

ANALISIS SEBAGIAN SEKUEN DNA DARI GEN *MEISAL* PADA UBI KAYU (*Manihot esculenta* Crantz.) GENOTIPE MENGGALO DAN ROTI

Partial DNA Sequences Analysis of *Linamarase* Gene in Menggalo and Roti Cassavas (*Manihot esculenta* Crantz.)

Dewi Indriyani Roslim, Shinta Oktavia dan Herman

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau
Kampus Binawidya Km. 12,5 Pekanbaru. 28293. Riau. Telp.0761 63273 Ext.106/085313414657
[Diterima Mei 2015, Disetujui Juli 2015]

ABSTRACT

Starch metabolism involves isoamylase1 enzyme and the gene encoding of this enzyme in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) is called *meisal* gene. The study aimed to analyze partial DNA sequences of *meisal* gene on menggalo (as bitter genotype) and roti (as sweet genotype) cassavas. Cassavas were grown in the garden at Department of *Biology*, Riau University in March to June 2014 with a code MG1, MG2, and MG3 for menggalo and Ry1, Ry2, Ry3 for bread. Research methods included DNA extraction, electrophoresis, PCR, sequencing, and data analysis. Data were analyzed using BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) and MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) program version 6:06. The results showed that there were few substitution mutations in the partial DNA sequence of *meisal* gene on cassava menggalo and roti cassavas and those mutation occurred frequently in intron regions. Menggalo and roti cassavas had more Adenin (A), i.e. 34.7% and 35.2%, respectively. The ratio of (A + T) / (G + C) for the sixth cassava plants is almost the same ranging from 1.67 to 1.78. Genetic distance between the two genotypes of cassava based partial DNA sequences of *meisal* gene ranged from 0.11 to 0.21.

Keywords: *Manihot esculenta*, *Meisal* gene, Menggalo, PCR, Roti, Starch

ABSTRAK

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) merupakan tanaman yang toleran pada berbagai kondisi lingkungan dan mudah dikembangbiakan. Genotipe ubi kayu secara umum terdiri dari genotipe pahit dan tidak pahit yang salah satu penyebabnya karena kandungan pati yang tidak sama. Metabolisme pati salah satunya melibatkan enzim isoamilase yang disandikan oleh gen *isoamylase1* (*meisal*). Penelitian bertujuan menganalisis sebagian sekuen DNA dari gen *meisal* pada ubi kayu roti (genotipe tidak pahit) dan menggalo (genotipe pahit). Ubi kayu ditanam di kebun Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau pada bulan Maret-Juni 2014 dengan kode untuk ubi kayu menggalo (Mg1, Mg2, Mg3) dan roti (Ry1, Ry2, Ry3). Metode penelitian meliputi isolasi DNA, elektroforesis, PCR, sekuensing, dan analisis data. Data dianalisis menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) dan MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) versi 6.06. Hasil penelitian menunjukkan bahwa telah terjadi mutasi substitusi pada sebagian sekuen DNA dari gen *meisal* pada ubi kayu roti dan menggalo dan mutasi lebih banyak terjadi pada daerah intron. Rata-rata basa nitrogen A paling banyak ditemukan pada ubi kayu menggalo dan roti, yaitu secara berurutan 34,7% dan 35,2%. Rasio (A+T)/(G+C) untuk keenam tanaman ubi kayu hampir sama yaitu berkisar antara 1,67-1,78. Jarak genetik antara kedua genotipe ubi kayu berdasarkan sebagian sekuen DNA dari gen *meisal* berkisar 0,11-0,21.

Kata Kunci: *Manihot esculenta*, Gen *meisal*, Menggalo, PCR, Roti, Pati

PENDAHULUAN

Salah satu tanaman yang digunakan sebagai bahan baku pangan penghasil karbohidrat selain padi dan jagung adalah ubi kayu

(*Manihot esculenta* Crantz.) (BALITBANG, 2011). Di Asia Tenggara selain penghasil pangan, ubi kayu juga digunakan sebagai penghasil etanol untuk bahan bakar mobil.

Banyaknya manfaat yang dapat diambil dari ubi kayu menyebabkan tanaman ini dinobatkan oleh FAO dan PBB sebagai tanaman yang akan memacu pengembangan industri pedesaan (Baguma, 2004). Upaya pencarian produksi ubi kayu yang berkelanjutan merupakan suatu prestasi besar di bidang penelitian Botani (CIAT, 1992).

