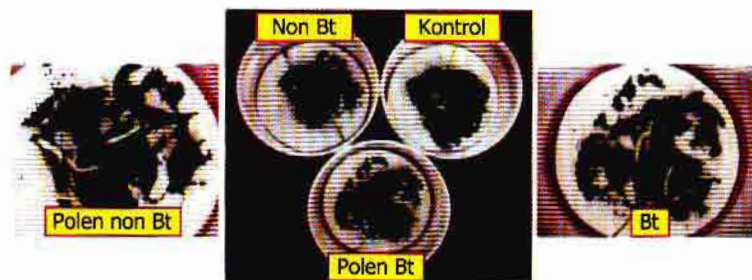
Bahan dan alat yang diperlukan untuk studi ekspresi gen ketahanan jagung Bt terhadap *O. furnacalis* adalah benih jagung Bt dan non Bt (kontrol), larva *O. furnacalis* berumur 3 hari setelah menetas, akuades, alkohol 70%, media tanam, cawan petri plastik (berdiameter 5 cm), kertas saring *Whatman*, kertas *tissue*, dan label. Selain itu, diperlukan pinset, gunting, kuas nomor 1, pipet plastik, dan pot plastik nomor 30.

- Cara

Studi ekspresi gen ketahanan jagung Bt terhadap *O. furnacalis* ada dua, yaitu infestasi larva di laboratorium dan di rumah kaca.

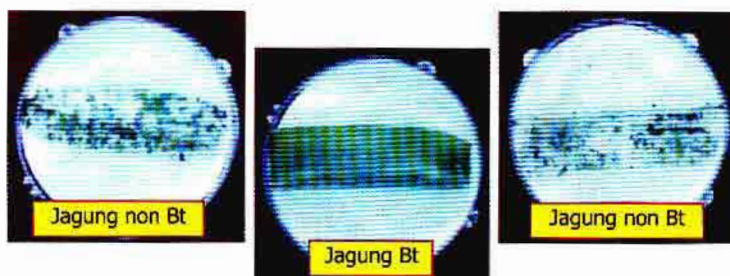
- ◆ Infestasi larva *O. furnacalis* pada daun jagung dalam cawan petri di laboratorium

Cara yang dilakukan untuk studi ini mengikuti metode Davis *et al.* (1989; 1998). Tahapan kegiatan seperti halnya pada kegiatan studi



Gambar 7. Uji dampak jagung Bt dan non Bt terhadap ulat sutera

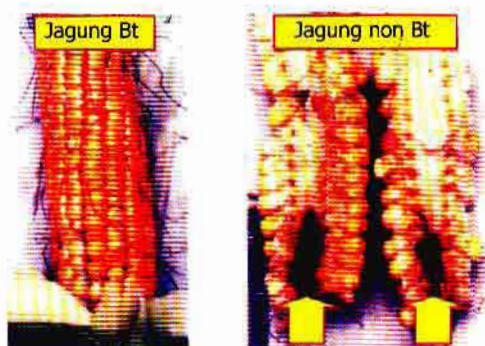
ekspresi gen ketahanan jagung Bt terhadap *H. Armigera*, yaitu persiapan media tanam dan penanaman, pengambilan sampel dan persiapan bahan infestasi, dan infestasi. Cara infestasi adalah daun jagung Bt termuda yang telah terbuka sempurna diambil dari tanaman berumur 2, 4, 6, dan 8 minggu setelah tanam (MST), dipotong sepanjang 5 cm kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri plastik yang telah diberi alas kertas saring *Whatman* yang telah dibasahi dengan akuades. Sebelum digunakan, cawan petri disterilisasikan dengan alkohol 70%. Tiga ekor larva *O. furnacalis* umur 3 hari setelah menetas diinfestasikan ke dalam cawan petri tersebut dengan menggunakan kuas kemudian cawan petri ditutup rapat. Cawan petri diinkubasikan di dalam ruangan dengan suhu 27°C dan kelembaban 60-70%. Pengamatan dilakukan 5 hari setelah infestasi (Gambar 8). Peubah yang diamati adalah mortalitas larva, bobot larva hidup, dan kerusakan daun. Kerusakan daun dihitung dengan menggunakan cara penilaian (*scoring*) Bolin dan Pershing, yaitu 1 = tidak ada kerusakan; 2 = ≤ 2 lubang kecil (diameter lubang ≤ 1 mm); 3 = > 2 lubang kecil (diameter lubang ≤ 1 mm); 4 = ≤ 2 lubang besar (1 mm < diameter < 2 mm); 5 = 2 lubang besar (1 mm < diameter < 2 mm); 6 = luka (diameter ≥ 2 mm), $\leq 2\%$ bagian daun yang dimakan; 7 = luka, 3-25% bagian daun yang dimakan; 8 = luka, 26-50% bagian daun yang dimakan; 9 = luka, 51-75% bagian daun yang dimakan; dan 10 = luka, 75% bagian daun yang dimakan. Pengujian diulang sebanyak 10 kali.



