

Karakteristik Molekuler Variasi Somaklonal Ubi Kayu Varietas Carvita 25 Menggunakan Marka SSR

Molecular Characteristics of Cassava Carvita 25 Somaclonal Variant Using SSR Marker

Nur Ayu Ramadanti¹, Hartati^{2*}, Dwi Hilda Putri¹, N. Sri Hartati²

¹Universitas Negeri Padang, Padang

²Puslit Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Cibinong

E-mail: tatiktikta@yahoo.com

ABSTRACT

Cassava is one of the most important food commodities besides rice and corn. Carvita 25 is a somaclonal variation that was induced from Adira IV cassava variety. Our study aimed to analyze the genetic differences of Carvita 25 compared to Adira IV by using SSR markers. Two cassava varieties, Carvita 25 and Adira IV, were used as plant materials and eleven SSR primers were used to amplify the fragments of cassava DNA. The results showed that SSRY 151 primer produced the highest polymorphic band (85.71%) where 6 out of 7 alleles were polymorphic with the length size from 120 to 600 bp. Of the total 56 of polymorphic bands, 26 alleles were previously present in Adira IV but then it can not be found in Carvita 25, while 30 other bands were new fragments that were previously not present in Adira IV but then were present in Carvita 25. These genetic differences of both Adira IV and Carvita 25 were also strengthened by the Jaccard similarity value. The Jaccard similarity between Carvita 25 and Adira IV were 0.40-0.50, while the similarity between plants of Carvita 25 were 0.79-0.87, and in plants of Adira IV were 0.98-1. These values showed the wide genetic difference between Adira IV and a somaclonal variation of Carvita 25.

Keywords: cassava, Carvita 25, polymorphic, somaclonal variation, SSR Marker.

PENDAHULUAN

Kebutuhan ubi kayu (*Manihot esculanta*) dalam negeri akan semakin meningkat di masa yang akan datang sejalan dengan semakin meningkatnya dan berkembangnya industri berbahan baku ubi kayu, termasuk industri mocaf kaya beta karoten (KBK). Kebutuhan ubi kayu pada tahun 2025 diperkirakan sekitar 30 juta ton ubi kayu segar, dan untuk memenuhi kebutuhan tersebut diperlukan peningkatan produksi ubi kayu sekitar 27% (Suryana 2006). Khusus untuk produksi mocaf KBK diperlukan jenis ubi kayu tertentu yang berumbi kuning (Hartati *et al.*, 2017). Untuk memenuhi kebutuhan industri mocaf KBK maka perlu dilakukan penanaman jenis ataupun perakitan galur unggul ubi kayu dengan kandungan beta karoten tinggi.

Upaya peningkatan produksi ubi kayu demi kecukupan kebutuhan permintaan ubi kayu dapat dilakukan melalui perakitan varietas atau galur superior ubi kayu dengan pemuliaan tanaman, baik melalui aplikasi bioteknologi ataupun secara konvensional. Zhang *et al.*, (2014) melaporkan beberapa target perakitan galur superior ubi kayu oleh pemulia tanaman, diantaranya adalah perbaikan ecotipe ubi kayu

untuk meningkatkan produktivitas ubi kayu, seperti peningkatan berat umbi hingga 9 kg per tanaman, harvest indeks lebih dari 0,6, jumlah umbi 9-13 buah per pohon, retensi daun 100 hari serta diameter batang hingga 3,5 cm. Selain itu, beberapa target pemuliaan yang juga penting adalah perakitan ubi kayu kaya vitamin dan protein, berumur genjah (8-10 bulan), dan memiliki kemampuan adaptasi seperti dalam efisiensi penggunaan air dan NPK, bebas penyakit, dan tahan daya simpan. Untuk perbaikan kandungan nutrisi, salah satu target pemulia ubi kayu adalah melakukan perakitan ubi kayu dengan kandungan beta karoten yang lebih tinggi.

Perakitan galur superior ubi kayu dapat dilakukan salah satunya melalui induksi variasi somaklonal. Variasi somaklonal adalah variasi genetik/epigenetik, ataupun perubahan fenotipik, karyotip, fisiologi, biokimia atau variasi pada level molekuler, yang terjadi dalam populasi tanaman yang diinduksi melalui kultur jaringan ataupun kultur sel, baik sel somatik seperti sel daun, akar, dan batang, maupun sel gamet (Lestari *et al.*, 2010, Anil *et al.*, 2018). Variasi ini dapat berasal dari perubahan yang sudah ada dalam eksplan dari

mana kultur diinisiasi atau diinduksi secara *in vitro* oleh media kultur dan lingkungan. Variasi somaklonal dipicu oleh mutasi karena proses kultur yang menginduksi munculnya keragaman genetik yang sangat penting untuk pengayaan *genetic pool* atau pengembangan basis genetik pada program pemuliaan dan program konservasi tanaman (Sato *et al.*, 2011, Krishna *et al.*, 2016). Sebagai contoh, polimorfisme ditemukan lebih tinggi pada tanaman variasi somaklonal dibanding pada tanaman induk/budidaya, dan tingkat kesamaan atau *similarity* berbasis nilai Jaccard indeks lebih rendah pada variasi somaklonal dibanding tanaman induk/budidaya. Hal ini mengindikasikan adanya perluasan basis genetik pada variasi somaklonal (Adriana *et al.* 2010).