Manihot esculenta Crantz. merupakan salah satu tanaman yang mudah tumbuh, tahan berbagai kondisi lingkungan, dan mudah dikembangbiakan. Produksi ubi kayu dari tahun ke tahun mengalami peningkatan. Seperti di Provinsi Riau, produksi ubi kayu mengalami peningkatan dari tahun 2010 sampai 2012. Kondisi ini berbanding terbalik dengan produksi padi dan jagung yang mengalami penurunan (Roslim *et al.*, 2014). Tanaman *Manihot esculenta* Crantz. memiliki banyak manfaat terutama patinya yang digunakan untuk bahan baku pangan dan non pangan, beberapa industri memanfaatkan pati dari ubi kayu untuk pembuatan lem, bahan makanan, penunjang usaha peternakan, dan lain-lain (CIAT, 1992). Namun, ubi kayu memiliki senyawa-senyawa berbahaya jika dikonsumsi dalam konsentrasi yang berlebihan, yaitu asam sianida (HCN). Senyawa ini menyebabkan ubi kayu memiliki rasa pahit dan tidak pahit (Roslim *et al.*, 2014).

Konsentrasi HCN pada ubi kayu pahit dan tidak pahit berbanding terbalik dengan kadar pati. Ubi kayu pahit memiliki kadar HCN tinggi dan kadar pati rendah, ubi kayu tidak pahit memiliki kadar pati yang tinggi dan kadar HCN rendah. Ubi kayu tidak pahit bisa langsung dikonsumsi sedangkan yang pahit membutuhkan pengolahan khusus. Oleh karena itu, kadar pati dan HCN merupakan karakter penting untuk menentukan kualitas, pengolahan ubi kayu, dan keamanan dalam mengkonsumsinya (Roslim *et al.*, 2014).

Pati merupakan senyawa kompleks yang tersusun oleh monomer glukosa yang disimpan di dalam kloroplas sebagai pati transien dan *amyloplast* sebagai pati simpanan (Ball *et al.*, 1996). Pati disintesis oleh beberapa enzim seperti ADP *glucose pyrophosphorylase* (AGPase), *granule bound starch synthase* (GBSS), *starch synthase* (SS), *starch branching enzyme* (BE) dan *starch debranching enzyme* (DBE). Pada tumbuhan tingkat tinggi DBE terdiri dari dua tipe, yaitu *pullulanase* DBE (PUL) dan *isoamylase* DBE (ISA) (Nakamura *et*

al., 1996). *Isoamylase* terdiri dari tiga tipe, yaitu ISA1, ISA2, dan ISA3, masing-masing isoform *isoamylase* melakukan tindakan spesifik pada metabolisme pati (Deschamps *et al.*, 2008). Selanjutnya, Beyene *et al.*, (2010) melakukan penelitian tentang ekspresi gen telah menunjukkan bahwa enzim *isoamylase* berperan dalam diferensiasi penyimpanan serat pada akar dari tanaman *Manihot esculenta* Crantz.

Gen *isoamylase* telah diklon dari sejumlah spesies tanaman, seperti pada ubi jalar (Kim *et al.*, 2005), kacang (Takashima *et al.*, 2007) dan ubi kayu. Pada ubi kayu, enzim *isoamylase1* (ISA1) diberi nama *Meisal* yang memiliki ukuran cDNA sebesar 764 pb (Beyene *et al.*, 2010). Berdasarkan peran *isoamylase1* (*meisal*) dalam biosintesis pati ubi kayu, diduga ada perbedaan antara sekuen DNA gen *meisal* ubi kayu pahit dan tidak pahit.

Pada tahun 2014 Laboratorium Genetika Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau telah mengoleksi beberapa tanaman ubi kayu berdasarkan genotipe pahit dan tidak pahit. Ubi kayu genotipe pahit yang sudah berhasil dikoleksi diantaranya ubi kayu keriting, lurus, menggalo, pulut kuansing dan okulasi, sedangkan ubi kayu genotipe tidak pahit yang berhasil dikoleksi diantaranya ubi kayu roti, variegata, pucuk hitam, lambau, dan bangka (Roslim *et al.*, 2014).

Perbandingan sekuen DNA dari gen *meisal* pada genotipe ubi kayu menggalo dan roti belum pernah diteliti. Oleh karena itu, dengan membandingkan sekuen DNA dari gen *meisal* dari beberapa genotipe ubi kayu (menggalo dan roti) bisa menjadi langkah awal dalam menentukan perbedaan ubi kayu pahit dan tidak pahit secara genetik. Keanekaragaman ubi kayu yang terdiri dari ubi kayu pahit dan tidak pahit disebabkan karena variasi kandungan HCN dan pati. Metabolisme pati melibatkan peran enzim *isoamylase* yang disandikan oleh gen *meisal*. Sehingga, diduga terdapat perbedaan DNA dari gen *meisal* pada ubi kayu menggalo dan roti.

