

Monitoring Stabilitas Gen Ketahanan Hawar Daun secara Molekuler pada Kentang Bio Granola Perbanyak *In Vitro*

Muhammad Fatih Akbar¹, Adilla Raisha Sadina¹, Zahra Nurmala¹, Susi Purwiyanti² dan Ma'sumah²

1) Departemen Ilmu Pangan dan Bioteknologi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya

2) Balai Besar Perakitan dan Modernisasi Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian

Jl. Tentara Pelajar No.3A, RT.02/RW.7, Menteng, Kec. Bogor Barat, Kota Bogor, Jawa Barat 16111.

Email: susi.purwiyanti.81@gmail.com

ABSTRAK

Bio Granola merupakan varietas kentang Produk Rekayasa Genetika (PRG) dengan karakteristik memiliki gen ketahanan berspektrum luas (gen RB) terhadap penyakit hawar daun yang disebabkan oleh patogen *Phytophthora infestans*. Varietas ini diharapkan menjadi solusi dalam mengatasi penurunan produksi yang disebabkan oleh penyakit hawar daun pada pertanaman kentang di Indonesia. Untuk mendukung ketersediaan bibit tanaman dalam jumlah besar, perbanyak secara kultur jaringan menjadi salah satu cara dalam mendukung keberhasilan pengembangan varietas Bio Granola, terutama untuk lahan berskala luas. Namun, perbanyak tanaman secara *in vitro*, seperti perlakuan subkultur sel secara berulang dapat memicu terjadinya perubahan genetik (variasi somaklonal), yaitu perubahan kecil DNA tanaman akibat stres sel selama proses perbanyak vegetatif pada media buatan. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen RB menggunakan marka molekuler spesifik guna memastikan stabilitas gen terkait pada bibit kentang Bio Granola hasil perbanyak vegetatif secara *in vitro*. Hasil analisis PCR kualitatif menunjukkan bahwa sebanyak 22 dari 30 planlet menghasilkan pita positif berukuran 350 bp, menandakan keberadaan gen RB. Hal ini mengindikasikan kesuksesan perbanyak bibit kentang Bio Granola melalui teknik kultur jaringan dengan media Murashige-Skoog (MS). Planlet yang terverifikasi positif akan digunakan sebagai stok bahan genetik untuk perbanyak selanjutnya. Sebaliknya, planlet yang tidak menunjukkan pita target, tidak direkomendasikan untuk menjadi bahan perbanyak karena diduga mengalami variasi somaklonal selama subkultur. Dengan demikian, terhadap stabilitas gen RB yang terintegrasi pada genom kentang Bio Granola hasil perbanyak menggunakan teknik kultur jaringan, sangat relevan dilakukan dalam rangka menjamin mutu bibit sebelum didistribusikan ke pengguna.

PENDAHULUAN

Kentang (*Solanum tuberosum*) merupakan salah satu komoditas pangan strategis yang berperan penting dalam memenuhi kebutuhan karbohidrat global (Sugiyono, *et al.*, 2021). Di Indonesia, kentang memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi, namun sektor pertanamannya sering menghadapi berbagai tantangan, salah satunya adalah serangan hama dan infeksi penyakit yang dapat mengancam hasil panen (Hadiarto and Ambarwati, 2024). Penyakit

hawar daun yang disebabkan oleh patogen *Phytophthora infestans* menjadi salah satu ancaman terbesar bagi tanaman kentang, karena infeksi ini dapat menyebabkan gagal panen total terutama pada kondisi lingkungan yang mendukung, seperti musim penghujan (Purwantisari, *et al.*, 2016; Kurniawan, dkk., 2018).

Langkah untuk mengatasi masalah ini, Kementerian Pertanian Indonesia meluncurkan Kentang Varietas Bio Granola pada tahun 2021 yang mengandung gen RPi-blb1 atau gen RB dengan

kemampuan memberi ketahanan terhadap penyakit hawar daun (Karki, *et al.*, 2021). Meskipun varietas ini menawarkan solusi ketahanan tanaman, kualitas bibit tetap menjadi faktor kunci untuk memastikan keberhasilan perbanyak dan keberlanjutan produksi kentang Bio Granola (Hamdani, dkk., 2020). Salah satu metode efektif untuk perbanyak bibit adalah kultur jaringan yang memungkinkan perbanyak dalam jumlah besar dengan hasil yang seragam. Namun, perbanyak secara berulang

dapat menyebabkan perubahan genetik, yang berisiko mengurangi ketahanan tanaman terhadap penyakit (Minarsih, dkk., 2016).

