

## Motif Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Gen *Phytoene Synthase* (PSY) Penyandi Karotenoid Ubi Kayu Berumbi Kuning

*The Polymorphic Gene of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) of Phytoene Synthase (PSY) to Characterize Carotenoids Yellow Root Cassava*

Siti Kurniawati<sup>\*</sup>, N.Sri Hartati, Hartati, Enny Sudarmonowati

Pusat Penelitian Bioteknologi – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor Indonesia

\*E-mail: kurniawatie@gmail.com

### ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) is a carbohydrate sources containing a limited amount of micronutrients, but some genotypes contain  $\beta$ -carotene as the precursor of vitamin A in the storage roots and leaves. Improvement of  $\beta$ -carotene and minerals such as Fe / Zn content of cassava's nutrition is mostly through by biofortification program. The storage root of  $\beta$ -carotene recognized by a yellow or yellowish color while the apical shoots with red to purplish.  $\beta$ -carotene biosynthetic pathway is an expression of the phytoene synthase (PSY) gene. The MePSY2 gene, one of the three MePSY family is the key gene to characterize carotenoids related gene in cassava. In this study, sequencing of the two cassava fulllength PSY genomic DNA was carried out in conserved areas in the PSY gene region (PSY1 and PSY2) from the DNA of the cassava leaves. Adira1, Carvita25 and Ubi Kuning are yellow root storage genotypes (K1, K2 and K3) while Adira4 and Menti are white root storage genotypes (P1 and P2). Carvita25 is induced somaclonal variant of the Adira4 genotype. Contig and consensus of nucleotide base sequences from the five cassava genotypes and CM3306-4 cultivars (acc GU111715.1) as references were analysed using the lasergene DNASTAR sequence analysis program. The results of the alignment of the base sequence constituent of the MePSY2 gene showed that the PSY2 gene with amplified genome length was 2,380 base pairs (bp) consisting of 1,140 bp exon region and 1,240 bp intron region. In the conserved coding region, there was a difference of one nucleotide base, that is, base C in two white tuber cassava genotypes replaced with A in three yellow tuber cassava genotypes in the 1.485 base (C<sub>1.485</sub>A). The SNP converts the amino acid (aa) alanine (A) to aspartic acid (D) at the 191th (A<sub>191</sub>D). Single Nucleotide polymorphism in conserved coding region can be used further as carotenoid marker for plant breeding of yellow root cassava.

**Keywords:** carotene, PSY gene, polymorphic gene SNP, yellow root cassava.

### PENDAHULUAN

Karotenoid merupakan pigmen warna yang sangat penting peranannya pada tanaman dan hewan termasuk manusia (Eldahshan & Singab, 2013). Karotenoid diproduksi oleh sebagian besar organisme berfotosintesis (Wong *et al.*, 2004), yang berperan dalam *photoreception* dan fotoproteksi (Giuliano, 2014). Pada tanaman, karotenoid berfungsi sebagai prekursor dua fitohormon penting yaitu asam absisat (ABA) dan *strigolactone* yang merupakan regulator utama pada perkembangan dan respon terhadap cekaman (Yuan *et al.*, 2015), pewarna, prekursor molekul volatile pada tanaman isoprenoid, antioksidan dan prekursor vitamin A (Giuliano, 2014). Beberapa tahun terakhir, karotenoid banyak dimanfaatkan untuk kesehatan karena aktivitas antioksidan yang tinggi, dan secara intensif digunakan dalam dunia industri makanan, farmasi dan *nutraceutical*

(Sankari *et al.*, 2018). Karotenoid bermanfaat bagi kesehatan manusia diantaranya mencegah degenerasi makula, beberapa jenis kanker tertentu dan berbagai gangguan terkait usia (Fraser & Bramley 2004; Singh & Goyal 2008).

Phytoene synthase (PSY) merupakan enzim utama yang mengatur pada awal jalur biosintesis karotenoid sehingga signifikan mempengaruhi jumlah karotenoid yang dihasilkan (Sugiyama *et al.*, 2017), dikode oleh tiga gen, dua diantaranya (PSY1 dan PSY2) menunjukkan ekspresi di banyak jaringan sedangkan PSY3 sangat rendah dan terbatas hanya pada akar (Giuliano, 2014). Flowerika *et al.* (2016) melaporkan tiga gen *PSY* pada tanaman gandum (*Triticum aestivum* L.) yaitu berdasarkan analisis urutan protein terdapat *conserved motif* terkait aktivitas enzim pada *TaPSY1* dan *TaPSY3*. Sankari *et al.* (2018) mengulas aplikasi rekayasa genetik pada jalur

biosintesis karotenoid dalam upaya peningkatan kandungannya sehingga produksi metabolit sekunder dari pigmen karotenoid dapat relevan secara industri. Gen *PSY* pada ubi kayu telah dipelajari oleh Arango *et al.*, (2010), dan berdasarkan hasil analisis kuantitatif diperoleh hasil bahwa *MePSY1* dan *MePSY2* terekspresi pada saat induksi cekaman salinitas dan kekeringan selama 12 hari dan tidak pada gen *MePSY3*, dimana *MePSY2* terekspresi 10 kali lebih tinggi dibandingkan *MePSY1* pada umbi.