Penelitian bertujuan menganalisis sebagian sekuen DNA dari gen *meisal* pada ubi kayu roti (genotipe tidak pahit) dan menggalo (genotipe pahit). Dengan dilakukan penelitian ini, diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang perbedaan sekuen DNA gen *Meisal* pada ubi kayu roti yang tidak pahit dan menggalo yang pahit yang kemudian dapat

digunakan sebagai inisiasi dalam pemuliaan tanaman ubi kayu.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Kebun Jurusan Biologi dan di Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Riau, Pekanbaru dari bulan Maret 2014 sampai dengan Januari 2015.

Alat yang digunakan di dalam penelitian ini adalah cangkul dan ember untuk menanam ubi kayu. Plastik, gunting dan spidol untuk mengambil daun ubi kayu. Alat untuk isolasi, purifikasi dan amplifikasi DNA adalah plastik, mortal, pestel, gunting, spatula, pinset, tisu, tabung mikro 0,2 ml, 1,5 ml dan 50 ml, rak tabung mikro, pipet mikro berbagai ukuran, tip mikro untuk pipet mikro, sterofom, timbangan analitik, aluminium foil, *water bath*, mesin sentrifus, *hot plate*, stirer, mesin PCR, tabung PCR. Perangkat elektroforesis horizontal, sisir, cetakan gel agarose dan UV transluminator.

Bahan yang digunakan di dalam penelitian ini adalah daun muda dari ubi kayu ubi roti dan ubi menggalo yang ditanam di Kebun Jurusan Biologi Universitas Riau Pekanbaru. Bahan kimia yang digunakan untuk isolasi DNA adalah nitrogen cair, buffer CTAB (komposisi: 1M Tris HCl pH 8; 0,5 M EDTA pH 8; 5 M NaCl; 0,2% 14 M β -ME; 2% CTAB, Aquabidestilata), kloroform, isopropanol, TE (0,5 M EDTA pH 8,0 dan 1M Tris-HCl pH 8,0), etanol 70% dan akuabidestilata. Bahan untuk elektroforesis adalah 1 x TBE, etidium bromida, *loading dye*, 1,2% gel agarose, 1 kb DNA ladder (*ThermoScientific*), dan akuabidestilata steril (dH₂O). Bahan untuk amplifikasi DNA adalah 100 ug/ul DNA ubi kayu dan mix PCR (komposisi: 10x buffer PCR; 0,1 mM dNTP, 0,2 μ M Primer F, 0,2 μ M Primer R, *taq* DNA polymerase dan dH₂O).

Prosedur Penelitian

Pengolahan Tanah, Penanaman dan Pemeliharaan Tanaman

Pengolahan tanah dilakukan untuk mengemburkan tanah dan membersihkan kebun yang akan ditanami dari gulma. Pengolahan tanah dapat dilakukan dengan menggunakan cangkul. Setelah tanah diolah dan dibersihkan, selanjutnya dibuat bedengan dengan ukuran yang dikehendaki. Pembentukan bedengan agar

mempermudah dalam pemeliharaan tanaman. Penanaman dilakukan dengan cara meruncingkan ujung atas batang ubi kayu, kemudian ditanamkan sedalam ± 15 cm atau kurang lebih sepertiga batang ubi kayu tertimbun tanah. Kegiatan pemeliharaan tanaman meliputi penyiraman dan penyiangan gulma. Penyiraman bertujuan untuk menjaga kelembaban tanah. Penyiangan dilakukan dengan membuang gulma yang tumbuh di areal tanaman ubi kayu. Alat yang digunakan dalam penyiangan ini bisa berupa cangkul ataupun parang. Penyiangan harus dilakukan hati-hati agar tidak melukai tanaman ubi kayu.