Dengan demikian, penggunaan marka spesifik gen sangat penting untuk memverifikasi keberadaan gen RB pada tanaman kentang Bio Granola hasil perbanyakan *in vitro*. Marka molekuler yang merupakan urutan DNA yang berfungsi sebagai penanda genetik, memungkinkan verifikasi gen RB pada bibit yang diuji (Basundari, 2016). Hal ini sangat krusial mengingat kualitas dan stabilitas produksi kentang Bio Granola yang tahan terhadap penyakit hawar daun tetap harus terjaga.

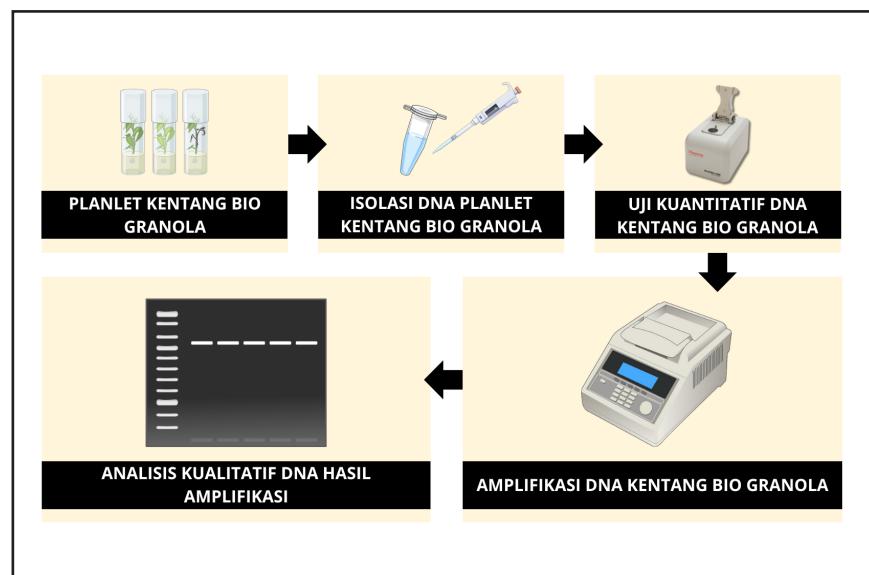
PEMBAHASAN

Deteksi molekuler menjadi langkah penting untuk memastikan stabilitas genetik pada planlet kentang Bio Granola hasil perbanyakan *in vitro* karena adanya potensi variasi somaklonal yang mengakibatkan perubahan pada materi genetik akibat delesi atau mutasi (Ladics, *et al.*, 2015). Oleh karena itu, deteksi molekuler penting dilakukan untuk memastikan bahwa gen RB masih terintegrasi pada planlet kentang Bio Granola, dengan alur pengujian dapat dilihat pada Gambar 1.

BAHAN DAN METODE

Persiapan Sampel

Sampel pengujian yang digunakan adalah 30 planlet kentang Bio Granola hasil subkultur berulang pada media Murashige-Skoog (MS) yang mengandung 50 ml/L unsur hara makro, 10 ml/L unsur hara mikro, 10 ml/L Fe-EDTA, 10 ml/L myoinositol, 1 ml/L vitamin MS, 30 g/L gula, dan 2,5 g/L phytigel. Planlet diambil pada bagian daun



Gambar 1. Alur Pengujian Molekuler.

sebagai bahan uji. Sampel disimpan pada suhu -20 °C untuk mencegah kerusakan DNA pada jaringan tanaman sebelum dilakukan proses ekstraksi.