*Single nucleotide polymorphism* (SNP) adalah perubahan dalam basa tunggal pada posisi tertentu dalam genom, dalam banyak kasus dengan dua alel atau perbedaan satu basa nukleotida pada gen *PSY* ubi kayu diekspresikan bersegregasi dengan warna dan akumulasi kandungan beta karoten umbi. SNP tersebut menyebabkan perubahan asam amino pada daerah *conserve* protein dan ketika diuji dalam *E.coli* menghasilkan peningkatan aktivitas katalitik (Welsch *et al.*, 2010). Perbandingan aktivitas enzim *PSY* terlihat sangat signifikan dengan akumulasi beta karoten yang lebih efisien pada endosperm golden rice dan jagung (Giuliano, 2014). - carotene hydroxylase (*CHY*) dan lycopene - cyclase (*LCY-e*) juga merupakan regulator penting pada akumulasi beta karoten dan karotenoid total. Mutasi pada lokus *LCY-em* mengarahkan *flux* menuju *-branch* menyebabkan peningkatan kandungan beta karoten (Harjes *et al.*, 2008).

Ubi kayu (*M. esculenta*) memiliki kandungan beta karoten pada beberapa genotipnya yang ditandai dengan warna kuning pada umbi, namun jumlahnya lebih sedikit dibandingkan ubi kayu berumbi putih. Hasil penelitian Luo *et al.* (2018), sedikitnya terdapat 84 SNP dan 694 gen terdeteksi berasosiasi dengan kandungan karotenoid pada ubi kayu menggunakan *genome wide association studies* (GWAS), dimana Manes.04G164700 (*XanDH*) dan Manes.11G105300 (*AAO*) diduga terkait dalam jalur metabolisme karotenoid dan enam genotip yang diuji coba terekspresi. Sedangkan Welsch *et al.* (2010) menyatakan bahwa gen *PSY2* antara ubi kayu berumbi kuning dan berumbi putih ternyata terdapat perbedaan basa nukleotida (polimorfisme alel) yang berpengaruh pada peningkatan fluks karbon jalur biosintesis karotenoid sehingga mengarah pada akumulasi warna karotenoid umbi. Carvita 25 adalah ubi kayu berumbi kuning

yang merupakan varietas hasil pemuliaan rekayasa *in vitro* (*friable embryogenic callus/FEC*) berasal dari varietas Adira4 yang berumbi putih. Perubahan warna umbi dari putih menjadi kuning diduga berkaitan dengan terjadinya mutasi pada runutan basa gen penyandi sifat karotenoid yaitu *PSY*. Berdasarkan penelitian Welsch *et al.* (2010), satu dari tiga gen *PSY* ubi kayu, hanya gen *PSY2* yang memiliki polimorfisme alel dengan perbedaan pada dua basa nukleotida sehingga menentukan warna kuning umbi ubi kayu pada silsilah persilangan.

Untuk melihat perubahan pola runutan basa nukleotida gen *PSY*, penyandi sifat karotenoid pada umbi Carvita 25 yang diduga berkorelasi terhadap akumulasi kandungan beta karoten umbi, maka dilakukan penyandingan runutan basa nukleotida gen *PSY1* dan gen *PSY2* antara Carvita25 dengan Adira4 sebagai genotip asal. Genotip Adira1 dan Ubi Kuning yang berumbi kuning serta genotip Menti yang berumbi putih juga disertakan sebagai kontrol runutan basa gen *PSY* untuk ubi kayu jenis lainnya.

## METODE

### Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Maret hingga November 2019 di Laboratorium Genetika Molekuler dan Modifikasi Jalur Biosintesa Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong-Bogor.