Gambar 8. Bioasai daun jagung Bt dan non Bt dengan *O. furnacalis* 5 hari setelah infestasi

♦ Infestasi larva *O. furnacalis* pada tanaman jagung di rumah kaca

Cara yang dilakukan untuk studi ini mengikuti metode dari Abel *et al.* (2000). Tahapan kegiatannya adalah tanaman jagung pada fase vegetatif (4 MST) dan fase generatif (8 MST) diinfestasi dengan 15 ekor larva umur 3 hari setelah menetas per tanaman masing-masing untuk fase vegetatif dan fase generatif. Infestasi dilakukan dengan meletakkan larva pada ketiak daun jagung dengan menggunakan kuas. Pengamatan dilakukan 3 minggu setelah infestasi baik fase vegetatif maupun generatif (Gambar 9). Peubah yang diamati adalah kerusakan daun, ukuran panjang gergakan pada tangkai tongkol (Abel *et al.* 2000), dan batang, serta jumlah gergakan per tongkol dan per batang. Kerusakan daun dihitung dengan menggunakan cara penilaian (*scoring*) 1-9 LDR (*leaf damage rating*) dari Guthrie yang dimodifikasi, yaitu 1 = tidak ada kerusakan; 1,5 = ada lubang kecil, pada ≤ 2 daun; 1,75 = ada lubang kecil, pada > 2 daun; 2 = ≤ 2 lubang besar pada ≤ 2 daun, tidak ada luka memanjang; 2,5 = > 2 lubang besar pada ≤ 2 daun, tidak ada luka memanjang; 3 = lubang besar pada ≥ 3 daun, tidak ada luka memanjang; 4 = beberapa luka memanjang ($\leq 2,5$ cm), pada ≤ 2 daun; 5 = > 2 daun dengan luka panjang ($\leq 2,5$ cm); 6 = ≤ 2 daun dengan luka memanjang berukuran $> 2,5$ cm; 6,5 = > 2 daun



Panah merah lubang bekas gergakan *O. furnacalis*

Gambar 9. Bioasai tongkol jagung Bt dan non Bt dengan *O. furnacalis* 3 minggu setelah infestasi

(<1/2 daun tanaman) dengan luka memanjang berukuran >2,5 cm; 7 = luka memanjang (>2,5 cm) pada 1/2-2/3 dari daun tanaman; 8 = luka memanjang (>2,5 cm) pada 2/3 dari daun tanaman; dan 9 = >2/3 daun pada tanaman dengan luka memanjang (>2,5 cm). Pengujian diulang sebanyak 5 kali.

Studi Ekspresi Gen Ketahanan Jagung Bt terhadap *H. armigera*

• Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang diperlukan untuk studi ekspresi gen ketahanan jagung Bt terhadap *H. armigera* adalah benih jagung Bt dan non Bt (kontrol), larva *H. armigera* yang baru keluar dari telur yang menetas, akuades, alkohol 70%, media tanam, kertas saring *Whatman*, kertas *tissue*, label, cawan petri plastik (berdiameter 5 cm), serta toples plastik untuk peletakan telur (berdiameter 14 cm dan tinggi 18 cm) dan toples plastik kecil (berdiameter 12 cm dan tinggi 8 cm). Bagian tengah tutup toples dimodifikasi dengan kain kasa sehingga tidak kedap udara. Selain itu, diperlukan pinset, gunting, kuas nomor 1, pipet plastik, dan pot plastik nomor 30.

• Cara

Cara yang dilakukan untuk studi ekspresi gen ketahanan jagung Bt terhadap *H. armigera* terdiri atas tiga kegiatan utama, yaitu persiapan media tanam dan penanaman, pengambilan sampel dan persiapan bahan infestasi, dan infestasi. Tiga kegiatan tersebut ditujukan untuk studi ekspresi di laboratorium.

