

# Identifikasi cDNA Gen *RB* pada Tanaman Kentang Produk Rekayasa Genetika Katahdin SP951 (Identification of *RB* gene cDNA in Genetically Modified Potato Katahdin SP951)

Toto Hadiarto\*, Edy Listanto, dan Eny I. Riyanti

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia  
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; \*E-mail: thadiarto@yahoo.com

Diajukan: 23 April 2015; Direvisi: 26 Mei 2015; Diterima: 1 Juli 2015

## ABSTRACT

To overcome the negative impact of the fungicide application, *RB* gene, originated from *Solanum bulbocastanum*, a resistance gene to the disease has been introduced to the genome of potato plant Katahdin, which was later named as Katahdin SP951. The aims of the research were to confirm the *RB* gene in the genetically modified plant (GMP) Katahdin SP951 through resequencing the *RB* gene in the Katahdin SP951 genome and to align the *RB* genes isolated from the transgenic Katahdin SP951 and the cloning vector pLCD0454, which was used the vector to transform Katahdin cultivar. The *RB* gene has high similarity to other resistance genes in potato plants, and therefore nontransgenic Katahdin, and *Solanum bulbocastanum* were used in the analysis as the negative and positive control, respectively. Seven pairs of specific primers, which could differentiate the *RB* gene were used for gene sequencing studies. The sequencing experiments obtained 2913 bases which showed 100% similarity to the *RB* sequence isolated from the pLCD04541 plasmid. It is concluded that the *RB* gene in the Katahdin SP951 did not experience mutation during transformation process and integration into the Katahdin genome.

**Keywords:** *RB* gene, potato, sequence confirmation.

## ABSTRAK

Penanaman kentang transgenik dapat mengurangi penggunaan fungisida. Gen *RB*, yang merupakan gen ketahanan terhadap patogen penyakit hawar daun (*Phytophthora infestans*), telah berhasil diisolasi dari tanaman kentang liar *S. bulbocastanum* dan disisipkan ke dalam genom tanaman kentang varietas Katahdin, yang kemudian dinamai klon Katahdin SP951. Penelitian ini bertujuan mengonfirmasi keberadaan gen *RB* dalam genom tanaman kentang transgenik Katahdin SP951 dengan cara menyekuen gen tersebut dari tanaman kentang Katahdin SP951, dan kemudian membandingkannya dengan sekuen gen *RB* dari plasmid pLCD04541 yang digunakan untuk mentransformasi Katahdin dan mengandung gen *RB*. Katahdin nontransgenik dan *S. bulbocastanum* secara berurutan digunakan sebagai kontrol negatif dan positif. Hasil PCR mendapatkan tujuh primer yang spesifik terhadap gen *RB* dan kemudian digunakan untuk sekuensing. Hasil sekuensing berupa urutan DNA sepanjang 2.913 basa yang memiliki kesamaan 100% dengan urutan gen *RB* pada plasmid pLCD04541. Dapat disimpulkan bahwa gen *RB* tidak mengalami mutasi, baik dalam proses transformasi maupun pada waktu integrasi ke dalam genom kentang varietas Katahdin.

**Kata kunci:** Gen *RB*, kentang, konfirmasi sekuen.

## PENDAHULUAN

Penyakit hawar daun pada kentang yang disebabkan oleh jamur *Phytophthora infestans* merupakan salah satu penyakit tanaman yang sangat merugikan di seluruh belahan dunia. Penyakit ini mengakibatkan hasil panen menurun drastis sehingga terjadi kerugian finansial yang sangat besar (Kamoun, 2001). Penyakit ini telah menyebabkan terjadinya kasus kelaparan di Eropa pada abad 19 yang mengakibatkan kematian lebih dari satu juta jiwa di Irlandia (Song *et al.*, 2003).

Di Indonesia, petani melakukan penyemprotan fungisida hingga tiga puluh kali dalam satu kali masa tanam untuk mengurangi dampak serangan jamur *P. infestans*. Hal ini tidak hanya menyebabkan naiknya biaya produksi melalui pembelian fungisida, namun juga meningkatkan kerusakan lingkungan serta risiko gangguan terhadap kesehatan tubuh (Verweij *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2011).