### Material Tanaman

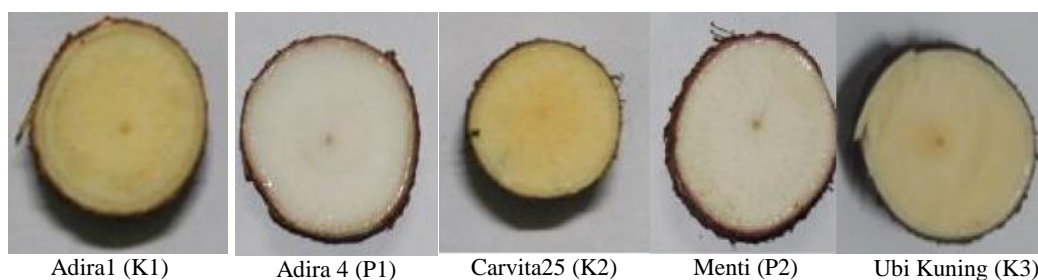
Daun ubi kayu diambil dari tanaman ubi kayu yang tumbuh di kebun koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI yaitu genotip Adira4 (P1) dan Menti (P2) merupakan varietas nasional dan lokal berumbi putih, serta Adira1 (K1), Carvita25 (K2) dan Ubi Kuning (K3) yang merupakan varietas nasional, varian somaklonal dari Adira4 dan genotip lokal (Gambar 1).

### Isolasi Genom DNA Ubi Kayu

DNA genom daun lima genotip ubi kayu di isolasi menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromida*) yang dimodifikasi. Sebanyak  $\pm 200$  mg sampel daun ubi kayu diekstraksi menggunakan nitrogen cair hingga menjadi seperti tepung kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi 1 ml Buffer CTAB + 0.2% -mercaptoethanol dan dikocok hingga homogen lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit. Campuran yang dihasilkan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan ke dalam tube baru dengan penambahan 600  $\mu$ l Chloroform Isoamyl Alcohol/CIA (24:1) yang dibuat *fresh* lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10

menit suhu 4°C. Proses ini diulangi sebanyak 3 kali dengan modifikasi penambahan 100µl air bebas nuclease (*nuclease free water*). Ethanol absolut dimasukkan ke dalam supernatan dengan perbandingan 1:1 kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu -20°C, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan penuh pada suhu 4°C selama 5 menit, pellet dibilas menggunakan 400 µl Et-OH

80% dan disentrifugasi dengan kecepatan penuh selama 8 menit pada suhu 4°C. Pembilasan diulang dua kali. Pellet yang dihasilkan dikeringanginkan pada suhu ruang hingga kering. Sebanyak 30-40 µl *RNAse free water* digunakan sebagai larutan dilusi kemudian disimpan pada suhu -20°C. gDNA siap digunakan setelah dilakukan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif.



Gambar 1. Variasi Fenotipik Warna Umbi Lima Genotip Ubi Kayu Koleksi Puslit Bioteknologi LIPI

#### Isolasi Genom DNA Ubi Kayu

DNA genom daun lima genotip ubi kayu di isolasi menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromida*) yang dimodifikasi. Sebanyak ± 200 mg sampel daun ubi kayu diekstraksi menggunakan nitrogen cair hingga menjadi seperti tepung kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi 1 ml Buffer CTAB + 0.2% -mercaptoethanol dan dikocok hingga homogen lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit. Campuran yang dihasilkan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan ke dalam tube baru dengan penambahan 600 µl Chloroform Isoamyl Alcohol/CIA (24:1) yang dibuat *fresh* lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit suhu 4°C. Proses ini diulangi sebanyak 3 kali dengan modifikasi penambahan 100µl air bebas nuclease (*nuclease free water*). Ethanol absolut dimasukkan ke dalam supernatan dengan perbandingan 1:1 kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu -20°C, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan penuh pada suhu 4°C selama 5 menit, pellet dibilas menggunakan 400 µl Et-OH 80% dan disentrifugasi dengan kecepatan penuh selama 8 menit pada suhu 4°C. Pembilasan diulang dua kali. Pellet yang dihasilkan dikeringanginkan pada suhu ruang hingga kering. Sebanyak 30-40 µl *RNAse free water* digunakan sebagai larutan dilusi kemudian disimpan pada suhu -20°C. gDNA siap digunakan setelah dilakukan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif.

#### Amplifikasi Gen Phytoene Synthase (MePSY)

Amplifikasi gen *MePSY1* dan *MePSY2* dari DNA daun ubi kayu genotip Adira1, Adira4, Carvita25, Menti dan Ubi Kuning dilakukan menggunakan PCR dengan masing-masing sepasang primer spesifik *MePSY1* dan *MePSY2* berdasarkan penelitian Arango *et al.* (2010). Proses reaksi PCR dilakukan dengan tahapan kondisi yaitu fase

denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, diikuti 35 siklus yang terdiri dari fase denaturasi 95°C selama 15 detik, penempelan primer (*annealing*) 60°C selama 15 detik, perpanjangan (*elongation*) 72°C selama 3 menit dan siklus terakhir fase elongasi 72°C selama 10 menit. Perunutan basa nukleotida penyusun gen *MePSY1* dan *MePSY2* dilakukan di *1stBASE Company*, Malaysia menggunakan primer *forward* dan *reverse*.