- ◆ Persiapan media tanam dan penanaman: tanah (*top soil*), pupuk organik, dan sekam dicampur dengan perbandingan 1 : 1 : 0,25, kemudian dimasukkan ke dalam pot dan diberi label sesuai dengan jenis benihnya. Sebelum penanaman dilakukan, media tanam disiram secukupnya. Penanaman dilakukan sesuai dengan jenis benihnya seperti yang tertulis pada label. Tanaman dibiarkan tumbuh tanpa diberi pupuk buatan.



- ◆ Pengambilan sampel dan persiapan bahan infestasi: daun yang baru terbuka diambil dimulai pada daun ke-8 sampai daun ke-10. Setiap daun dimasukkan ke dalam cawan petri plastik yang diberi alas kertas saring *Whatman* yang telah dibasahi dengan akuades agar sampel tetap segar. Sebelum digunakan, cawan petri disterilisasi dengan alkohol 70%. Persiapan larva yang dilakukan adalah dua toples plastik disiapkan sebagai tempat imago bertelur (untuk menghindari kemungkinan infeksi virus terhadap koloni). Telur dipindahkan dari toples tersebut ke dalam toples plastik kecil. Pada saat telur menetas, larva yang baru muncul diletakkan di atas pakan buatan selama lebih kurang 12 jam (untuk menghindari kematian larva selama bioasai berlangsung).
- ◆ Teknik infestasi: satu ekor larva dipindahkan dari tempat pakan buatan ke atas sampel daun yang berada di dalam cawan petri. Cawan ditutup rapat dan diinkubasikan pada suhu ruang 25°C. Pengamatan dilakukan pada hari ke-5 (Gambar 10). Larva yang diinfestasikan diamati dengan menggunakan cara penilaian (*scoring*) 0 = larva mati; 1 = larva hidup instar I; 2 = larva hidup awal instar II; 2,5 = larva hidup akhir instar II; 3 = larva hidup instar III. Pengujian diulang sebanyak 10 kali.

Kapas Bt

Kapas Bt adalah kapas hasil rekayasa genetik dengan mentransformasikan gen *cryIA(c)* ke dalam genom tanaman kapas melalui metode trans-



Gambar 10. Bioasai daun jagung Bt dan non Bt dengan *H. armigera* 5 hari setelah infestasi

formasi secara tidak langsung dengan vector *A. tumefaciens*. Bahan genetik eksogenus yang ditransferkan ke dalam kapas Bt selain gen *cryIA(c)* adalah E35S (dari virus kembang kol atau CaMV) sebagai promotor dengan duplikasi *enhancer*, *nptII* sebagai marka seleksi tahan kanamycin, dan gen *aad*, yaitu gen dari transposon TN7 yang menyebabkan ketahanan terhadap *streptomycin* pada bakteri. Seperti halnya pada jagung Bt, promotor 35S pada kapas Bt pun akan mengekspresikan gen *cryIA(c)* ke seluruh bagian atau jaringan tanaman kapas seperti daun, bunga, serbuk sari, dan buah atau bol. Sasaran (target) utama serangga hama yang dituju dalam penggunaan kapas Bt adalah *cotton bollworm* (*H. armigera*) atau penggerek buah kapas. Pada bab bioasai kapas Bt ini akan dijelaskan studi dampak kapas Bt terhadap ulat sutera dan studi ekspresi ketahanan kapas Bt terhadap *H. armigera*.

Studi Dampak Kapas Bt terhadap Ulat Sutera

Studi ini seperti halnya studi pada jagung Bt, ditujukan untuk mengetahui apakah kapas Bt akan berdampak negatif terhadap ulat sutera. Serbuk sari kapas Bt digunakan sebagai materi yang mengandung Bt dengan asumsi bahwa apabila secara alamiah serbuk sari tersebut menempel ke daun murbei yang dijadikan pakan ulat sutera, maka ulat sutera akan terkena dampak. Sebagai pembanding digunakan kapas non Bt atau non transgenik.

- **Bahan dan Alat**

Bahan dan alat yang diperlukan untuk studi dampak kapas Bt adalah ulat sutera instar II, serbuk sari kapas Bt dan non Bt, daun murbei, akuades, alkohol 70%, kertas saring, kertas *tissue*, kapas, label, parafilm, cawan petri kecil (berdiameter 9 cm), dan botol kecil (berdiameter 1,3 cm dan tinggi 4 cm). Selain itu, diperlukan kuas nomor 1, pinset, dan gunting.