Plasma nutfah untuk ketahanan terhadap *P. infestans* tersedia pada beberapa kentang spesies liar seperti *Solanum demissum*. Spesies ini digunakan dalam persilangan tradisional untuk membuat kultivar yang tahan. Namun, respons ketahanan kultivar-kultivar ini hipersensitif terhadap penyakit hawar daun bakteri, yaitu spesifik terhadap ras tertentu dan bersifat sementara di lapang (Fry dan Goodwin, 1997). Sementara itu, spesies liar *S. bulbocastanum* memiliki ketahanan yang tinggi terhadap semua ras *P. infestans* (Niederhauser dan Mills, 1953). Sifat ketahanan yang luas ini (*broad spectrum*) menjadikan *S. Bulbocastanum* sebagai calon utama dalam menghasilkan kultivar tahan serangan *P. infestans* (Lokossou *et al.*, 2010; van der Vossen *et al.*, 2003).

Gen utama yang memberikan sifat ketahanan luas terhadap jamur hawar daun dari *S. Bulbocastanum*, yang kemudian disebut sebagai gen *RB*, telah berhasil diklon dan diidentifikasi melalui pendekatan berbasis pemetaan gen (Bradeen *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003; van der Vossen *et al.*, 2003). Gen ini termasuk ke dalam kelompok gen resisten (R) yang mengandung *leucine-rich repeats* (LRRs). Kelompok gen ini sudah terkarakterisasi baik dan memiliki anggota paling banyak, yaitu 0,5% dari total gen yang diprediksi pada genom *Arabidopsis* (Chen dan Halterman, 2011; van der Vossen *et al.*, 2003). Tingkat ekspresi gen *RB* mempengaruhi level ketahanan terhadap penyakit hawar daun. Semakin tinggi jumlah transkrip gen *RB* yang terdapat dalam tanaman, semakin tahan tanaman tersebut terhadap serangan jamur *P. infestans* (Bradeen *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2009).

Spesies ini tidak dapat disilangkan dengan kentang budi daya karena perbedaan tingkat ploidinya

sehingga gen *RB* diisolasi dan digunakan untuk perakitan tanaman kentang tahan penyakit hawar daun melalui teknik rekayasa genetika. Perakitan kentang transgenik tahan penyakit hawar daun tersebut telah dilakukan di Universitas Wisconsin, Amerika Serikat, dengan metode transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens* menggunakan plasmid pCLD04541 (Song *et al.*, 2003).

Hasil transformasi tersebut berupa beberapa klon (*event*) kentang transgenik varietas Katahdin, di antaranya Katahdin klon SP951. Kentang transgenik Katahdin SP951 telah diuji di Amerika Serikat selama empat tahun dan menunjukkan sifat ketahanan luas terhadap ras-ras lokal *P. infestans* dan ras dari Meksiko (Bradeen *et al.*, 2009; Halterman *et al.*, 2008; Kuhl *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2003).

Untuk memastikan gen yang dimasukkan ke dalam genom kentang transgenik Katahdin SP951 adalah gen *RB* dengan urutan yang sama dengan gen *RB* dari *S. bulbocastanum* dan tidak terjadi mutasi sama sekali pada urutan DNA, maka diperlukan konfirmasi terhadap gen tersebut. Tujuan penelitian ini adalah mengonfirmasi keberadaan gen *RB* dengan cara menyekuen gen tersebut dari tanaman kentang transgenik Katahdin SP951 dan membandingkannya dengan gen *RB* yang terdapat pada plasmid pCLD04541. Konfirmasi gen pada produk rekayasa genetika tanaman ini sangat perlu dilakukan, terutama dalam rangka pengisian *dossier* untuk keamanan hayati sebelum tanaman transgenik dapat dilepas ke petani.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada tahun 2013 di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor. Bahan tanaman yang digunakan adalah tanaman transgenik Katahdin klon SP951 sebagai sampel transgenik, varietas Katahdin nontransgenik sebagai kontrol negatif, dan *S. bulbocastanum* PT 29 (PI#243510) sebagai kontrol positif. Tanaman kentang Katahdin nontransgenik dan transgenik diperoleh dari Universitas Wisconsin, Amerika Serikat, melalui kerja sama penelitian USAID-ABSP (*Agriculture Biosafety Support Project II Project*). Tanaman diperbanyak di dalam pot di Fasilitas Uji Terbatas BB Biogen. Plasmid pCLD04541 yang digunakan untuk mentransformasi tanaman kentang varietas Katahdin juga didapatkan dari proyek USAID-ABSP.