#### Analisis Runutan Basa Nukleotida/Bioinformatik

Data hasil sekuensing (pembacaan *forward* dan *reverse*) dianalisa tingkat kemiripannya (*similarity*) dengan data GenBank pada program online BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tools Nucleotide*) diakses melalui NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Runutan basa nukleotida kemudian diedit menggunakan *BioEdit software* (Hall, 1999). Pasangan runutan basa dari kelima genotip ubi kayu disejajarkan beserta runutan basa nukleotida cultivar CM3306-4 dengan nomor akses GU111715.1 sebagai referensi berdasarkan pengelompokan *contiq* menggunakan program analisis sekuen DNASTAR laser gene dan dilakukan analisis perbedaan basa nukleotida (SNP). Variabel parameter SNP berupa *sites* nukleotida dan asam amino serta komposisi basa nukleotida.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Kuantifikasi dan Kualifikasi DNA

Kualitas DNA hasil isolasi dilihat menggunakan elektroforesis gel agarose 1% dan diukur kuantitasnya menggunakan spektrofotometer Nanodrop. Hasil elektroforegram menunjukkan pendaran pita DNA yang baik yaitu tajam dan utuh sedangkan konsentrasi DNA kelima genotip lebih dari 1000 ng/µl dengan nilai kemurnian berdasarkan rasio absorbansi pada panjang

gelombang A260/A280 berada pada kisaran 1.9 (Tabel 1).

#### Amplifikasi MePSY dari DNA genom lima genotip ubi kayu

Struktur genom gen target *MePSY1* (Manes.02G081700.1. kromosom 2: posisi 6091016-6093529) dan *MePSY2* (Manes.01G124200.1. kromosom 1: posisi 24153420-24156720) berdasarkan database Phytozome

(<http://www.phytozome.net/cassava.php>). Gen *MePSY1* terdiri dari 1.296 pasang basa (pb) pada 6 daerah ekson, 713 pb pada 5 daerah intron serta daerah 5'UTR dan 3'UTR masing-

masing 389 pb dan 116 pb. Sedangkan gen *MePSY2* terdiri dari 1290 pb pada 6 daerah ekson dan 1369 pb pada 5 daerah intron serta daerah 5'UTR dan 3'UTR masing-masing 489 pb dan 153 pb (Gambar 2).

Ukuran pita putative gen *MePSY1* dan *MePSY2* yang berhasil teramplifikasi dari DNA genom menggunakan primer spesifik berturut-turut sekitar 2300 pb dan 2500 pb (Gambar 3).

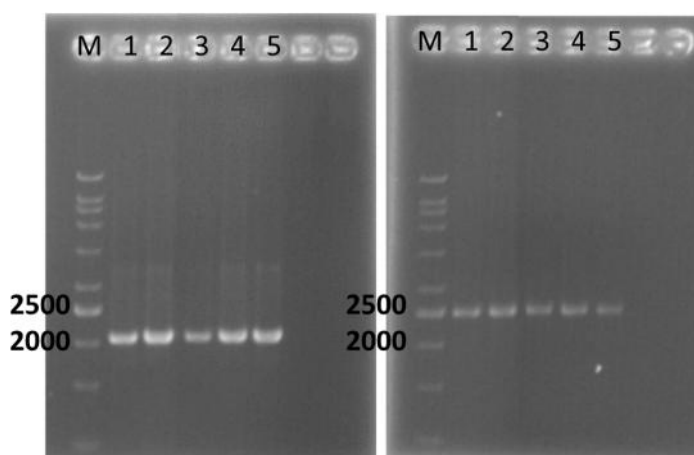
Ukuran tersebut lebih kecil dari struktur genom gen target *PSY1* dan *PSY2* yaitu 2514 dan 3301, hal tersebut karena amplifikasi dimulai dari *open reading frame* (ORF) pada daerah *coding sequence* (cgs).