Perubahan genetik pada variasi somaklonal bukan disebabkan oleh segregasi atau rekombinasi gen, seperti yang biasa terjadi akibat proses persilangan, tapi karena mutasi genetik pada eksplan yang diinduksi pada kondisi *in vitro*. Tanaman variasi somaklonal mengalami mutasi atau penyimpangan sitologi sehingga muncul keragaman yang disebabkan oleh perubahan struktur kromosom, kerusakan kromosom (seperti delesi, duplikasi, inversi dan translokasi), perubahan pada metilasi kromatin dan perubahan jumlah kromosom (Delgado-Paredes *et al.*, 2017). Variasi somaklonal yang disebabkan oleh perubahan genetik akan diwariskan secara seksual ke generasi selanjutnya atau turunannya dan biasanya bersifat stabil, tetapi variasi somaklonal yang bersifat epigenetik biasanya akan hilang bila diturunkan secara seksual. Variasi somaklonal dalam kultur jaringan diinduksi oleh penggunaan zat pengatur tumbuh, seperti dari kelompok auksin 2,4-D dan 2,4,5-T, konsentrasi pemakaian ZPT, lama fase pertumbuhan kalus, dan tipe kultur yang digunakan (sel, protoplasma, kalus jaringan), kondisi pencahayaan, kelembaban dan transpirasi. Perakitan tanaman melalui variasi somaklonal telah diaplikasikan untuk memperoleh tanaman toleran terhadap kekeringan, salinitas tinggi, pH rendah atau tinggi serta ketahanan terhadap penyakit (Yunita *et al.*, 2009, Sato *et al.*, 2011).

Pusat penelitian Bioteknologi LIPI telah melakukan pengembangan varietas baru ubi kayu yang tinggi beta karoten melalui pembentukan variasi somaklonal. Varian ini, yang sebelumnya bernama FEC 25, telah

terdaftar menjadi varietas Carvita 25 (Fitriani *et al.*, 2018). Carvita 25 memiliki kandungan beta karoten hingga 21 ng/g, dan telah dimanfaatkan sebagai material untuk pembuatan tepung mocaf kaya beta karoten (Hartati *et al.*, 2012). Varietas Carvita 25 berasal dari induk ubi kayu unggul Adira IV. Ubi kayu Adira IV merupakan jenis varietas ubi kayu dengan ciri ketahanan yang cukup tinggi, buah besar, agak pahit dan berumbi putih. Pendaftaran varietas Carvita 25 didasarkan pada perubahan unik pada karakter morfologi produk tanaman hasil variasi somaklonal tersebut dibandingkan induknya. Data morfologi pada varietas Carvita 25 adalah: tipe tanaman bercabang memiliki diameter batang kecil, memiliki warna daun yang membuka sempurna yaitu hijau keunguan, memiliki bentuk umbi silindris, warna kulit umbi bagian luar yaitu coklat gelap, kulit bagian dalam pink. memiliki warna daging kuning, memiliki kadar pati berdasarkan ekstraksi 28,13, jumlah umbi per pohon $6,5 \pm 0.508$ dan memiliki umur panen 10 bulan (Hartati *et al.*, 2012). Untuk memperkaya dan melengkapi karakterisasi morfologi, maka dilakukan karakterisasi molekuler Carvita 25, terutama untuk melihat seberapa jauh perbedaan dan perubahan genetik pada Carvita 25 yang merupakan tanaman ubi kayu hasil variasi somaklonal dibandingkan tanaman asalnya yaitu Adira IV.

Identifikasi varietas tanaman sangat penting bila dihubungkan dengan pemuliaan tanaman (Mulsanti *et al.*, 2013). Teknik penanda molekuler telah terbukti menjadi alat yang kuat untuk mengidentifikasi spesies tanaman, varietas, klon, individu dan populasi (Karihaloo, 2015). Metode penanda molekuler telah banyak diterapkan untuk pengujian varietas, perbanyakan benih dan pemuliaan tanaman, selain itu pemanfaatan teknik ini juga digunakan untuk alat bantu seleksi (Mulsanti *et al.*, 2013). Berdasarkan aplikasi teknik PCR, metode teknologi penanda molekuler dibagi menjadi beberapa jenis, termasuk diantaranya *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *polymerase chain reaction* (PCR) *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) dan *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *single nucleotide polymorphisms* (SNP) dan *sequence tagged sites* (STS), *sequence characterized amplified regions* (SCAR), dan *simple sequence repeats* (SSR) (Azrai, 2006). *Simple sequence repeat*

merupakan pengulangan nukleotida tandem pendek dengan tingkat polimorfisme yang tinggi (Sharp & Hayden, 2001). Penanda SSR mudah dideteksi, sangat informatif, stabil, dan relatif murah digunakan dalam penelitian. Hasil laporan beberapa peneliti terdahulu menggunakan SSR (*Simple Sequence Repeat*) menyebutkan bahwa jumlah marka SSR pada ubikayu ada 186 (Mba *et al.*, 2001), 124 (Raji *et al.*, 2009), atau 2190 (Sraphet *et al.*, 2011). Ferguson *et al.* (2012) menggunakan data jumlah marka SSR tersebut untuk melihat redundancy/pengulangan dan menemukan bahwa jumlah SSR yang berhasil diidentifikasi tanpa pengulangan adalah sebesar 2146 marka. Artinya, ada peluang menggunakan 2146 jenis marka SSR untuk menganalisis keragaman genetik plasma nutfah ubi kayu.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkonfirmasi kestabilan morfologi Carvita 25, mendeteksi tingkat polimorfisme dan variasi molekuler ubi kayu Carvita 25 yang berasal dari variasi somaklonal Adira IV berdasarkan marka SSR dengan menggunakan 11 primer untuk melengkapi data karakter morfologi dan molekuler yang telah dilaporkan sebelumnya.