### Isolasi RNA Tanaman Transgenik Katahdin SP951

RNA diisolasi dari sampel daun tanaman yang berumur dua bulan setelah tanam dengan mengguna-

kan RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, USA). Metode dilakukan sesuai dengan petunjuk yang ada pada kit tersebut seperti yang diuraikan berikut ini. Sampel daun ditambah dengan nitrogen cair kemudian digerus di dalam mortar steril. Sel daun dipecah dan dihomogenkan pada bufer yang mengandung *guanidine thyoisyanat* yang berfungsi menonaktifkan enzim RNase agar RNA tetap utuh. Etanol ditambahkan agar RNA menempel pada membran kolom (QIAshredder™ spin-column). Kolom dicuci sebanyak tiga kali dengan larutan pencuci kemudian RNA total dilarutkan dengan menambahkan 30–100 µl air steril Milli-Q™.

#### **Pembuatan cDNA Tanaman Kentang Transgenik Katahdin SP951**

Setelah RNA total diperoleh, dilakukan *reverse-transcription PCR* (RT-PCR) dengan menggunakan SuperScript® II (Invitrogen™, USA) untuk memperoleh cDNA dengan mengacu pada metode yang ada pada kit tersebut. Utas pertama cDNA diperoleh dengan cara mereaksikan sebanyak 1 ng hingga 5 µg total RNA ditambah dengan 1 µl oligo dT dan 11 µl dNTP 10 mM masing-masing dan 12 µl air steril Milli-Q™. Campuran ini kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 5 menit, setelah itu dipindahkan secara cepat ke atas es, dan disentrifugasi untuk mengendapkan larutan. Larutan 41 µl *first-strand buffer* 5×, 21 µl DDT 0,1 M, dan 11 µl RNaseOUT ditambahkan ke dalam campuran secara pelan-pelan dan diaduk dengan cara menggoyangkan tube secara perlahan, dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 42°C selama 2 menit. Setelah itu, ditambahkan SuperScript® II RT sebanyak 1 µl dan dicampurkan dengan cara dipipet naik turun, dan ditambahkan air steril Milli-Q™ sehingga total volume menjadi 20 µl. Larutan diinkubasi pada suhu 42°C selama 50 menit. Setelah itu, reaksi dihentikan dengan cara menginkubasikan larutan pada suhu 75°C selama 15 menit. Produk utas pertama cDNA ini kemudian diamplifikasi dengan mesin PCR T100™ (Bio-Rad) untuk mendapatkan cDNA dengan populasi yang diinginkan. Amplifikasi cDNA dilakukan dalam tabung mikro dengan volume total 50 µl yang mengandung bufer PCR 1× (Tris-HCl 20 mM [pH 8.4], KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), 1 µl dNTP mix 1 mM, *forward primer* 1 µM, *reverse primer* 1 µM, *Taq* polimerase DNA 2 U, dan 2 µl cDNA hasil pembentukan utas pertama. PCR dilakukan dengan profil sebagai berikut: denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, diikuti dengan 35 siklus tahapan yang terdiri atas denaturasi awal pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 50–60°C (d disesuaikan dengan primernya) selama 30 detik, perpanjangan DNA pada suhu 75°C dengan waktu disesuaikan

dengan perkiraan panjang fragmen (1 menit untuk amplifikasi 1 kb fragmen DNA), dan diakhiri dengan perpanjangan basa pada suhu 75°C selama 5 menit.