Tabel 1. Hasil pengukuran kuantitas DNA lima genotip ubi kayu

No.	Genotip	Konsentrasi (ng/μl)	Kemurnian (A260/A280)
1.	Adira1	1141	1.967
2.	Adira4	1189	1.976
3.	Carvita25	1932	1.995
4.	Menti	1214	1.961
5.	Ubi Kuning	1039	1.945



Gambar 2. Skema struktur gen target *MePSY1* (a) dan *MePSY2* (b) teramplifikasi menggunakan spesifik primer Fw dan Rv (<http://www.phytozome.net/cassava.php>)



Gambar 3. Elektrofogram gen *MePSY1* (a) dan gen *MePSY2* (b) pada lima genotip ubi kayu yaitu Adira1 (1); Adira4 (2); Carvita25 (3); Menti (4); dan Ubi Kuning (5)

#### Analisis Variasi Basa Nukleotida

Hasil perunut basa nukleotida dari lima genotip ubi kayu menggunakan primer F (*forward*) dan R (*reverse*) kemudian masing-masing diidentifikasi menggunakan program

*online* BLASTn NCBI. Hasil BLAST sekuen *MePSY1* dan *MePSY2* dengan dua arah pembacaan dapat dilihat pada Tabel 2. *MePSY1* dari kelima genotip ubi kayu memiliki tingkat kemiripan antara 93-99% dengan *MePSY1* ubi

kayu yang telah terdeposit pada database genebank, namun dengan tingkat *E-value* yang rendah terutama genotip Adira1, Adira4, dan Ubi Kuning. Sedangkan MePSY2 kelima genotip ubi kayu memiliki tingkat kemiripan antara 94-99% dengan E-value 0.0.

**Variasi Satu Basa Nukleotida pada Gen MePSY2**

Hasil penyejajaran *full-length* sekuen gen *MePSY2* dari DNA lima genotip ubi kayu terdiri dari ubi kayu berumbi putih dan berumbi kuning menunjukkan terdapatnya polimorfisme basa nukleotida tunggal (SNP) pada beberapa titik daerah *coding* dan *non-coding* genom. Terdapat tujuh titik SNP pada *non-coding region* (ncSNP) (Gambar 4) yang diduga tidak berdampak pada fenotipik kelima ubi kayu dan lima titik SNP pada *coding region* (cSNP) (Gambar 5) yang dapat menyebabkan

perubahan asam amino dan mengubah transkrip protein. Carvita25 (K2) yang merupakan varian somaklonal dari Adira4 (P1) menunjukkan terjadinya mutasi atau perbedaan satu basa pada basa ke-1.485 (cSNP3) dan basa ke-2.050 (ncSNP7). Perbedaan satu basa pada *coding region* (cSNP3) ini terlihat jelas antara genotip berumbi putih dan kuning yaitu basa C menjadi A yang mengubah asam amino ke-191 dari Alanin (A) menjadi asam aspartate (D).

Pada basa ke-640, Adira4 dan Carvita25 memiliki basa G sedangkan genotip lain dengan basa A sama dengan cultivar CM3306-4 sebagai referensi (ncSNP2). Terdapat variasi perbedaan satu basa nukleotida dari kelima genotip ubi kayu berumbi putih, kuning beserta kultivar referensi. Perbedaan tampak pada daerah pengkodean atau daerah bukan pengkodean (Tabel 3).

Tabel 2. Persentase kemiripan (*similarity*) runutan basa nukleotida penyusun *MePSY* lima genotip ubi kayu dengan *MePSY1* dan *MePSY2* cultivar CM3306-4 (acc GU111715.1 dan GU111715.1) pada database NCBI

Genotip	Prediksi Alignment	ORF	Query cover (%)	E value	Similarity (%)
Adira1	MePSY1, complete cds	Fw	-	-	-
Adira4	MePSY1, complete cds	Fw	91	2e-48	95
Carvita25	MePSY1, complete cds	Fw	98	0.0	95
Menti	MePSY1, complete cds	Fw	98	0.0	99
Ubi Kuning	MePSY1, complete cds	Fw	-	-	-
Adira1	MePSY1, complete cds	Rv	69	2e-108	93
Adira4	MePSY1, complete cds	Rv	91	2e-48	95
Carvita25	MePSY1, complete cds	Rv	97	0.0	98
Menti	MePSY1, complete cds	Rv	97	0.0	99
Ubi Kuning	MePSY1, complete cds	Rv	6	1e-08	96
Adira1	MePSY2, complete cds	Fw	96	0.0	96
Adira4	MePSY2, complete cds	Fw	98	0.0	96
Carvita25	MePSY2, complete cds	Fw	84	0.0	99
Menti	MePSY2, complete cds	Fw	88	0.0	97
Ubi Kuning	MePSY2, complete cds	Fw	97	0.0	94
Adira1	MePSY2, complete cds	Rv	98	0.0	97
Adira4	MePSY2, complete cds	Rv	96	0.0	98
Carvita25	MePSY2, complete cds	Rv	97	0.0	96
Menti	MePSY2, complete cds	Rv	96	0.0	97
Ubi Kuning	MePSY2, complete cds	Rv	96	0.0	96