METODE

Bahan

Penelitian ini menggunakan dua varietas ubi kayu, yaitu varietas Adira IV dan Carvita 25, dengan 10 kali ulangan untuk karakter morfologi dan tiga kali pengulangan untuk analisis DNA, yaitu: Adira IV 1, Adira IV 2, Adira IV 3, Carvita 25 1, Carvita 25 2, dan Carvita 25 3. Semua bahan yang digunakan merupakan varietas ubi kayu koleksi Kebun Plasma Nutfah (KPN) Puslit Bioteknologi LIPI.

Konfirmasi Kestabilan Morfologi Carvita 25

Kestabilan karakter morfologi Carvita 25 dilakukan dengan mengamati karakter morfologi tanaman Carvita 25 di dua lokasi KPN dengan jumlah masing-masing 10 tanaman, dan dibandingkan dengan hasil pengamatan morfologi Carvita 25 dari hasil penelitian Hartati *et al.*, (2012), lalu dibandingkan dengan Adira IV. Parameter pengamatan morfologi dalam studi ini mengacu pada Hartati *et al.*, (2012) ditambah dua parameter yang lain yaitu morfologi petiole dan batang ubi kayu.

Ekstraksi DNA Ubikayu

Protokol yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah prosedur ekstraksi berbasis CTAB mengikuti metode Cold Spring Harbor (2017) yang telah dimodifikasi. Pucuk ubi kayu yang segar diambil 5 lobus daun, lalu ditransfer ke dalam tabung Eppendorf 1,5ml, ditutup tidak rapat, lalu langsung

direndam dalam nitrogen cair. Sampel kemudian digerus menggunakan pestle plastik, setelah halus ditambah 1 ml larutan buffer CTAB yang telah ditambah 2% mercapto etanol. Larutan sampel diinkubasi 1 jam pada suhu 60°C, lalu disentrifugasi pada 10000 rpm selama 5 menit untuk menghilangkan debris sel. 700 µl supernatan dimasukkan dalam tube baru, lalu ditambahkan 750 µl larutan chloroform:oktanol, 24:1, tube dikocok pelan sambil dibolak balik. Proses dilanjutkan dengan disentrifugasi pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit. Proses ekstraksi dengan chloroform:oktanol diulangi hingga total ekstraksi tiga kali, dengan volume supernatan dan chloroform:oktanol berturut-turut 700 µl /750 µl, 600 µl /650 µl, dan 500 µl /550 µl. Supernatan sebanyak 500 µl supernatan ditambah isopropanol 500µl, tube dikocok pelan sambil dibolak balik, lalu disentrifugasi pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit. Pelet yang telah dikeringkan dilarutkan dengan ddH₂O. DNA hasil isolasi selanjutnya diuji kualitas dan kuantitasnya menggunakan elektroforesis pada gel agarose 1 % dan Nanodrop 2000 spektrofotometer untuk melihat konsentrasi dan kemurniannya. Pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan protein diukur pada panjang gelombang 280 nm. Batas kemurnian yang diterima dalam analisis molekuler pada rasio A260/A280 adalah 1.8 – 2.0.

Amplifikasi DNA Dengan Primer SSR

Dua belas pasang primer (SSR digunakan untuk amplifikasi DNA ubi kayu varietas Adira IV dan Carvita 25 yang memiliki motif pengulangan sekuen tertentu seperti yang dilaporkan oleh Mba *et al.*, (2001), yaitu SSTRY 8, SSTRY 9, SSTRY 20, SSTRY 28, SSTRY 51, SSTRY 59, SSTRY 63, SSTRY 100, SSTRY 103, SSTRY 151, SSTRY 171 dan SSTRY 181 dengan sekuen primer dan TM yang tertera pada Tabel 1.

Reaksi amplifikasi dilakukan mengikuti protokol yang diusulkan oleh Mba *et al.* (2001) dengan volume akhir berisi 10 µl yang terdiri atas 1,0 µl DNA (10ng / µl); 1,0 µl 10x buffer PCR yang mengandung 20 mM MgCL₂ (Promega), 0,8 µl dNTPs (2,5 mM masing-masing), 0,25 µl polimerase TaqDNA (Promega; 5 u / µl), 1,25 µl dari primer forward dan reverse (1 µM masing-masing) dan 5,0 µl air suling.

Kondisi PCR yang digunakan mengikuti prosedur Mba *et al.*, (2001) dengan sedikit modifikasi, yakni: pra denaturasi 94 °C selama 2 menit, dilanjutkan 35 siklus meliputi denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 55°C (Tabel 1) selama 1 menit, *extention* 72°C selama 1 menit, dan terakhir *post extention* 72°C selama 5 menit. Produk PCR di visualisasikan pada gel poliakrilamid 12%. kemudian dilakukan elektroforesis selama 3 jam dan dilanjutkan dengan skoring data.

Analisis data

Setiap band diberi skor sebagai ada/hadir (1) atau absen (0) dan data yang dihasilkan dirangkai

menjadi matriks. Matriks data kemudian dianalisis menggunakan program pengolahan data molekuler PAST (Paleontological Statistics) *software* 3.2 (Hammer *et al.*, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konfirmasi kestabilan morfologi Carvita 25
Hasil identifikasi varietas Adira IV yang dirilis oleh Kementerian Pertanian menunjukkan varietas Adira IV memiliki karakter bentuk daun lonjong, warna petiole merah kehijauan pada bagian atas, dan hijau kemerahan pada bagian bawah, warna umbi putih, agak pahit, kadar pati 25-30%, protein 0,8%, HCN 68 mg/100mg, daya hasil 25-40 t/ha, dan ketahanan yang cukup tinggi pada penyakit karena tungau merah, bakteri hawar daun dan penyakit layu bakteri (Balitkabi 2004, 2005, Wargiono *et al.*, 2006). Hasil karakterisasi pada variasi somaklonal Carvita 25