Ekstraksi DNA

Tahapan ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan metode Doyle and Doyle (1990) menggunakan *buffer* ekstraksi *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB). Sampel digerus menggunakan mortar dan *pestle* steril dengan penambahan 500 μ l *buffer* ekstraksi CTAB dan dilakukan inkubasi pada suhu 65 °C untuk memecah membran sel, sehingga komponen DNA dapat terikat. Setelah itu, pengikatan DNA dilakukan dengan penambahan 800 μ l CHISAM (*chloroform isoamyl alcohol*), diinkubasi pada suhu 65 °C, selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit pada 12.000 rpm. Supernatan dipindahkan sebanyak 500 μ l diikuti dengan penambahan 500 μ l isopropanol dingin dan

diinkubasi selama 1 jam pada suhu -20 °C, dilanjutkan proses sentrifugasi selama 10 menit pada 12.000 rpm untuk memisahkan kontaminan seperti protein, lipid dan molekul polisakarida lain. Pelet DNA yang terbentuk dikeringanginkan pada suhu ruang semalam. Pelet DNA kering dilarutkan dengan *buffer* TE. Kuantitas DNA hasil isolasi diestimasi menggunakan Nanodrop 2000 spektrofotometer (Thermo scientific, USA).

Amplifikasi DNA dengan PCR

Tahap amplifikasi DNA dilakukan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan marka spesifik gen RB. Reaksi PCR terdiri dari DNA template sebanyak 50 ng sebagai target amplifikasi, primer *forward* dan *reverse* (Tabel 1), enzim Taq polymerase serta air bebas nuklease untuk melarutkan dan menyesuaikan volume campuran reaksi. Pembuatan PCR *cocktail* dilakukan menggunakan PCR *ready*

Tabel 1. Sekuens Marka Spesifik RB

Sekuens (5'-3')	Tm (°C)	Referensi
F – GCT CTT TGA GAT TAT TGC ACC GAG AG	F – 57,6	
R – CCA CCC TTT GGT GAT CTG CCT TG	R – 60,4	Listanto <i>et al.</i> , 2015

mix MyTaq™ HS Mix 2x (Bioline, UK) dengan komposisi masing-masing komponen sebanyak 165 μ l MyTaq™ HS Mix 2x (Bioline, UK), 33 μ l primer RB, dan 66 μ l air bebas nuklease.

Proses amplifikasi dijalankan di dalam mesin PCR T100 *Thermal Cycler* (Bio-Rad, USA) yang diprogram sebanyak 35 siklus dalam tiga tahap utama, yaitu denaturasi awal 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 60°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir 72°C selama 4 menit guna memastikan hasil amplifikasi yang optimal.

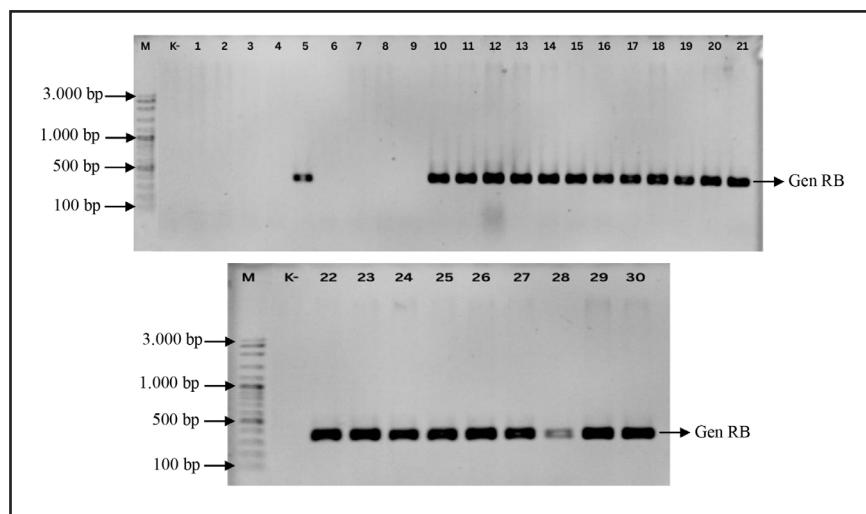
Visualisasi DNA Hasil Amplifikasi

DNA hasil amplifikasi dengan PCR diseparasi melalui teknik elektroforesis gel agarosa 2% dengan buffer 0,5x TBE. Setelah tahap elektroforesis selesai, gel direndam dalam larutan pewarna *ethidium bromide* (EtBr) dan divisualisasi menggunakan Gel Doc UV-transilluminator ChemiDoc EQ™ System (Bio-Rad, USA). Selanjutnya, konfirmasi keberadaan gen target pada sampel uji ditentukan berdasarkan munculnya pita DNA amplikon pada ukuran target gen RB 350 bp. Estimasi ukuran fragmen DNA dilakukan dengan membandingkan pita yang terbentuk pada sampel uji terhadap 100 bp DNA ladder sebagai penanda ukuran.