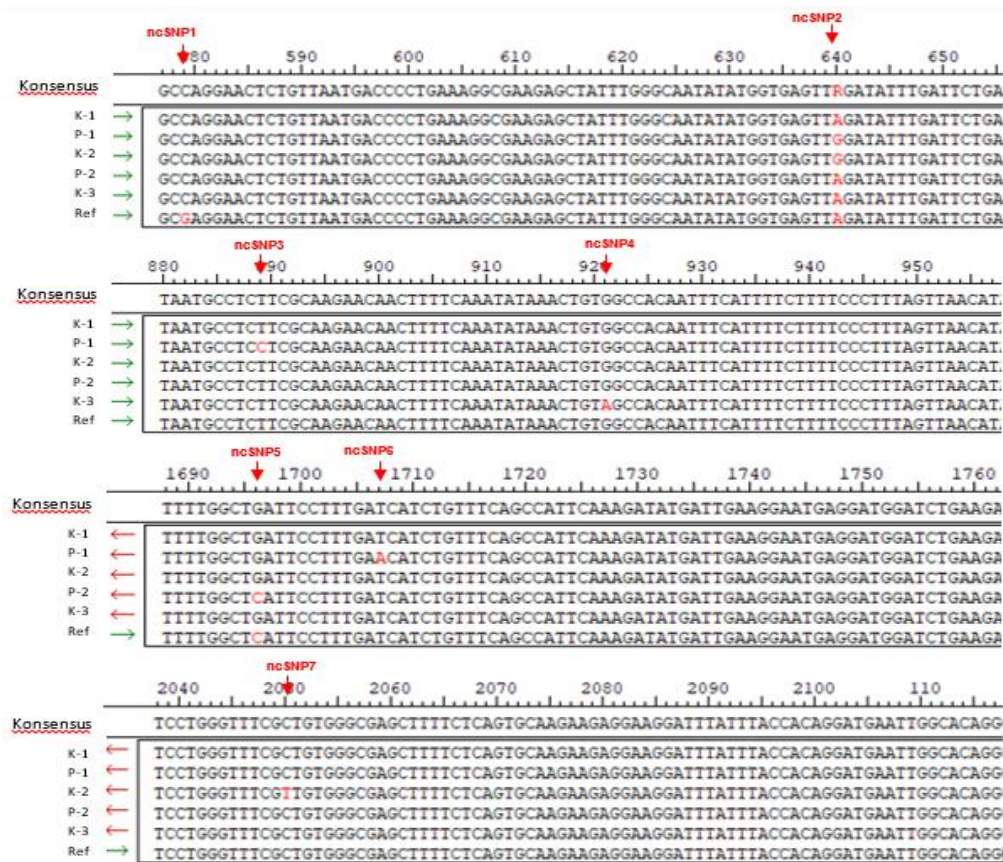
Ket: (-) = tidak terdapat kemiripan atau terkontaminasi

Tabel 3. Variasi perbedaan basa nukleotida (SNP) lima genotip ubi kayu dengan umbi berwarna kuning dan putih.

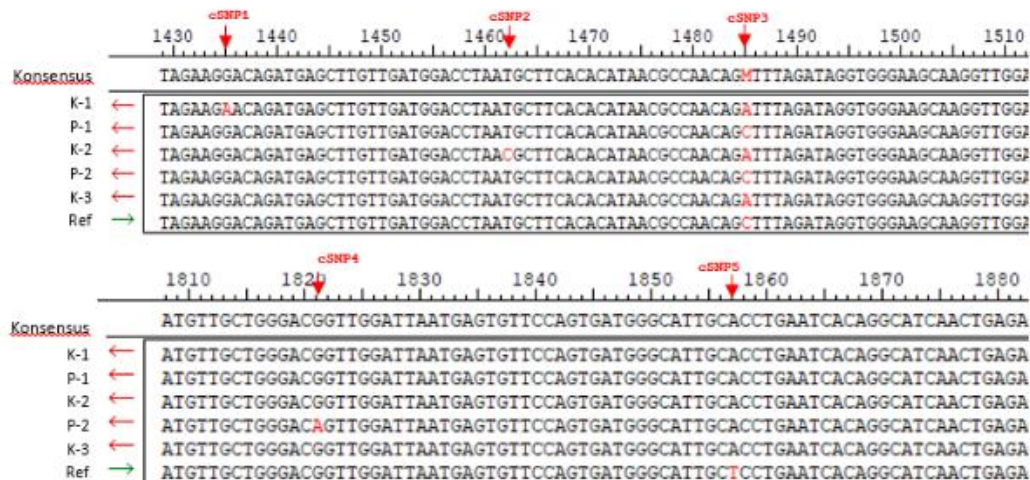
Jenis / Genotip	Warna umbi	Posisi SNP					
		Coding region					
		cSNP1 1.435	cSNP2 1.462	cSNP3 1.485	cSNP4 1.821	cSNP5 1.857	
Adira 1	Kuning	A	T	A	G	A	
Carvita 25	Kuning	G	C	A	G	A	
Ubi Kuning	Kuning	G	T	A	G	A	
Adira 4	Putih	G	T	C	G	A	
Menti	Putih	G	T	C	A	A	
CM3306-4 (accGU111715.1)	Putih	G	T	C	G	T	