menunjukkan adanya perubahan ciri-ciri morfologi. Perubahan karakter morfologi yang paling menonjol pada variasi somaklonal Carvita 25 dibanding tanaman induknya Adira IV adalah perubahan pada warna umbi dimana umbi berubah menjadi kuning, dan rasa umbi yang lebih enak/tidak pahit (Tabel 2), dan karakter ini stabil pada tiap individu yang diamati karakter morfologinya. Selain karakter tersebut, (Hartati *et al.*, (2012) melaporkan ciri lainnya, yaitu tipe tanaman bercabang, diameter batang kecil, memiliki warna daun yang membuka sempurna yaitu hijau keunguan, memiliki bentuk umbi silindris, warna kulit umbi bagian luar yaitu coklat gelap, kulit bagian dalam pink, memiliki kadar pati berdasarkan ekstraksi 28.13 %, jumlah umbi per pohon $6,5 \pm 0,508$ dan memiliki umur panen 10 bulan.

Tabel 1. Primer SSR Ubi Kayu (Mba *et al.*, 2001)

No	Nama Primer	Tipe pengulangan	Sekuen	Temperatur Anneling (°C)	Ukuran (bp)
1	SSRY 8	(CA)14CT(CA)2	F : AGTGGTTTGAGAAGACTGGTGA R : TTTCCAAAATGGAACCTCAAA	55	143
2	SSRY 9	(GT)15	F : ACAATTCATCATGAGTCATCAACT R : CCGTTATTGTTCTGGTCCT		
3	SSRY 20	(GT)14	F : CATTGGACTTCCTACAAAATGAAT R : TGATGGAAAAGTGGTTATGTCCTT	55	143
4	SSRY 28	(CT)26(AT)3AC(AT)2	F : TTGACATGAGTGATATTTCTTGAG R : GCTGCGTGCAAAAATAAAAT	55	180
5	SSRY 51	(CT)11CG(CT)11(CA)18	F : AGGTTGGATGCTTGAAGGAA R : GGATGCAGGAGTGCTCAACT	55	298
6	SSRY 59	(CA)20	F : GCAATGCAGTGAACCATCTTT R : CGTTTGTCTTTCTGATGTTT	55	158
7	SSRY 63	(GA)16	F : TCAGAAATCATCTACCTTGCA R : AAGACAATCATTTTGCTCCA	55	290
8	SSRY 100	(CT)17TT(CT)7	F : ATCCTTGCCTGACATTTTGC R : TTCGCAGAGTCCAATTGTTG	55	210
9	SSRY 103	(GA)22	F : TGAGAAGGAAAAGTCTGCAC R : CAGCAAGACCATCACCAGTTT		272
10	SSRY 151	(CT)11TT(CT)21(CA)19	F : AAGGAACACCTCTCCTAGAATCA R : CCAGCTGTATGTTGAGTGAGC	55	220
11	SSRY 181	(GA)22(G)3C(GA)3GGA A(GA)4	F : GGTAGATCTGGATCGAGGAGG R : CAATCGAAACCGACGATACA	55	199

Tabel 2. Karakter morfologi Carvita 25 dan Adira IV

No	Karakter Morfologi	Adira-4	Carvita 25
1	Warna pucuk	Hijau keunguan	Hijau keunguan
2	Warna daging umbi	Putih	Kuning
3	Bentuk umbi	Conical silindris	Silindris
4	Warna korteks	Pink	Pink
5	Warna kulit luar	Coklat tua	Coklat tua
6	Warna petiol	Merah kehijauan	Merah kehijauan
7	Distribusi antosianin di petiol	Bagian atas	Bagian atas
8	Warna kortek batang	Hijau tua	Hijau muda
9	Rasa	Agak Pahit	Enak

Perubahan fenotip tanaman yang diinduksi oleh pembentukan variasi somaklonal telah dilaporkan oleh beberapa peneliti terdahulu. Cao (2016) melaporkan perubahan fenotip daun tanaman hias *Red Flash Caladium* hasil variasi somaklonal, yaitu hilangnya bintik putih pada tanaman induk/*wild type*, dan berubah menjadi bintik merah, selain itu juga terjadi perubahan warna tulang daun dari merah menjadi hijau, ungu atau merah muda, bentuk daun yang lebih bulat dan perubahan warna pada pinggir daun. Podwyszynska *et al.*, (2006) melihat terjadi perubahan fenotip tanaman bunga tulip dari ungu menjadi ungu kemerahan karena penanaman dalam jangka lama pada media kultur thidiazuron. Manchanda *et al.*, (2018) melaporkan perubahan morfologi tanaman tebu hasil variasi somaklonal, yaitu terjadinya penambahan jumlah rumpun yang lebih banyak pada tebu hasil variasi somaklonal yang ditanam di lapang, disamping terjadinya peningkatan lingkaran atau diameter tebu dan variasi panjang ruas tebu.

Perubahan morfologi atau fenotip tanaman hasil kultur karena pembentukan variasi somaklonal sudah banyak dilaporkan, namun perlu dievaluasi lebih lanjut untuk mendapatkan keuntungan atau dampak yang lebih besar untuk pemuliaan tanaman ataupun untuk pengembangan varietas dengan karakter agronomi yang penting. Pengembangan ubi kayu variasi somaklonal Carvita 25 memberikan karakter agronomi yang penting, yaitu kandungan nutrisi beta karoten yang lebih tinggi dibanding ubi kayu biasa, dan karakter ini diperlukan untuk mendukung industri yang salah satunya adalah industri molaf kaya beta karoten dan industri produk olahan pangan tape berbata karoten.