#### **Amplifikasi Gen *RB***

Primer dirancang secara manual (tanpa perangkat lunak) pada posisi acak dengan tetap mengacu pada urutan DNA gen *RB*. Posisi pasangan primer dirancang agar menghasilkan fragmen yang ujung-ujungnya saling tumpang-tindih sehingga fragmen-fragmen tersebut dapat digabungkan untuk membentuk urutan DNA gen *RB* yang utuh.

Primer *forward* dan *reverse* saling dikombinasikan untuk memperoleh ukuran fragmen yang berbeda-beda yang kemudian digunakan untuk mengkonfirmasi ukuran fragmen dan urutan DNA.

PCR dilakukan dengan profil sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti dengan 35 siklus tahapan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 50–60°C (d disesuaikan dengan primernya) selama 30 detik, perpanjangan DNA pada suhu 75°C dengan waktu yang disesuaikan dan dengan perkiraan panjang fragmen. Siklus PCR diakhiri pada suhu 75°C selama 5 menit. Hasil PCR dilihat dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa, dan didokumentasikan dengan mesin ChemiDoc EQ™ System (Bio-Rad).

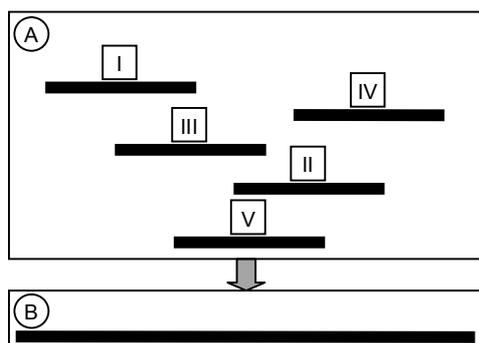
#### **Sekuensing Gen *RB* dan Analisis Data Sekuen**

Sekuensing terhadap fragmen-fragmen hasil PCR yang spesifik untuk gen *RB* dilakukan oleh 1<sup>st</sup> BASE ([http://www.base-asia.com/dna\\_sequencing](http://www.base-asia.com/dna_sequencing)) pada mesin ABI PRISM®. Dari hasil sekuensing, daerah yang tumpang-tindih pada fragmen-fragmen DNA digunakan sebagai referensi untuk menyambung urutan DNA menjadi kesatuan yang lebih panjang. Hasil penggabungan ini membentuk urutan gen *RB* yang lengkap seperti pada Gambar 1.

Sekuen gen *RB* yang diperoleh kemudian di-sejajarkan (*alignment*) dengan hasil sekuen plasmid pLCD04541 (hasil sekuen kelompok peneliti India) dengan menggunakan fasilitas *gene alignment* dari NCBI di alamat [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Gen *RB* adalah gen yang menyandikan sifat ketahanan terhadap jamur *P. infestans* dan memiliki homologi tinggi dengan gen-gen resistensi lain yang terdapat pada tanaman kentang. Kemiripan gen *RB* dari *S. bulbocastanum* dengan gen-gen resistensi (*R*) lebih dari 98,8% (Song *et al.*, 2003). Akibatnya, teknik PCR menggunakan primer yang didesain dengan



**Gambar 1.** Skema teknik PCR dengan primer spesifik untuk mendapatkan fragmen-fragmen DNA yang ujung-ujungnya tumpang-tindih. A = I sampai dengan V adalah fragmen yang spesifik terhadap gen *RB*. Fragmen-fragmen ini disekuensi untuk memperoleh urutan DNA, B = posisi ujung-ujung fragmen yang tumpang-tindih (*overlapping*) dijadikan acuan untuk menyusun urutan gen yang utuh.

**Tabel 1.** Daftar urutan primer yang digunakan untuk memperoleh fragmen spesifik gen *RB* yang kemudian digunakan sebagai cetakan (*template*) DNA dalam sekuensing gennya.