HASIL

Analisis Kualitatif DNA Hasil Amplifikasi

Keberhasilan amplifikasi DNA menggunakan primer terkait gen RB dalam proses PCR ditunjukkan oleh munculnya pita DNA yang jelas pada posisi sekitar 350 bp,



Gambar 2. Hasil Amplifikasi Gen RB
Keterangan: (M) 100 bp DNA ladder; (K-) Granola; (1-30) Bio Granola

sesuai dengan estimasi ukuran berdasarkan pembanding dari DNA ladder setelah melalui tahap elektroforesis menggunakan gel agarosa 2%.

Berdasarkan pola pita hasil amplifikasi gen RB pada sampel uji, sebanyak 22 dari 30 planlet Bio Granola hasil perbanyakan *in vitro* yang diuji pada penelitian ini positif membawa gen RB yang ditunjukkan dengan munculnya fragmen pita DNA pada ukuran 350 bp dan sesuai dengan ukuran yang diharapkan (Gambar 2).

Berdasarkan hasil pengamatan kualitatif pada gel agarosa, ditemukan bahwa tidak semua sampel menunjukkan pita DNA pada posisi yang diharapkan (Gambar 2). Hal ini mengindikasikan bahwa sebagian sampel tidak mengandung gen target, yaitu gen RPi-b1b1 atau gen RB, yang memberikan ketahanan terhadap cendawan patogen *Phytophthora infestans*. Keberadaan pita DNA pada posisi yang diinginkan memiliki implikasi penting terkait stabilitas gen RB pada bibit kentang Bio Granola yang diperoleh melalui perbanyakan *in vitro*. Hasil positif yang menunjukkan pita DNA pada posisi yang diinginkan menandakan bahwa bibit tersebut masih mengandung gen RB, sehingga memiliki ketahanan

terhadap penyakit hawar daun. Sebaliknya, hasil negatif yang tidak menunjukkan pita DNA menandakan bahwa bibit tersebut tidak lagi mengandung gen RB, sehingga tanaman menjadi lebih rentan terhadap cendawan patogen *Phytophthora infestans*. Kehilangan gen RB ini berisiko mengurangi ketahanan tanaman, bahkan dapat menyebabkan penurunan produktivitas kentang Bio Granola hingga 100% (Purwantisari, dkk., 2016).

Proses perbanyakan *in vitro* diketahui dapat menyebabkan potensi variasi somaklonal yang cukup tinggi akibat stres sel yang dialami selama kultur jaringan (Manchanda, et al., 2018). Stres ini dapat mengganggu siklus sel normal dan menyebabkan perubahan pada DNA tanaman, baik secara epigenetik maupun genetik. Variasi somaklonal genetik yang bersifat permanen dan dapat diwariskan sering terjadi akibat kerusakan atau perubahan kromosom dan mutasi titik selama proses perbanyakan *in vitro* (Manchanda, et al., dalam Larkin dan Scowcroft, 1981). Kondisi ini dapat memengaruhi kestabilan genetik tanaman sehingga konfirmasi genetik secara rutin untuk memastikan integritas gen RB pada bibit kentang Bio Granola menjadi

sangat penting. Dengan demikian, pengujian ini perlu dilakukan untuk menjaga kualitas bibit yang akan disebarluaskan, memastikan ketahanan terhadap penyakit, serta menghindari variasi genetik yang dapat merugikan.

PENUTUP

Berdasarkan hasil amplifikasi gen RB menggunakan PCR, diketahui bahwa 22 dari 30 sampel planlet Bio Granola menunjukkan pita DNA berukuran sekitar 350 bp sesuai dengan estimasi ukuran berdasarkan DNA *ladder* yang menandakan keberadaan gen RB. Sebaliknya, 8 sampel lainnya tidak menunjukkan pita DNA pada posisi yang diharapkan, yang mengindikasikan ketiadaan gen target. Hal ini mengambarkan bahwa tidak semua planlet hasil perbanyakan *in vitro* masih membawa gen ketahanan, kemungkinan disebabkan oleh perubahan genetik yang terjadi selama proses subkultur. Oleh karena itu, berdasarkan penelitian ini deteksi molekuler penting dilakukan secara berkala guna menjaga kualitas genetik bibit kentang Bio Granola secara berkelanjutan.