- **Cara**

Cara yang dilakukan untuk studi dampak kapas Bt adalah pemurnian serbuk sari kapas dilakukan dengan menggunakan metode Hellmich *et al.* (2001). Serbuk sari murni diletakkan pada permukaan atas daun murbei sebanyak tiga polen per daun (pendekatan kerapatan 1 polen/14 cm²). Daun murbei yang digunakan adalah daun termuda yang telah membuka



penuh. Studi ini membandingkan kemungkinan dampak tiga perlakuan terhadap mortalitas ulat sutera, yaitu daun murbei + serbuk sari kapas Bt, daun murbei + serbuk sari kapas non Bt, dan daun murbei sebagai kontrol. Tangkai daun dibalut dengan kapas, dimasukkan ke dalam botol kecil berisi akuades kemudian mulut botol ditutup dengan parafilm (Gambar 6). Botol kecil tersebut diletakkan dalam cawan petri yang telah diberi alas kertas saring. Sebelum digunakan, cawan petri disterilisasi dengan alkohol 70%. Lima ekor larva ulat instar II diinfestasikan ke dalam cawan petri dengan menggunakan kuas, kemudian cawan petri ditutup rapat. Cawan petri diinkubasikan pada suhu 25°C dan kelembaban 90%. Setelah 48 jam perlakuan, larva hidup dipindahkan ke daun murbei tanpa serbuk sari selama 5 hari. Pengamatan dilakukan pada hari ke-5 setelah pemindahan larva. Peubah yang diamati adalah banyaknya dan bobot larva hidup. Pengujian diulang sebanyak 10 kali. Data yang didapat dianalisis menggunakan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf signifikansi 5%.

Studi Ekspresi Gen Ketahanan Kapas Bt terhadap *H. armigera*

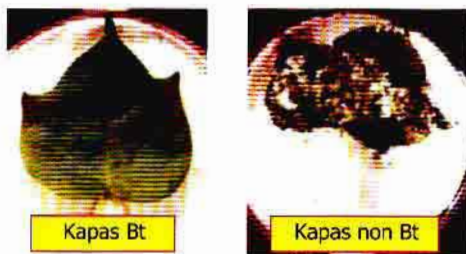
• Bahan dan Alat

Bahan dan alat yang diperlukan untuk studi ekspresi gen ketahanan kapas Bt terhadap *H. armigera* adalah benih kapas Bt dan non Bt (kontrol), larva *H. armigera* yang baru keluar dari telur yang menetas, akuades, alkohol 70%, media tanam, cawan petri kecil (berdiameter 9 cm), kertas saring *Whatman*, kertas *tissue*, label, serta toples plastik untuk peletakan telur (berdiameter 14 cm dan tinggi 18 cm) dan toples plastik kecil (berdiameter 12 cm dan tinggi 8 cm). Bagian tengah tutup toples dimodifikasi dengan kain kasa sehingga tidak kedap udara. Selain itu, diperlukan pinset, gunting, kuas nomor 1, pipet plastik, pot plastik nomor 30.

• Cara

Cara yang dilakukan untuk studi ekspresi gen ketahanan kapas Bt terdiri atas tiga kegiatan utama, yaitu persiapan media tanam dan penanaman, pengambilan sampel dan persiapan bahan infestasi, dan infestasi.

- ◆ Persiapan media tanam dan penanaman: tanah (*top soil*), pupuk organik dan sekam dicampur dengan perbandingan 1 : 1 : 0,25, kemudian dimasukkan ke dalam pot dan diberi label sesuai dengan jenis benihnya. Sebelum penanaman dilakukan, media tanam disiram secukupnya. Penanaman dilakukan sesuai dengan jenis benihnya seperti yang tertulis pada label. Tanaman dibiarkan tumbuh tanpa diberi pupuk buatan.
- ◆ Pengambilan sampel dan persiapan bahan infestasi: daun yang baru terbuka sempurna diambil. Setiap daun dimasukkan ke dalam cawan petri yang diberi alas kertas saring *Whatman* yang telah dibasahi dengan akuades agar sampel tetap segar. Sebelum digunakan, cawan petri disterilisasi dengan alkohol 70%. Persiapan larva yang dilakukan adalah dua toples plastik disiapkan sebagai tempat imago bertelur (untuk menghindari kemungkinan infeksi virus terhadap koloni). Telur dipindahkan dari toples tersebut ke dalam toples plastik kecil. Pada saat telur menetas, larva diletakkan di atas pakan buatan selama lebih kurang 12 jam (untuk menghindari kematian larva selama bioasai berlangsung).
- ◆ Teknik infestasi: ada dua macam, yaitu di laboratorium dan di rumah kaca.
 - Infestasi larva *H. armigera* pada daun kapas di laboratorium: satu ekor larva dipindahkan dari tempat pakan buatan ke atas sampel daun yang berada di dalam cawan petri. Cawan petri ditutup rapat dan diinkubasikan pada suhu ruang 25°C. Pengamatan dilakukan



Gambar 11. Bioasai daun kapas Bt dan non Bt dengan *H. armigera* 5 hari setelah infestasi

pada hari ke-5 (Gambar 11). Larva yang diinfestasikan diamati dengan menggunakan cara penilaian (*scoring*), yaitu 0 = larva mati; 1 = larva hidup instar I; 2 = larva hidup awal instar II; 2,5 = larva hidup akhir instar II; 3 = larva hidup instar III. Pengujian diulang sebanyak 10 kali.