Nama primer*	Sekuen primer (5'→3')	Posisi primer
cDNA <sub>F3</sub>	ATGGCTGAAGCTTTCATTCAAG	1–22
NSeqRBR <sub>5</sub>	TCCAATATATCCCCTATGTTCCA	886–908
NSeqRBR <sub>12</sub>	CATTCAAACCTCATTAGGAGAC	991–1012
RBSeqF <sub>13</sub>	CACTCGATCCGTTTTGCTTTTC	654–675
NSeqRBR <sub>6</sub>	CTTCTTGGTGTCCAAATGCA	972–991
RBSeqF <sub>17</sub>	TCAATTATGGGAACATTGCAACC	895–917
RBSeqR <sub>23</sub>	GCAATCACCTAGATTAAGCACTC	1586–1608
RBSeqR <sub>22</sub>	GTTGATAACCTTTCTTCTTCCAA	1840–1863
RBSeqF <sub>21</sub>	CATCAAGCAGCAATATCCGTGAA	1466–1488
RBSeqF <sub>22</sub>	GAAGTTAAAGTGCTTGAAGCCC	2080–2101
RBSeqR <sub>25</sub>	GGTCCAGAAAAGGGCACTCG	2417–2436
NseqRBF <sub>8</sub>	CCTTGAGGAACTTGATATATGGG	2366–2389
RBSeqEndR	CATCTCTTCAAGCACAGGGAATT	2435–2457
RBSeqR <sub>26</sub>	CAGCCCTTCTCAGGGAGACT	2691–2712
3'EndFlankR	GGCCCGGGGAATTGGTAATACG	3298–3319 (di luar gen <i>RB</i> )

\*F = forward, R = reverse.

mengacu pada urutan gen *RB* memiliki kemungkinan menghasilkan fragmen DNA dari gen selain gen *RB*. PCR dilakukan untuk mengonfirmasi fragmen hasil amplifikasi berasal dari gen *RB*.

Dari 15 primer yang dirancang untuk cDNA dari gen *RB* (Tabel 1), telah dilakukan amplifikasi menggunakan 10 pasang primer. Tiga pasang primer (cDNA<sub>F3</sub>-NseqRBR<sub>12</sub>, RBSeqF<sub>17</sub>-RBSeqR<sub>22</sub>, dan NseqRBF<sub>8</sub>-RBSeqEndR) tidak spesifik terhadap gen *RB* karena mengamplifikasi gen pada cetakan (*template*) dari Katahdin nontransgenik, yang tidak mengandung gen *RB*. Contoh hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 2. Pasangan primer I dan III tidak spesifik terhadap gen *RB*. Amplifikasi tidak spesifik terjadi saat cetakan DNA dari kontrol negatif (Katahdin tipe liar yang tidak mengandung gen target) menghasilkan pita DNA dengan ukuran yang sama dengan pita DNA sampel transgenik Katahdin SP951 dan kontrol positif (*S. bulbocastanum*). Hal ini menunjukkan bahwa gen *RB* tidak teramplifikasi.