Polimorfisme Marka Berbasis Data Mikrosatelit

Untuk memperkaya dan melengkapi karakterisasi morfologi, maka dilakukan karakterisasi molekuler Carvita 25, terutama untuk melihat seberapa jauh perubahan molekuler antara Adira IV dengan Carvita 25 yang merupakan tanaman ubi kayu hasil variasi somaklonal. Hasil amplifikasi PCR dengan SSRDNA genom Carvita 25 dan Adira IV menggunakan 11 primer SSR menghasilkan 87 total fragmen teramplifikasi, dimana 31 fragmen diantaranya adalah fragmen monomorfik dan 56 fragmen yang polimorfik. Jumlah fragmen yang teramplifikasi pada masing-masing primer sangat bervariasi seperti

terlihat pada Tabel 3. Polimorfisme yang paling tinggi terdapat pada primer SSRY 151 yaitu 85.71% atau sebanyak 6 pita fragmen dari total 7 fragmen dengan panjang basa bervariasi dari 120-600 bp. Primer dengan polimorfisme paling rendah adalah SSRY 171 yaitu 0% atau tidak terdapat polimorfisme, dan panjang basa yang teramplifikasi adalah 270-760 bp. Primer lainnya mengamplifikasi dengan tingkat polimorfisme berkisar antara 50-80%. Polimorfisme rata-rata sebesar 62,03%, dan tingkat polimorfisme ini, kecuali SSRY171, tergolong cukup tinggi karena lebih dari 50%. Menurut Poerba & Martanti (2008), bahwa primer dengan tingkat polimorfismenya yang tinggi adalah yang memiliki >50% pita polimorfik.

Perubahan genetik Carvita 25

Analisis marka yang mengalami insersi, delesi, dan monomorfik dilakukan untuk melihat perubahan genetik atau perubahan di tingkat molekuler pada variasi somaklonal Carvita 25 dibanding varietas asalnya Adira IV. Data insersi dan delesi marka genetik disajikan pada Tabel 4, yang diperoleh berdasarkan analisis kemunculan alel pada hasil skoring Carvita 25 dan Adira IV dengan menggunakan 11 primer SSRY. Insersi adalah apabila terdapat penambahan alel baru pada Carvita 25 dibandingkan dengan alel pada Adira IV yang merupakan varietas asal dari Carvita 25. Delesi didapatkan dari alel yang hilang/tidak ditemukan pada Carvita 25, sedangkan pada gen awal, terdapat pita atau alel pada Adira IV di lokus yang sama. Sebuah pita dikatakan monomorfik apabila terdapat kesamaan atau konsistensi munculnya pita pada lokus yang sama antara varietas yaitu Carvita 25 dan Adira IV (Gambar 1).

Marka yang mengalami insersi terbanyak terdeteksi pada penggunaan primer SSRY 151 dan SSRY59 yaitu sebanyak 5 alel, sementara marka yang mengalami delesi paling banyak terdeteksi pada hasil PCR yang menggunakan primer SSRY 181 yaitu 8 alel, sementara marka monomorfik paling banyak adalah pada primer SSR171 dengan 5 pita monomorfik. Total keseluruhan insersi adalah 30 alel, total keseluruhan delesi 26 alel dan total pita monomorfik 31 alel. Hal ini menunjukkan perubahan di tingkat molekuler yang cukup besar dari gen gen variasi somaklonal Carvita 25 dibanding induknya Adira IV, yang berarti adanya perubahan besar dari genetik masing-masing varietas.

Tabel 3. Total fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 11 primer SSR dan presentase fragmen polimorfik pada 6 sampel Adira IV dan Carvita 25.

No	Nama Primer	Total fragmen Teramplifikasi	Fragmen Monomorfik	Fragmen Polimorfik	Persentase Polimorfik	Kisaran panjang pita (bp)
1	SSRY 181	14	3	11	78,57%	60 – 1000
2	SSRY 151	7	1	6	85.71%	120-600
3	SSRY 103	5	1	4	80%	350-1000
4	SSRY 171	5	5	0	0 %	270-760
5	SSRY 63	6	2	4	66.67%	120 -950
6	SSRY 59	10	4	6	60%	120 – 900
7	SSRY 51	8	3	5	62.5%	50 -1000
8	SSRY 28	9	2	7	77.8%	170 – 890
9	SSRY 20	7	2	5	71,14%	120-350
10	SSRY 9	8	4	4	50%	250-500
11	SSRY 8	8	4	4	50%	275-1000
Total		87	31	56		



Gambar 1. Perubahan genetik/ditingkat molekuler variasi somaklonal Carvita 25 dibanding Adira IV menggunakan beberapa primer mikrosatelit SSRY 20 : 120-350 bp yang diindikasikan dengan hilangnya (delesi) atau pertambahan (insersi) beberapa marka pada tiap individu dari genotip ubi kayu.