Jenis / Genotip	Warna umbi	Non coding region						
		ncSNP 1	ncSNP2 640	ncSNP3 889	ncSNP4 921	ncSNP5 1.696	ncSNP6 1.752	ncSNP7 2.050
		579						
Adira 1	Kuning	C	A	T	G	G	T	C
Carvita 25	Kuning	C	G	T	G	G	T	T
Ubi Kuning	Kuning	C	A	T	A	G	T	C
Adira 4	Putih	C	G	C	G	G	A	C
Menti	Putih	C	A	T	G	C	T	C
CM3306-4 (accGU111715.1)	Putih	G	A	T	G	C	T	C



Gambar 4. Penyejajaran runutan basa nukleotida kelima genotip ubi kayu beserta referensi diluar daerah pengkodean (*non-coding region*) menunjukkan tujuh titik *single nucleotide polymorphism* (SNP).



Gambar 5. Penyejajaran runutan basa nukleotida kelima genotip ubi kayu beserta referensi pada daerah pengkodean (*coding region*) menunjukkan lima titik *single nucleotide polymorphism* (SNP).

DNA genomik mengandung berbagai polimorfisme, seperti substitusi nukleotida tunggal, penyisipan/penghapusan, dan motif pengulangan nukleotida. Menurut Wondji *et al.* (2007), SNP dapat terletak pada daerah non-coding genom dan *synonymous* SNP (sSNP) pada daerah pengkodean yang tidak berdampak pada fenotipik namun dapat memberikan penanda sehingga berguna untuk studi genetika populasi, sedangkan *non-synonymous* SNP (nsSNP) mengubah struktur dan urutan asam amino yang dapat merubah fungsi protein yang disandi sehingga dapat digunakan sebagai penanda dalam studi asosiasi untuk mendeteksi variasi genetik terkait dengan sifat fenotipik.

SNP berguna sebagai penanda dalam genetika populasi dan studi evolusi. Tergantung di mana SNP terjadi, berpotensi memiliki perbedaan ditingkat fenotipik. SNP di daerah pengatur gen kemungkinan akan mempengaruhi risiko penyakit umum. SNP di wilayah 3'-UTR dapat mengubah stabilitas mRNA dengan mengubah situs pengikatan atau struktur sekunder, sehingga lebih atau kurang diduga dapat membuatnya terdegradasi. SNP di wilayah 5' memungkinkan dapat mengubah situs pengikat dan dapat memodifikasi afinitas faktor transkripsi. nsSNP dapat menyebabkan terjadinya kodon stop di awal sehingga polipeptida terpotong, dan mengakibatkan hilangnya fungsi (Jehan & Lakhanpaul, 2006).

**KESIMPULAN**

Hasil analisa peruntan basa nukleotida penyusun gen *PSY2* lima genotip ubi kayu,

yaitu tiga jenis berumbi kuning dan dua jenis berumbi putih, menunjukkan terdapat tujuh *site* SNP pada daerah *non-coding* dan lima *site* SNP pada daerah pengkodean (empat *sites* *synonymous* SNP (sSNP) dan satu *site non-synonymous* SNP (nsSNP)). Satu nsSNP pada daerah pengkodean memiliki motif yang sama pada ubi kayu berumbi kuning yaitu basa A sedangkan ubi kayu berumbi putih memiliki basa C pada basa ke-1.485 sehingga merubah asam amino ke-191 dari Alanin (A) menjadi asam aspartate (D). Carvita25 yang merupakan varian somaklonal, memiliki motif A pada titik nsSNP yang berbeda dari Adira4 yang memiliki motif C pada titik nsSNP. Perbedaan motif nukleotida pada titik nsSNP pada Carvita 25 diduga berkaitan dengan perubah fenotipik umbi menjadi kuning dari Adira4 yang berumbi putih.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Rikno Harmoko untuk diskusi ilmiahnya, Dr. Ima M. Zainuddin serta Muhammad Usen untuk bantuan teknis di laboratorium. Kegiatan penelitian ini merupakan bagian dari kegiatan Insinas Ristek Program Flagship LPNK WBS 1 tahun anggaran 2018.