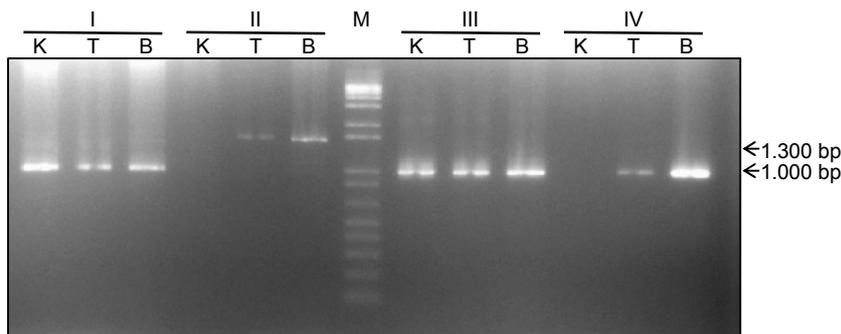
Tujuh pasangan primer (cDNA<sub>F3</sub>-NSeqRBR<sub>5</sub>, RBSeqF<sub>13</sub>-NSeqRBR<sub>6</sub>, RBSeqF<sub>13</sub>-RBSeqR<sub>23</sub>, RBSeqF<sub>17</sub>-RBSeqR<sub>23</sub>, RBSeqF<sub>21</sub>-RBSeqR<sub>25</sub>, RBSeqF<sub>22</sub>-RBSeqR<sub>26</sub>, dan NseqRBF<sub>8</sub>-3'EndFlankR) bersifat spesifik terhadap gen *RB* karena dapat mengamplifikasi fragmen DNA hanya dari tanaman kentang transgenik SP951 dan *S. bulbocastanum*, tetapi tidak mengamplifikasi DNA dari sampel tanaman nontransgenik Katahdin (Gambar 2, pasangan primer II dan IV). Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer spesifik ini kemudian digunakan sebagai cetakan untuk sekuensing.

Urutan gen *RB* utuh dengan panjang sekitar 2.900 basa dapat dihasilkan setelah dilakukan PCR dengan menggunakan tujuh pasang primer yang menghasilkan fragmen DNA yang tumpang-tindih pada beberapa bagian dengan fragmen DNA yang lain (Gambar 1). Fragmen hasil amplifikasi dari primer spesifik terhadap gen *RB* digunakan untuk membaca urutan DNA gen tersebut.

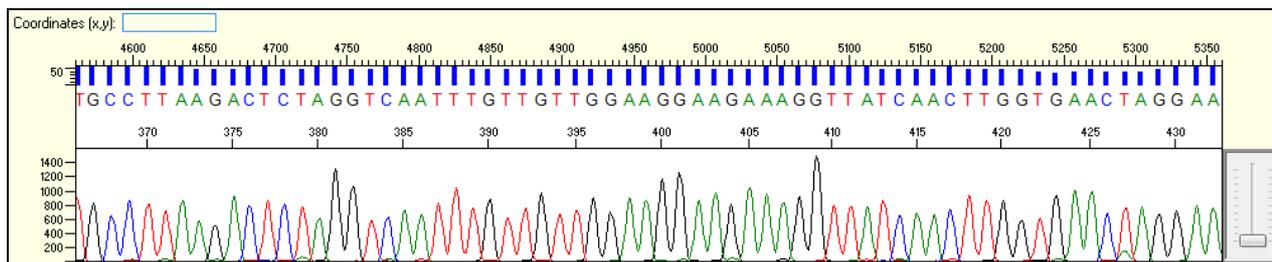
Rerata sekuensing menghasilkan urutan DNA dengan ukuran sekitar 1.000 basa dengan kualitas

nukleotida yang tinggi, ditandai dengan puncak yang tajam pada grafik, dan nilai QV (kualitas basa) yang bagus dengan sekuen error di bawah 1% (Gambar 3). Untuk memperoleh urutan gen *RB* secara utuh dengan besar sekitar 2.900 basa, dilakukan PCR dengan menggunakan primer yang akan menghasilkan fragmen DNA yang tumpang-tindih (*overlapping*) dengan fragmen DNA yang lain.

Hasil penggabungan urutan DNA dari daerah yang tumpang-tindih adalah *open reading frame* dengan ukuran 2.913 basa. Gabungan utas DNA hasil sekuensing ini (Gambar 4) disejajarkan (*aligned*) dengan urutan DNA gen *RB* yang terdapat dalam pCLD04541 (Song *et al.*, 2003), yang merupakan plasmid dengan gen *RB* yang digunakan dalam transformasi awal kentang Katahdin, dengan menggunakan



**Gambar 2.** Contoh hasil PCR dengan menggunakan primer yang didesain dengan mengacu pada gen *RB*. I = pasangan primer cDNA<sub>F3</sub>-NSeqRBR12, II = pasangan primer RBS<sub>eq</sub>F13-NSeqRBR6, III = pasangan primer RBS<sub>eq</sub>F17-RBS<sub>eq</sub>R22, IV = pasangan primer RBS<sub>eq</sub>F21-RBS<sub>eq</sub>R25, K = Katahdin nontransgenik (kontrol negatif), T = Katahdin transgenik (klon SP951), B = *S. bulbocastanum* (kontrol positif), M = DNA ladder 1 kb.