Keterangan sampel: M = DNA ladder 50 bp, (1). Adira IV-1, (2). Adira IV-2, (3). Adira IV-3, (4). Carvita 25-1, (5). Carvita 25-2, (6). Carvita 25-3

Tabel 4. Variasi delesi dan insersi marka yang terdeteksi menggunakan 11 primer mikrosatelit

No.	Primer	Jumlah Alel	Insersi	Delesi	Tetap (Monomorfik)
1	SSRY181	14	3	8	3
2	SSRY171	5	0	0	5
3	SSRY151	7	5	1	1
4	SSRY103	5	2	2	1
5	SSRY63	6	2	2	2
6	SSRY59	10	5	1	4
7	SSRY51	8	2	3	3
8	SSRY28	9	4	3	2
9	SSRY20	7	3	2	2
10	SSRY9	8	2	2	4
11	SSRY8	8	2	2	4
Total		87	30	26	31

Banyaknya jumlah alel yang mengalami delesi dan adanya insersi alel baru telah menyebabkan perubahan genetik dan fenotipik pada Carvita 25, diantaranya adalah perubahan warna umbi yang berasosiasi dengan kandungan beta karoten pada umbi, dan perubahan rasa yang semula pahit pada Adira IV menjadi lebih manis pada Carvita 25. Induksi variasi somaklonal diduga menyebabkan terjadinya mutasi gen pada Carvita 25. Mutasi dapat dikelompokkan menjadi tiga kategori yaitu mutasi genom, mutasi kromosom (termasuk mutasi gen) dan mutasi di luar inti. Mutasi genom terjadi apabila satu atau lebih jumlah set kromosom mengalami perubahan. Mutasi kromosom terbagi menjadi mutasi jumlah kromosom dan struktur kromosom. Mutasi jumlah kromosom terjadi apabila jumlah kromosom bertambah atau berkurang setelah mengalami mutasi, sedangkan mutasi struktur kromosom terjadi apabila segmen kromosom mengalami pengurangan (delesi), translokasi, duplikasi atau inversi (Widiastuti *et al.*, 2013) Mutasi di luar inti terjadi apabila organel-organel di luar inti seperti DNA plastid, DNA mitokondria dan lainnya mengalami perubahan akibat perlakuan mutagenesis. Cao (2016) melaporkan hilangnya alel pada tanaman hias Red Flash Caladium disertai atau ditandai dengan hilangnya satu hingga 2 kromosom, dan ini menyebabkan perubahan fenotip tanaman hias tersebut. Mutasi yang menyebabkan pembentukan variasi somaklonal pada tanaman hasil kultur jaringan dapat diaplikasikan atau dimanfaatkan untuk pembentukan klon tanaman unggul baru yang bermanfaat untuk pengembangan bibit tahan cekaman dan untuk peningkatan produksi (Yunita, 2009).

Analisis Kesamaan

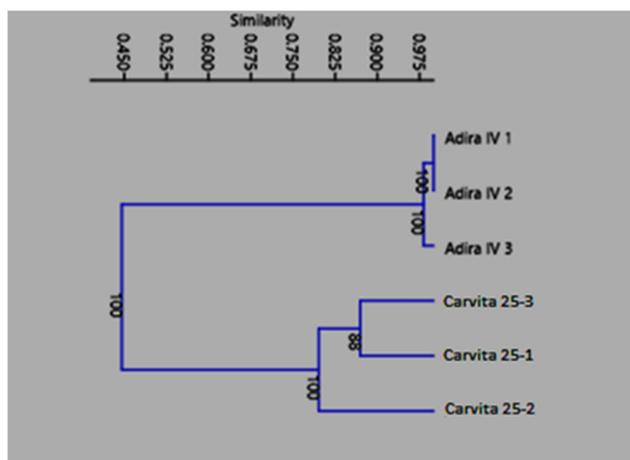
Analisis klaster dilakukan untuk melihat kesamaan genetik pada sampel ubi kayu Adira IV dan Carvita 25. Hasil analisis menunjukkan pemisahan yang jelas antara kedua varietas, dimana keduanya terpisah ke dalam dua klaster utama, yaitu klaster I terdiri dari Adira IV-1, Adira IV-2, dan Adira IV-3 dan Klaster II yaitu terdiri atas Carvita 25.2, Carvita 25.2, dan Carvita 25.3. Kemudian pada masing-masing klaster terdiri dari bagian Sub-klaster, yaitu Sub-klaster IA, IB, IIA dan IIB. Sub-klaster IA terdiri atas Adira IV-1 dan Adira IV-2 sedangkan Adira IV-3 terpisah menjadi sub-klaster IB. kemudian pada subklaster IIA terdiri dari Carvita 25-1 dan Carvita 25-3,

sedangkan Carvita 25-2 terpisah menjadi sub-klaster IIB. Hal ini menunjukkan perbedaan genetik yang jelas dan cukup jauh antara variasi somaklonal Carvita 25 dan induknya Adira IV, dimana kesamaan atau *similarity* nya berada pada nilai 0,45. Selain itu, masing-masing varietas juga mengelompok di kluster yang sama (Gambar 2). Individu pada varietas Adira 1 memiliki kesamaan genetik yang sangat tinggi, yaitu dari 0,957-1,0 (95,7-100%). Sementara antar individu pada Carvita 25 sedikit berbeda, walau nilai kesamaannya juga cukup tinggi, yaitu diatas 0,75 dari 1.