- Infestasi larva *H. armigera* tanaman kapas di rumah kaca: tanaman kapas yang telah berumur 2 bulan setelah tanam dan sudah berbuah disampling 10 buah kapas per tanaman. Setiap buah diinfestasi dengan 3 ekor Larva yang baru keluar dari telur yang menetas dan dikurung dengan kantong plastik yang dilubangi dengan jarum untuk sirkulasi udara (Gambar 12). Pengamatan dilakukan 2 minggu setelah infestasi (Gambar 13). Peubah yang diamati meliputi panjang tubuh larva hidup atau jumlah pupa yang ditemukan dan kerusakan pada buah. Pengujian diulang sebanyak 5 kali. Data yang didapat dianalisis menggunakan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf signifikansi 5%.

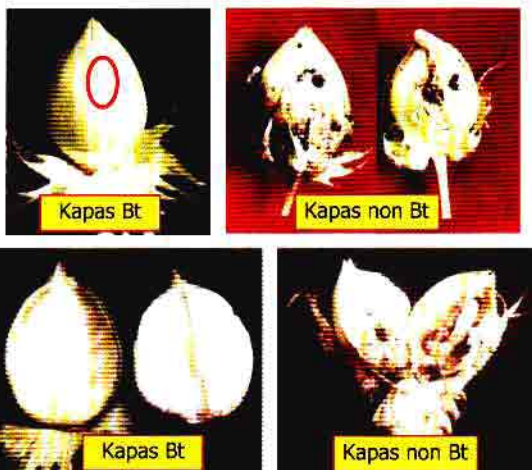
UCAPAN TERIMA KASIH

Buku ini disusun dari hasil *review* pustaka dan data yang terkumpul dari studi bioasai tanaman transgenik, serta pembiakan dan pemeliharaan serangga yang digunakan dalam pengujian sejak tahun 1998 sampai 2003.



Panah kuning menunjuk buah kapas dalam kantong plastik yang diinfestasi *H. armigera*

Gambar 12. Infestasi *H. armigera* pada buah kapas Bt dan non Bt



Lingkar merah pada kapas Bt adalah lubang kecil bekas gerakan *H. armigera*

Gambar 13. Bioasai buah (*bof*) kapas Bt dan non Bt dengan *H. armigera* 2 minggu setelah infestasi

Studi tersebut dilakukan oleh beberapa peneliti dan teknisi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Sehubungan dengan itu, penyusun mengucapkan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada para peneliti dan teknisi yang terlibat dalam kegiatan studi dan telah bekerja keras dengan dedikasi yang tinggi. Tanpa kerja keras dan dedikasi mereka, data studi bioasai tanaman transgenik dan pembiakan serangga ini tidak akan terkumpul. Ucapan terima kasih ini ditujukan kepada Sdr. Eriyanto Yusnawan, SP., Retno Pangestuti, SP., Miftakhurohmah, SP., Tri Indraini R. Utami, SP., R. Heru Praptana, SP., Lina Sri Agustien, SP., Endang Ibrahim, dan Riri Sundasari.

DAFTAR PUSTAKA

- Abel, C.A., R.L. Wilson, B.R. Wiseman, W.H. White, and F.M. Davis. 2000.** Conventional resistance of experimental maize lines to corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae), fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae), and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 93(3):982-988.