**Gambar 3.** Salah satu hasil sekuensing fragmen gen *RB*. QV atau kualitas basa ditunjukkan oleh batang yang berada di atas tiap simbol basa. Batang biru mengindikasikan QV yang bagus dengan *sequence error* di bawah 1%.

SP951seqResIt	ATGGCTGAAGCTTTTCATTCAAGTTCGCTAGACAATCTCACTTCTTTCTCAAAGGGGAA	60
pCLD04541	ATGGCTGAAGCTTTTCATTCAAGTTCGCTAGACAATCTCACTTCTTTCTCAAAGGGGAA	60
*****		
SP951seqResIt	CTTGTATTGCTTTTCGGTTTTCAAGATGAGTTCCAAAGGCTTTCAAGCATGTTTTCTACA	120
pCLD04541	CTTGTATTGCTTTTCGGTTTTCAAGATGAGTTCCAAAGGCTTTCAAGCATGTTTTCTACA	120
*****		
SP951seqResIt	ATTCAAGCCGTCCTTGAAGATGCTCAGGAGAAGCAACTCAACAACAAGCCTCTAGAAAAT	180
pCLD04541	ATTCAAGCCGTCCTTGAAGATGCTCAGGAGAAGCAACTCAACAACAAGCCTCTAGAAAAT	180
*****		
SP951seqResIt	-----	2760
pCLD04541	-----	2760
*****		
SP951seqResIt	CTAAAATGTTTACCAGAGGGATTGCAGCACCTAACAACCTCACAAAGTTTAAAAATTCGG	2820
pCLD04541	CTAAAATGTTTACCAGAGGGATTGCAGCACCTAACAACCTCACAAAGTTTAAAAATTCGG	2820
*****		
SP951seqResIt	GGATGTCCACAACCTGATCAAGCGGTGTGAGAAGGGAATAGGAGAAGACTGGCACAAAATT	2880
pCLD04541	GGATGTCCACAACCTGATCAAGCGGTGTGAGAAGGGAATAGGAGAAGACTGGCACAAAATT	2880
*****		
SP951seqResIt	TCTCACATTCTAATGTGAATATATATATTTAA	2913
pCLD04541	TCTCACATTCTAATGTGAATATATATTTAA	2913
*****		

**Gambar 4.** Penyejajaran (*alignment*) antara urutan DNA dari sekuensing pada tanaman transgenik Katahdin SP951 (SP951seqResIt) dan urutan DNA pada gen *RB* yang terdapat pada plasmid pCLD04541 (pCLD04541); tanda bintang menunjukkan homologi pada kedua urutan DNA tersebut.

ClustalW. Hasil penyejajaran kedua sekuen DNA tersebut menunjukkan bahwa fragmen DNA yang diamplifikasi oleh primer spesifik identik dengan gen *RB* yang ada pada plasmid pCLD04541. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa setelah proses transformasi dan integrasi gen ke dalam genom tanaman kentang Katahdin, tidak terjadi perubahan basa atau mutasi pada gen *RB* pada genom tanaman transgenik Katahdin SP951.