Perbedaan genetik ini juga didukung oleh nilai *Jaccard's similarity* yang cukup jauh antara Carvita 25 dan Adira IV (Tabel 5), yaitu dari 0,4-0,5. Nilai *Jaccard's similarity* dari 6 pasangan sampel ditampilkan pada Tabel 5. Pasangan yang memiliki nilai tingkat kesamaan tertinggi adalah Adira IV-1 dan Adira IV-2 dengan nilai *Jaccard's similarity* 1. Sedangkan pasangan dengan nilai *Jaccard's similarity* terendah, yaitu 0,40, adalah pasangan Carvita 25- 3 atau Carvita 25-2 atau Carvita 25-3 dengan Adira IV-1, Adira IV-2 atau Adira IV-1. Rentangan nilai yang muncul adalah 0,40-1. Hal ini menunjukkan bahwa pasangan sampel yang memiliki nilai tertinggi (1) memiliki latar belakang genetik yang sama atau identik, dan mungkin berasal dari satu populasi yang besar. Semakin *Jaccard's similarity* mendekati nilai 1, maka sampel semakin mirip atau identik. Adanya jarak kekerabatan yang jauh (mendekati 0) menandakan adanya keragaman genetik yang tinggi/jauh, dan sangat potensial untuk digunakan sebagai tetua dalam pemuliaan tanaman ubi kayu untuk menghasilkan varietas baru jika memiliki karakter agronomi yang penting. Berdasarkan analisis klaster dan *Jaccard's similarity*, baik Carvita-25 ataupun Adira IV dapat dijadikan tetua untuk pemuliaan karena nilai kesamaan keduanya adalah 0,40-0,50. Untuk pemuliaan dengan persilangan, maka tetua yang pas adalah yang memiliki nilai *Jaccard's similarity* 0,4, yaitu Carvita 25- 3 atau Carvita 25-2 dengan Adira IV-1, Adira IV-2, atau Adira IV-3 dengan Carvita-25-2. Pemuliaan tanaman dengan menggunakan tetua dengan keragaman genetik yang sama dapat menyebabkan timbulnya sifat-sifat agronomi yang tidak baik, seperti sifat rentan terhadap hama dan penyakit serta mengakibatkan produktifitas menjadi rendah (Basuki, 2018).

Tabel 5. Nilai *Jaccard's similarity* dari 6 pasangan sampel

	Carvita 25-1	Carvita 25-2	Carvita 25-3	Adira IV-1	Adira IV-2	Adira IV-3
Carvita 25-1	1.00					
Carvita 25-2	0.81	1.00				
Carvita 25-3	0.87	0.79	1.00			
Adira IV-1	0.47	0.40	0.40	1.00		
Adira IV-2	0.47	0.40	0.40	1.00	1.00	
Adira IV-3	0.46	0.40	0.50	0.98	0.98	1.00

Gambar 2. Dendrogram sampel Carvita 25 dan Adira IV menggunakan program PAST 3.2 dengan nilai *bootstrap* 1000 dan *Jaccard index similarity*

KESIMPULAN

Pengamatan morfologi Carvita 25 menunjukkan bahwa secara morfologi, karakter Carvita 25 berbeda dari karakter induknya yaitu Adira IV. Perbedaan terutama terletak pada warna daging umbi yaitu Adira IV putih, dan Carvita 25 kuning, serta rasa dimana Adira IV pahit dan Carvita 25 enak/tidak pahit), dan karakter ini stabil pada tiap individu yang diamati. Analisis tingkat polimorfisme antara Carvita 25 dan Adira IV cukup tinggi dengan rata-rata polimorfisme >50% yaitu 62,53 %, kecuali SSRY171 dengan tingkat polimorfisme 0. Berdasarkan hasil amplifikasi menggunakan sebelas primer, maka diperoleh tingkat polimorfisme paling tinggi pada amplifikasi dengan primer SSRY 151, yaitu sebesar 85.71% atau sebanyak 6 fragmen dari total 7. Variasi molekuler diamati berdasarkan variasi pola fragmen hasil amplifikasi DNA dari genom Carvita 25 dan Adira IV. Hasil analisis terhadap 87 alel dari Carvita-25 dan Adira IV menunjukkan bahwa insersi alel pada Carvita 25 adalah sebesar 30 alel, sementara delesi alel

terjadi pada 26 alel. Dan total pita monomorfik berjumlah 31 alel. Hal ini menunjukkan perbedaan yang cukup besar dari gen gen Carvita 25 dengan Adira IV yang berarti adanya perubahan besar dari genetik masing-masing varietas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari PN Pangan DIPA Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI tahun anggaran 2018. Terimakasih disampaikan kepada Hani Fitriani S.Si sebagai salah satu pemulia ubi kayu Carvita 25 dan kepada Pak Nanang Taryana, Nawawi dan Muhammad Usen untuk penyediaan material tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

Adriana RG, Mangolin CA & da Silva MMFP. 2010. Somaclonal Variation in *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae): Its Potential to Generate New Varieties and Broaden the Species's Genetic Basis. *J. Basic Appl. Genet.* **21** (1): 1-10.