- Anonymous. 2003a.** The science of silkworms for the course of nature. <http://www.sericulum.com/bmori.html>.
- Anonymous. 2003b.** The science of silkworms for the course of nature. <http://www.sericulum.com/lifecycle.html>.
- Atmosoedarjo, S., J. Kartasubrata, M. Kaomini, W. Saleh, dan W. Moerdoko. 2000.** Sutera alam Indonesia. Yayasan Sarana Wana Jaya. Jakarta. 337 hlm.
- Baco, D. dan J. Tandiabang. 1988.** Hama utama jagung dan pengendaliannya. Dalam Subandi, M. Syam, dan A. Widjono (Eds.). Jagung. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor. hlm. 185-204.
- Barton, K.A., H.R. Whiteley, and N.S. Yang. 1987.** *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85:1103-1109.
- Bedjo. 1990.** Biologi *Helicoverpa* sp. dan *Ostinia furnacalis* (Guenee) pada makanan buatan. Risalah Hasil Penelitian Tanaman Pangan. hlm. 131-134.
- Benedict, J. and D.W. Altman. 2001.** Commercialization of transgenic cotton expressing insecticidal crystal protein. In Jenkins, J. and S. Saha (Eds.). Genetic Improvement of Cotton: Emerging Technologies. Science Publications, Enfield. New Hampshire, USA 8:137-201.
- Bennet, J. 1993.** Genes for crop improvements. *Genetic Engineering* 16:93-113.
- Breithaupt, J. 1993.** Asian corn borer pupae inside maize stem. <http://ecoport.org/ep?SearchType=pdb&PdbID=15292>
- Cheng, J., M.G. Bolyard, R.C. Saxena, and M.B. Sticklen. 1992.** Production of insect resistant potato by genetic transformation with a 3-endotoxingene from *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. *Plant Sci.* 1:83-91.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D. Dean. 1998.** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813.
- Davis, F.M., Sen Seong Ng, and W.P. Williams. 1989.** Mechanism of resistance in corn to leaf feeding by southwestern corn borer and european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 82(3):919-922.
- Davis, F.M., W.P. Williams, and P.M. Buckley. 1998.** Growth responses of southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed combinations of whorl leaf tissue from a resistant and a susceptible maize hybrid. *J. Econ. Entomol.* 91(5):1213-1218.

- Delannay, X.B., J. Laveille, R.K. Proksch, R.L. Fuschs, S.R. Sims, J.T. Greenplat, P.G. Marrone, R.B. Dobson, J.J. Augustine, J.G. Layton, and D.A. Fischhoff. 1989.** Field performance of transgenic tomato plant expressing the *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. *Plant Sci.* 1:83-91.
- Deuter P., B. Nolan, T. Grundy, and B. Walsh. 2004.** Heliothis in sweet corn. <http://www.dpi.qld.gov.au/horticulture/5227.html>.
- Gatehouse, J.A., V.A. Hilder, and A.M.R. Gatehouse. 1991.** Genetic engineering of plants for insect resistance. In Gierson, D. (Ed.). *Plant Genetic Engineering*. Chapman and Hall, New York. p. 105-135.
- Hansen, L. 1999.** Non target effects of Bt corn pollen on the Monarch Butterfly (Lepidoptera: Danaidae). <http://www.ent.iastate.edu/entsoc/ncb99/prog/abs/D881.html>.
- Hansen, L. and J. Obrycki. 1999.** Scientist urge caution on monarch data. *Asia Biotech. Bulletin* June 1999. 10 p.
- Held, G.A., L.A. Bulla, E. Jr. Ferrari, J. Hoch, and A.I. Aronson. 1982.** Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6065.
- Hellmich, R.L., B.D. Siegfried, M.K. Sears, D.E. Stanley-Horn, M.J. Daniels, H.R. Mattila, T. Spencer, K.G. Bidne, and L.C. Lewis. 2001.** Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(21):11925-11930.
- Herbison-Evans, D. and S. Crossley. 2005.** *Ostrinia furnacalis* (Guenee, 1854) (one synonym: *Botys damoalis*) asian corn borer, *Spilomelini*, *Pyraustinae*, *Crambidae*. <http://64.233.179.104/search?q=cache:JZTKboUIEX0J:linus.socs.uts.edu.au/~don/larvae/cram/furnac.html+ostrinia+furnacalis&hl=id>
- Herman, M. 1996.** Rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman. *Buletin AgroBio* 1(1):24-34.
- Herman, M. 1999.** Tanaman hasil rekayasa genetik dan pengaturan keamanannya di Indonesia. *Buletin AgroBio* 3(1):8-26.
- Herman, M. 2001.** Kebijakan pemerintah terhadap pangan yang berasal dari produk rekayasa genetika. *Prosiding Seminar Pangan Hasil Rekayasa Genetika*. Jakarta, 4 Juli 2001. hlm. 9-48.
- Herman, M. 2002a.** Analisis manfaat dan risiko tanaman hasil rekayasa genetik. *Dalam* Abdullah, O.S., C. Asdak, B. Gunawan, dan Tb. B.A. Kurnani (Eds.). *Rekayasa Genetik: Tantangan dan Harapan*. UNPAD Press, Bandung. hlm. 52-80.
- Herman, M. 2002b.** Perakitan tanaman tahan serangga hama melalui teknik rekayasa genetik. *Buletin AgroBio* 5(1):1-13.