### KESIMPULAN

Dari 15 primer yang dirancang, terdapat tujuh pasang primer yang berhasil mengamplifikasi gen *RB* secara spesifik pada tanaman transgenik Katahdin SP951 dan tanaman sumber gen *RB* (*S. Bulbocastanum*). Dengan memanfaatkan daerah yang tumpang-tindih, fragmen spesifik tersebut disekuen dan diperoleh urutan DNA sepanjang 2.913 basa yang memiliki kesamaan 100% dengan urutan gen *RB* pada plasmid pCLD04541. Dapat disimpulkan bahwa gen *RB* tidak mengalami mutasi pada proses transformasi dan integrasi gen ke dalam genom kentang Katahdin. Konfirmasi gen pada produk rekayasa genetika tanaman ini sangat perlu dilakukan terutama dalam rangka pengisian *dossier* untuk keamanan hayati sebelum tanaman transgenik dapat dilepas ke petani.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. (R) Dr. M. Herman selaku *country coordinator Agricultural Biotechnology Support Project (ABSP) II* atas bimbingan dan saran dalam melaksanakan penelitian serta dalam penulisan karya tulis ini. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada ABSPII yang telah membantu pendanaan penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bradeen, J.M., S.K. Naess, J. Song, G.T. Haberlach, S.M. Wielgus, C.R. Buell, J. Jiang, and J.P. Helgeson. 2003. Concomitant reiterative BAC walking and fine genetic mapping enable physical map development for the broad-spectrum late blight resistance region, RB. *Mol. Genet. Genomics* 269(5):603–611.
- Bradeen, J.M., M. Iorizzo, D.S. Molloy, J. Raasch, L.C. Kramer, B.P. Millett, S. Austin-Phillips, J. Jiang, and D. Carputo. 2009. Higher copy numbers of the potato RB transgene correspond to enhanced transcript and late blight resistance levels. *MPMI* 22(4):437–446.
- Chen, Y. and D. Halterman. 2011. Phenotypic characterization of potato late blight resistance mediated by the broad-spectrum resistance gene *RB*. *Phytopathology* 101(2):263–270.
- Fry, W.E. and S.B. Goodwin. 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *BioScience* 47(6):363–371.
- Halterman, D.A., L.C. Kramer, S. Wielgus, and J. Jiang. 2008. Performance of transgenic potato containing the late blight resistance gene *RB*. *Plant Dis.* 92(3):339–343.
- Kamoun, S. 2001. Nonhost resistance to *Phytophthora*: Novel prospects for a classical problem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4(4):295–300.
- Kramer, L.C., M.J. Choudoir, S.M. Wielgus, P.B. Bhaskar, and J. Jiang. 2009. Correlation between transcript abundance of the *RB* gene and the level of the RB-mediated late blight resistance in potato. *MPMI* 22(4):447–455.
- Kuhl, J.C., K. Zarka, J. Coombs, W.W. Kirk, and D.S. Douches. 2007. Late blight resistance of RB transgenic potato lines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132 (6):783–789.
- Lokossou, A.A., H. Rietman, M. Wang, P. Krenek, H. Van der Schoot, B. Henken, R. Hoekstra, V.G. Vleeshouwers, E.A. van der Vossen, R.G. Visser, E. Jacobsen, and B. Vosman. 2010. Diversity, distribution, and evolution of *Solanum bulbocastanum* late blight resistance genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23(9):1206–1216.
- Niederhauser, J.S. and W.R. Mills. 1953. Resistance of *Solanum* species to *Phytophthora infestans* in Mexico. *Phytopathology* 43:456–457.
- Song, J., J.M. Bradeen, S.K. Naess, J.A. Raasch, S.M. Wielgus, G.T. Haberlach, J. Liu, H. Kuang, S., Austin-Phillips, C.R. Buell, J.P. Helgeson, and J. Jiang. 2003. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(16):9128–9133.
- Van der Vossen, E., A. Sikkema, B.T. Hekkert, J. Gros, P. Stevens, M. Muskens, D. Wouters, A. Pereira, W. Stiekema, and S. Allefs. 2003. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 36(6):867–882.
- Verweij, P.E., E. Snelders, G.H. Kema, E. Mellado, and W.J. Melchers. 2009. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect. Dis.* 9(12):789–795.
- Yan, C., C. Hamel, V. Vujanovic, and Y. Gan. 2011. Fungicide: Modes of action and possible impact on non target microorganisms. *ISRN Ecology* 2011, Article ID 130289.