- Anil VA, Bennur S & Lobo S. 2018. Somaclonal Variations for Crop Improvement: Selection for Disease Resistant Variants in Vitro. *Plant Science Today*. **5**(2): 44-54.
- Azrai M. 2006. Sinergi Teknologi Marka Molekuler dalam Pemuliaan Tanaman Jagung. *Jurnal Litbang Pertanian*. **25**(3) : 81-89.
- Balitkabi. 2004. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. Malang.
- Balitkabi. 2005. *Teknologi produksi kacang-kacangan dan umbi-umbian*. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian Malang, Kementerian Pertanian.
- Basuki TMD. 2018. *Aanlisis Keragaman Genetik Sepuluh Aksesori Cabai Merah (Capsicum annum L.) Indonesia Menggunakan Marka Random Amplified Polymorphic DNA*. [Skripsi]. Jurusan Pertanian. Fakultas Pertanian. Universitas Jendral Soedirman, Purwokerto
- Cao Z, Sui S, Cai X, Yang Q & Deng Z. 2016. Somaclonal Variation in Red Flash Caladium morphological, Cytological and Molecular Characterization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **126**(2): 269-279.
- Delgado-Paredes GE, Rojas-Idrogo C, Chaneme-Céspedes J, Floh EIS & Handro W. 2017. Development and Agronomic Evaluation of in Vitro Somaclonal Variation in Sweet Potato Regenerated Plants from Direct Organogenesis of Roots. *Asian Journal of Plant Science and Research*. **7**(1): 39-48.
- Ferguson M, Rabbi I, Jin Kim D, Gedil M, Lopez-Lavalle LAB & Okogbenin E. 2012. Molecular Markers and Their Application to Cassava Breeding: Past, Present and Future. *Tropical Plant Biol*. **5**:95–109.
- Fitriani H, Supatmi & Sudarmonowati E. 2018. *Induksi embriogenesis somatik untuk perbanyakan bibit dan perbaikan mutu genetik ubi kayu*. Dalam: Sudarmonowati E, Hartati NS, Hartati. Biodiversitas, Perakitan Klon Unggul dan Pemanfaatan bioresources ubi kayu untuk mendukung ketahanan pangan. LIPI Press, Jakarta.
- Hammer O, Tarper DAT & Ryan PD. 2001. Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaentologia Electronica*. **4** (1):9-18.
- Hartati NS, Fitriani H, Supatmi & Sudarmonowati E. 2012. Karakter umbi dan nutrisi tujuh genotip ubi kayu (*Manihot esculenta*). *Jurnal Agricola*. **2**(2): 101-110.
- Hartati, Fathoni A, Kurniawati S, Hartati NS & Sudarmonowati E. 2017. Technological Innovation in The Protection of Beta Carotene on Mocaf Production which is Rich in Beta Carotene. *Nusantara Bioscience*. **9**(1): 6-11.
- Karihaloo LJ. 2015. *DNA Fingerprinting Techniques for Plant Identification*. In: Plant Biology and Biotechnology. Springer. India
- Krishna H, Alizadeh M, Singh D, Singh U, Chauhan N, Eftekhari M & Sadh RK. 2016. Somaclonal Variations and Their Applications in Horticultural Crops Improvement. *3 Biotech*. **6**(1):54.
- Lestari EG, Dewi IS, Yunita R & Sukmadjaja D. 2010. Induksi Mutasi dan Keragaman Somaklonal untuk Meningkatkan Ketahanan Penyakit Blas Daun pada Padi Fatmawati. *Buletin Plasma Nutrafah*. **16**(2): 96-102
- Manchanda P, Kaur A & Gosal SS. 2018. *Somaclonal Variation for Sugarcane Improvement*. Dalam Gosal SS & Wani SH (eds.). *Biotechnologies of Crop Improvement*, 1: 299-326. Springer International Publishing AG.
- Mba REC, Stephensen P, Edwards K, Melzer S, Nkumbira J, Gullberg U, Apel K, Gale M, Tohme J & Fregene M. 2001. Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Survey of the Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Genome: Towards and SSR-based Molecular Genetik Map of Cassava. *Theor Appl Genet*. **102**:21–31.
- Mulsanti IW, Surahman M, Wahyuni S & Utami DW. 2013. Identifikasi Galur Tetua Padi Hibrida dengan Marka SSR Spesifik dan Pemanfaatannya dalam Uji Kemurnian Benih. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. **32** (1) : 1-8.
- Podwyszynska M, Niedoba K, Korbin M & Marasek A. 2006. Somaclonal Variation In Micropropagated Tulips Determined By Phenotype And DNA Markers. *Acta Hortic*. **714**: 211-220.
- Poerba YS & Martanti D. 2008. Keragaman genetik berdasarkan marka random amplified polymorphic DNA pada *Amorphophallus muelleri* Blume di Jawa. *Biodiversitas*. **9**(4): 245-249.

- Raji A, Anderson J, Kolade O, Ugwu C, Dixon A & Ingelbrecht I. 2009. Gene-based SSRs for cassava (*Manihot esculenta* Crantz): prevalence, polymorphisms, and cross-taxa utility. *BMC Plant Biol.* 9:118
- Sato M, Hosokawa M & Doi M. 2011. Somaclonal variation is induced de novo via the tissue culture process: a study quantifying mutated cells in Saintpaulia. *PLoS ONE.* 6:e23541.
- Sharp MJ & Hayden P. 2001. Targeted development of informative SSR (SSR) markers. *Nucleic Acids Research.* 29 (8): 44.
- Suryana A. 2006. *Kebijakan penelitian dan pengembangan ubikayu untuk agroindustri dan ketahanan pangan.* Lokarya Pengembangan Ubikayu di Balitkabi, Malang, 7-8 September 2006.
- Sraphet S, Boonchanawiwat A, Thanyasiriwat T, Boonseng O, Tabata S, Sasamoto S, Shirasawa K, Isobe S, Lightfoot D, Tangphatsornruang S & Triwitayakorn K. 2011. SSR and EST-SSR-based genetik linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet.* 122:1161–1170.
- Wargiono J, Hasanuddin A & Suyamto. 2006. *Teknologi produksi ubi kayu mendukung industri bioetanol.* Puslitbangtan. Bogor.
- Widiastuti A, Sobir M & Suhartanto R. 2013. Analisis Keragaman Genetik Manggis (*Garcinia Mangostana*) Diiradiasi Dengan Sinar Gamma Berdasarkan Penanda SSR. *Bioteknologi.* 10 (1): 15-22.
- Yunita R. 2009. Pemanfaatan Variasi Somaklonal dan Seleksi in Vitro dalam Perakitan Tanaman Toleran Cekaman Abiotik. *Jurnal Litbang Pertanian.* 28(4): 142-148.
- Zhang S, Ma P, Wang H, Lu C, Chen X, Xia Z, Zou M, Zhou X & Wang W. 2014. Genomics Approaches to Unlock the High Yield Potential of Cassava, a Tropical Model Plant. *Front. Agr. Scie. Eng.* 1(4):259-266