- Hilder, V.A., A.M.R. Gatehouse, and D. Boulter. 1993.** Transgenic plants conferring insect tolerance: Proteinase inhibitor approach. *Transgenic Plants* 1:317-338.
- Hinchee, M.A.W., D.V. Connor-Ward, C.A. Newell, R.E. Mc. Donell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley, and R.B. Horsch. 1988.** Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Bio/Tech.* 6:915-922.
- Hoffmann, M. 2005.** *Trichogramma ostrinae* Pang et Chen, Hymenoptera: Trichogrammatidae. Department of Entomology, Cornell University, Ithaca, New York. http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/parasitoids/trichogramma_ostrinae.html.
- Ishimoto, M., J. Sato, M.J. Chrispeels, and K. Kitamura. 1996.** Bruchids resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor in the common bean. *Entomol. Exper. Appl.* 79:309-315.
- James, C. 2002.** Global review of commercialized transgenic crops: 2002. ISAAA Brief No. 27. ISAAA, Ithaca, New York.
- James, C. 2003.** Global review of commercialized transgenic crops: 2003. ISAAA Brief No. 33. ISAAA, Ithaca, New York.
- James, C. 2004.** Global review of commercialized transgenic crops: 2004. ISAAA Brief No. 32. ISAAA, Ithaca, New York.
- Joersbo, M. and J. Brunstedt. 1991.** Electroporation mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in protoplast. *Physiologia Plantarum* 81:256-264.
- Johnson, R., J. Narvaez, G. An, and C. Ryan. 1989.** Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9871-9875.
- Kaeppler, H.F., W. Gu, D.A. Sommers, H.W. Rines, and A.F. Cockburn. 1990.** Silicon carbide fiber mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Rept.* 9:415-418.
- Kalshoven, L.G.E. 1981.** The pest of crops in Indonesia. Ichtiar Baru-Van Hoeve. Jakarta. 701 p.
- Kendall, P. 1999.** Monarch butterfly so far not imperiled-gene-altered corn gets an early OK in studies. *Chicago Tribune*, November 2. p. 4.
- Klein, T.M., M. Fromm, A. Weissinger, D. Tomes, S. Scahaa, M. Sletten, and J. Sanford. 1988.** Transformation of maize cells using high velocity micro-projectile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309.

- Krattiger, A.F. 1997.** Insect resistance to crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. ISAAA Brief No. 2. ISAAA, Ithaca, New York.
- Loedin, I.H.S. 2000.** Transfer gen pada tanaman dan aplikasinya. Seminar Bioteknologi: Kesiapan Indonesia Memasuki Globalisasi Produk Transgenik. BBPT. Jakarta 5 September 2000.
- Losey, J.E., L.S. Raynor, and M.E. Carter. 1999.** Transgenic pollen harms Monarch larvae. *Nature* 399:214.
- MacIntosh, S.C., T.B. Stone, S.R. Sims, P. Hunst, J.T. Greenplate, P.G. Marrone, F.J. Perlak, D.A. Fischhoff, and R.L. Fuchs. 1990.** Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important species. *J. Insects Path.* 56:95-105.
- Mass, C. and W. Werr. 1989.** Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplast. *Plant Cell Rept.* 8:148-151.
- McClintock, J.T., C.R. Schaffer, and R.D. Sjoblad. 1995.** A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticides Sci.* 45:95-105.
- Mullins, M.G, F.C. Tang, and O. Facciotti. 1990.** Agrobacterium mediated genetic transformation of grape vines: Transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinefera* L. *Bio/Tech.* 8:1041-1045.
- Nafus, D.M. and I.H. Schreiner. 1987.** Location of *Ostrinia furnacalis* eggs and larvae on sweet corn in relation to plant growth stage. *J. Econ. Entomol.* 80:401-416.
- Nappfast. 2003.** Pest assessment: Old world bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner), (Lepidoptera: Noctuidae). NCSU APHIS Plant Pest Forecasting System. http://www.nappfast.org/casestudies_files/armigera.pdf
- OISAT. 2005.** Corn borer. Online Information Service for Non-chemical Pest Management in the Tropics. http://oisat.org/pests/insect_pests/caterpillars_grubs/corn_borer/general_information.html.
- Perlak, F.J., R.W. Deaton, T.A. Armstrong, R.L. Fuschs, S.R. Sims, J.Y. Greenplate, and D.A. Fischhoff. 1990.** Insect resistance cotton plants. *Bio/Tech.* 8:939-943.
- Pleasant, J.M., R.L. Hellmich, G.P. Dively, M.K. Sears, E. Diane, Stanley-Horn, R. Mattilla, J. E. Forter, and G.D. Jones. 2001.** Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfield. *PNAS* 98(21):11919-11924. <http://www.pnas.org/cgi/10.1073/pnas.211287498>.