**DAFTAR PUSTAKA**

Arango, J., Wüst, F., Beyer, P., Welsch, R. 2010. Characterization of Phytoene Synthases From Cassava and Their Involvement in Abiotic Stress-mediated Responses. *Planta* 232: 1251-1262.

- Eldahshan, O. A., Singab, A. N. B. 2013. Carotenoids. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2 (1): 225-234.
- Flowerika., Alok, A., Kumar, J., Thakur, N., Pandey, A., Pandey, A. K., Upadhyay, S. K., Tiwari, S. 2016. Characterization and Expression Analysis of Phytoene Synthase From Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *PloS ONE* 11(10):e0162443. doi:10.1371/journal.pone.0162443.
- Fraser, P. D., Bramley, P. M. 2004. The Biosynthesis and Nutritional Uses of Carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43: 228-265. doi: 10.1016/j.plipres.2003.10.002 PMID: 15003396.
- Giuliano, G. 2014. Plant Carotenoids: Genomics Meets Multi-gene Engineering. *Current Opinion in Plant Biology* 19: 111-117. doi: org/10.1016/j.pbi.2014.05.006.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit; a User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98..
- Harjes, C. E., Rocheford, T. R., Bai, L., Brutnell, T. P., Kandianis, C. B., Sowinski, S. G., Stapleton, A. E., Vallabhaneni, R., Williams, M., Wurtzel, E.T., et al. 2008. Natural Genetic Variation in Lycopene Epsilon Cyclase Tapped For Maize Biofortification. *Science*. 319:330-333.
- Jehan, T., Lakhanpaul, S. 2006. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Methods and Applications in Plant Genetics: A review. *Indian Journal of Biotechnology*. 5(4): 435-459.
- Luo, X., Tomlins, K. I., Carvalho, L. J. C. B., Li, K., Chen, S. 2018. The Analysis of Candidate Genes and Loci Involved With Carotenoid Metabolism in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Using SLAF-seq. *Acta Physiologiae Plantarum* 40: 66. doi.org/10.1007/s11738-018-2634-7.
- Sankari, M., Rao, P. R., Hemachandran, H., Pullela, P. K., Doss, C. G. P., Tayubi, I. A., Subramanian, B., Gothandam, K. M, Singh, P., Ramamoorth, S. 2018. Prospects and Progress in The Production of Valuable Carotenoids: Insights From Metabolic Engineering, Synthetic Biology, and Computational Approaches. *Journal of Biotechnology*. 266: 89-101.
- Singh, P., Goyal, G. K. 2008. Dietary Lycopene: Its Properties and Anticarcinogenic Effects. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 7: 255-270. doi: 10.1111/j.1541-4337.2008.00044.x.
- Sugiyama, A., Ikoma, Y., Fujii, H., Endo, T., Nesumi, H., Shimada, T., Omura, T. 2017. Allelic Diversity of Phytoene Synthase Gene Influences the Transcription Level in Citrus Fruit Among A Citrus F<sub>1</sub> Hybrid Population. *Breeding Sciences* 67: 382-392.
- Welsch, R., Arango, J., Bär, C., Salazar, B., Al-Babili, S., Beltrán, J., Chavarriaga, P., Ceballos, H., Tohme, J., Beyer, P. 2010. Provitamin A Accumulation in Cassava (*Manihot esculenta*) Roots Driven by A Single Nucleotide Polymorphism in A Phytoene Synthase Gene. *The Plant Cell*. 22: 3348-3356.
- Wong, J. C., Lambert, R. J., Wurtzel, E. T., Rocheford, T. R. 2004. QTL and Candidate Genes Phytoene Synthase and -carotene Desaturase Associated With The Accumulation of Carotenoids in Maize. *Theor. Appl. Genet*. 108: 349-359.
- Yuan, H., Zhang, J., Nageswaran, D., Li, L. 2015. Carotenoid Metabolism and Regulation in Horticultural Crops. *Horticulture Research* 2: 15036. doi:10.1038/hortres.2015.36.