DAFTAR PUSTAKA

Basundari, F. R. A., 2016. Tinjauan Teoretis dan Potensi Implementasi Marka DNA 43. *Buletin Agro-Infotek*, 2(1): 43–50. <https://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc73>

Doyle, J., Doyle, J., 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*, 12(1): 13–15.

Hadiarto, T., Ambarwati, A. D., 2024. Breeding of Genetically Engineered Indonesian Potato, Bio Granola,

Resistant to Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 67(2): 695–709. <https://doi.org/10.1007/s11540-023-09662-4>

Hamdani, J. S., Sumadi, Kusumiyati, Ruwidah, H., 2020. Pertumbuhan dan hasil benih kentang go pada komposisi media tanam dan interval pemberian air yang berbeda di dataran medium. *Jurnal Kultivasi*, 19(3): 1237–1246. <https://doi.org/10.24198/kultivasi.v19i3.30583>

Karki, H. S., Abdullah, S., Chen, Y., Halterman, D. A., 2021. Natural Genetic Diversity in the Potato Resistance Gene RB Confers Suppression Avoidance from Phytophthora Effector IPI-O4. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(9): 1048–1056. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-20-0313-R>

Kurniawan, H., Sulastrini, I., Suganda, T., 2018. Uji Ketahanan Klon Kentang Hasil Pesilangan Atlantic x Repita terhadap Penyakit Hawar Daun Phytophthora infestans. *Agrikultura*, 29(2): 100. <https://doi.org/10.24198/agrikultura.v29i2.20806>

Ladics, G. S., Bartholomaeus, A., Bregitzer, P., Doerrer, N. G., Gray, A., Holzhauser, T., Jordan, M., Keese, P., Kok, E., Macdonald, P., Parrott, W., Privalle, L., Raybould, A., Rhee, S. Y., Rice, E., Romeis, J., Vaughn, J., Wal, J. M., Glenn, K., 2015. Genetic basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants. *Transgenic Research*, 24(4): 587–603. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9867-7>

Larkin, P. J., Scowcroft, W. R., 1981. Somaclonal Variation - A Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60 (4) (1981),

pp. 197–214, 10.1007/BF02342540

Listanto, E., Ida Riyanti, E., Joko Santoso, T., Hadiarto, T., Dinar Ambarwati, A., 2015. Genetic Stability Analysis of RB Gene In Genetically Modified Potato Lines Tolerant to Phytophthora infestans. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 16(2): 51–58.

Manchanda, P., Kaur, A., Gosal, S. S., 2018. Somaclonal Variation for Sugarcane Improvement. In *Biotechnologies of Crop Improvement* (1st ed., Vol. 1, pp. 299–326). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78283-6_9

Minarsih, H., Suharyo, Riyadi, I., Ratnadewi, D., 2016. Pengaruh jumlah subkultur dan media sub-optimal terhadap pertumbuhan dan kemampuan regenerasi kalus tebu (*Saccharum officinarum* L.) (Effect of repeated subculture and suboptimum media on the growth of sugarcane calli (*Saccharum officinarum* L.)). *E-Journal Menara Perkebunan*, 84(1): 28–40. <https://doi.org/10.22302/irbb.jur.mp.v84i1.219>

Purwantisari, S., Priyatmojo, A., Sancayaningsih, R. P., Kasiandari, R. S., 2016. Masa Inkubasi Gejala Penyakit Hawar Daun Tanaman Kentang yang Diinduksi Ketahanannya oleh Jamur Antagonis *Trichoderma viride*. *Bioma*, 18(1): 41–47.

Sugiyono, S., Prayoga, L., Proklamasiningsih, E., Faozi, K., & Prasetyo, R., 2021. The Improvement of Mini Tuber Production of Granola Potato Cultivar in Aeroponics System. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 13(1): 77–83. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v13i1.27714>