- Rajamohan, F. and D.H. Dean. 1995.** Molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. The workshop on Bt-technology for agriculture. Plant Genetic Engineering Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Thailand.
- Rao, K.V., K.S. Rathore, T.K. Hodges, X. Fu, E. Stoger, D. Sudhakar, S. Williams, P. Christou, M. Bharathi, D.P. Brown, K.S. Powell, J. Spence, A. M.R. Gatehouse, and J.A. Gatehouse. 1998.** Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *The Plant Journal* 15(4):469-477.
- Ryan, C.A. 1990.** Proteinase inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28:425-449.
- Schroeder, H.E., S. Gollasch, A. Moore, L.M. Tabe, S. Craig, D. Hardie, M.J. Chrispeels, D. Spencer, and T.J.V. Higgins. 1995.** Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 107:1233-1239.
- Shadduck, J.A. 1983.** Some observations on the safety evaluation of nonviral microbial pesticides. *Bull. WHO* 61:117-128.
- Shade, R.E., H.E. Schroeder, H.E. Pueyo, L.M. Tabe, L.L. Murdock, T.J.V. Higgins, and M.J. Chrispeels. 1994.** Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technology* 12:793-796.
- Shelton, A.M. and R. Roush. 1999.** False reports and the ears of men. *Nature Biotechnology* 17:832.
- Soebandrijo. 2003.** Pengendalian hama terpadu dan prospeknya terhadap produksi dan pendapatan petani kapas. Orasi Pengukuhan Ahli Peneliti Utama. Departemen Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat. 2 Oktober 2003.
- Soejitno, J., Harnoto, W. Tengkan, T. Djuwarso, Budihardjo, I.M. Samudra, A. Iqbal, dan A. Naito. 1990.** Hama kedelai. *Dalam* Petunjuk bergambar untuk identifikasi hama dan penyakit kedelai di Indonesia. Edisi kedua. JICA ATA-378 Project: Strengthening of Pioneering Research for Palawija Crop Production. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Balai Penelitian Tanaman Pangan, dan Japan International Cooperation Agency. Bogor. hlm. 43-83.
- Sticklen, M.B. 1991.** Direct somatic embryogenesis and fertile plants from rice root cultures. *J. Plant Physiol.* 138:577-580.
- Sudarmo, S. 1991.** Pengendalian serangga hama sayuran dan palawija. Cetakan pertama. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 51 hlm.

- Suprpto, H.S. dan H.A.R. Marzuki. 2002.** Bertanam Jagung. Cetakan ke-22 (edisi revisi). Penebar Swadaya. Jakarta. viii + 48 hlm.
- Suwanto, A. 2000.** Tanaman transgenik: Bagaimana kita menyikapinya?. Hayati 7(1):26-30.
- Valdez, LC. and C.B. Adalla. 1983.** The biology and behaviour of the asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* Guenee (Pyralidae: Lepidoptera) on cotton. Philipp. Ent. 6(5 dan 6):621-631.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheile, and Van Mellaert. 1990.** Receptors on the brush border membrane on the insect midgut as determinant of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins. Appl. Environ. Microbiol. 56:1378-1385.
- Warren, W., N.B. Carozzi, N. Desai, and M. Koziel. 1992.** Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. J. Econ. Entomol. 5:1651-1659.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. 1992.** Recombinant DNA. Scientific American Book. New York. 626 p.
- Wilson, F.D., M.F. Lint, W.R. Deaton, D.A. Fischhoff, F.J. Perlak, T.A. Armstrong, R.L. Fusch, S.A. Berberich, N.J. Parks, and B.R. Stapp. 1992.** Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects. J. Econ. Entomol. 4:1516-1521.
- Zhong, H., C. Srinivasan, and M.B. Sticklen. 1991.** Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bent grass (*Agrostis palustris* Huds.). Plant Cell Rept. 10:453-456.
- Zhong, H., C. Srinivasan, and M.B. Sticklen. 1992.** *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L.) II. Differentiation of ear and tassel clusters from cultured shoot apices. Planta 187:490-497.