Isolasi DNA Total

Setelah tanaman ubi kayu berumur dua bulan, dilakukan isolasi DNA dari daunnya menggunakan metode CTAB (Saghai-Marooof *et al.*, 1984) dengan sedikit modifikasi. Larutan DNA total yang diperoleh disimpan pada suhu -20°C sedangkan larutan DNA kerja disimpan di suhu 4°C.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR dilakukan menggunakan sepasang primer yang dirancang berdasarkan cDNA dari gen *meisa1*, yaitu *Meisa1*MB F2 (*forward*) 5'-CCG CTT TGA TCT TGC TTC TA-3' dan *Meisa1*MB R2 (*reverse*) 5'-GTT CCA TGG TTT CCT TCC TC-3' yang dirancang berdasarkan sekuen cDNA dari gen *meisa1*. Total reaksi PCR yang digunakan sebesar 50 μ L dengan komponen PCR meliputi 100 ng DNA total, 1x buffer PCR (+Mg²⁺), 0,2 mM dNTPs, 0,4 μ M setiap primer, dan 1 Unit *Taq* DNA Polymerase. Program PCR meliputi pra-PCR pada suhu 94° C selama 5 menit, diikuti 35 siklus dengan tiga tahapan yaitu denaturasi selama 1 menit, annealing selama 1 menit dan elongasi selama 1 menit 30 detik, dimana suhu masing-masing secara berurutan adalah 94° C, 48° C dan 72° C. Setelah itu pasca PCR 72° C selama 10 menit. Hasil PCR dielektroforesis untuk menentukan keberhasilan proses PCR.

Elektroforesis

DNA total dan produk PCR dielektroforesis pada 1,2% gel agarosa di dalam 1x buffer TBE, dengan tegangan 75 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis yang berupa gel diwarnai dengan 4 ul *etidium bromide*. Pita DNA divisualisasikan di atas lampu *UV tran-*

siluminator dan difoto menggunakan kamera (*Olympus SP-500 UZ*).

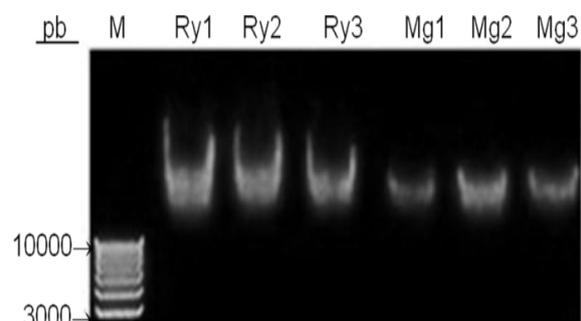
Sekuensing dan Analisis Data

Fragmen DNA diurutkan nukleotidanya (sekuensing) menggunakan primer *reverse* atau sekuensing arah satu arah pada ujung *reverse* (3') karena variasi pada ujung 3' lebih tinggi dari pada ujung 5'. Urutan basa nukleotida dianalisis menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) yang diakses dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Analisis polimorfisme nukleotida, penentuan matriks jarak genetik, dan pembuatan dendrogram digunakan program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 6.06.

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA Total

DNA total merupakan DNA genom yang diperoleh dari hasil isolasi. Isolasi DNA diawali dengan penambahan nitrogen cair untuk mempermudah penghancuran sampel daun (Ardiana, 2009). Buffer CTAB dengan 5 M NaCl membantu untuk menghilangkan polisakarida karena polisakarida dapat mengganggu mobilitas selama elektroforesis sehingga menyebabkan salah tafsir pada hasil fragmen DNA. Penambahan NaCl dengan konsentrasi di atas 1 M dapat meningkatkan kelarutan polisakarida sehingga lebih mudah dihilangkan (Fang *et al.*, 1992).



Keterangan: (M) 1 kb DNA ladder, (Ry1) Roti_1, (Ry2) Roti_2, (Ry3) Roti_3, (Mg1) Menggalo_1, (Mg2) Menggalo_2, (Mg3) Menggalo_3.

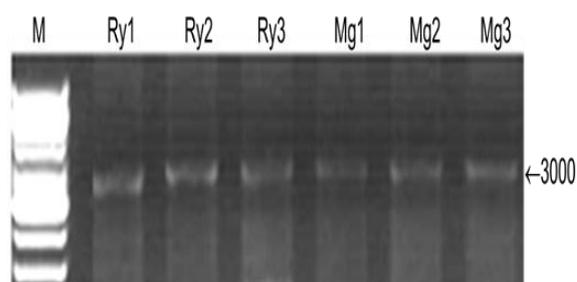
Gambar 1. Profil Pita DNA Total Ubi Kayu Menggalo dan Roti Menggunakan 1,2% Gel Agarose.

Kualitas dan kuantitas DNA hasil isolasi dicek menggunakan metode elektroforesis

menggunakan mesin Fison Mode FEC 105, *Large Horizontal Gel System*. Molekul DNA diperoleh dari enam tanaman ubi kayu yang terdiri dari dua genotipe, yaitu ubi kayu menggalo dan roti. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa DNA total dari genotipe roti dan menggalo memiliki pita yang utuh dan tebal dengan konsentrasi sekitar 500-667 ng/ μ l. Lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 1.

PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

PCR merupakan suatu proses perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme, namun dilakukan secara *in vitro* pada mesin PCR, sehingga dalam beberapa jam dapat menghasilkan ribuan bahkan jutaan fragmen DNA. Prinsip Kerja PCR sama dengan sebagaimana terjadinya pada sel hidup, yaitu melibatkan reaksi enzimatik menggunakan DNA polimerase dan terjadi secara berulang-ulang. Yang diulang adalah proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal, penempelan primer untuk mengawali replikasi DNA, dilanjutkan dengan pemanjangan primer oleh enzim DNA polimerase. Untuk melakukan kegiatan ini dibutuhkan tabung yang reponsif terhadap perubahan suhu, komponen-komponen untuk membuat reaksi PCR, dan mesin PCR yang mampu menaikkan dan menurunkan suhu dengan cepat.



Keterangan: (M) 1 kb DNA ladder, (Ry1) Roti_1, (Ry2) Roti_2, (Ry3) Roti_3, (Mg1) Menggalo_1, (Mg2) Menggalo_2, (Mg3) Menggalo_3.

Gambar 2. Profil Fragmen DNA dari Gen *Meis1* pada Ubi Kayu Menggalo dan Roti

DNA total hasil isolasi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Amplifikasi pada DNA dari keenam sampel tanaman ubi kayu menghasilkan pita DNA berukuran ± 3000 pb (Gambar 2). Kondisi ini memperlihatkan bahwa PCR berjalan dengan baik dan

bisa dilanjutkan untuk tahap selanjutnya yaitu sekuensing.

Sekuen DNA dan Analisis Pensejajaran BLAST

Sekuensing (pengurutan) DNA merupakan teknik untuk menentukan urutan nukleotida pada suatu molekul DNA. Untuk memastikan bahwa fragmen DNA yang telah diurutkan nukleotidanya merupakan bagian dari gen *meisa1* maka perlu dilakukan analisis pensejajaran menggunakan program BLASTn pada website www.ncbi.nlm.nih.gov.

Hasil analisis menunjukkan kemiripan (*ident*) sebesar 95% dengan mRNA *isoamylase* (*meisa1*) *Manihot esculenta* Crantz. dimana nilai *Query cover* 8% yang berarti bahwa terdapat 8% sekuen yang dianalisis terpakai pada sekuen yang sudah ada pada BLAST. Hasil BLAST ini membuktikan bahwa sekuen yang dianalisis benar merupakan bagian dari mRNA dari gen *meisa1* pada *Manihot esculenta* Crantz. Lebih jelasnya disajikan pada Tabel 1.

Ada beberapa parameter yang dapat dilihat, yaitu *Max score*, *Query cover*, *E-value* dan *ident*. *Max score* menunjukkan nilai kesamaan pasang basa, *Query cover* menunjukkan presentase sampel terpakai di dalam analisis BLASTn, dan *E-value* menunjukkan tingkat probabilitas secara statistik suatu item. Dari keempat parameter, yang paling akurat dilihat adalah dari *E-value*. Semakin kecil nilai *E-value* maka semakin tinggi tingkat homologinya sebaliknya semakin tinggi nilai *Max score* dan *ident* maka semakin tinggi pula tingkat homologinya (Nugraha *et al.*, 2014).

Hasil *ident* tidak mencapai 100% karena terdapatnya perbedaan di beberapa pasang basa nukleotida yang disejajarkan. Perbedaan tersebut menggambarkan adanya perbedaan dari nukleotida yang disejajarkan. Hasil pensejajaran menunjukkan bahwa gen *meisa1* pada ubi kayu roti dan menggalo memiliki kemiripan juga (*ident* 88%) dengan mRNA *isoamylase* pada *Ricinus communis* (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa gen *meisa1* dan gen *isoamylase1* *Ricinus communis* (*rcisa1*) memiliki kemiripan (*ident*) kuat sekitar 81 - 90%. Kemiripan ini tidak sama untuk jenis *isoamylase* pada isoform lain (ISA2 dan ISA3) (Beyene *et al.*, 2010). Hasil BLAST menunjukkan bahwa mRNA *isoamylase* dari *Manihot esculenta* Crantz.

menempati urutan pertama sebelum *Ricinus communis*, yang memberikan makna bahwa *Manihot esculenta* memiliki tingkat homologi yang tinggi dengan sekuen yang dianalisis dari pada dengan *Ricinus communis*.

Setelah dilakukan analisis pensejajaran dengan program BLASTn, dilanjutkan dengan analisis SNP (*Single nucleotid polymorphism*). Analisis SNP merupakan pola yang menunjukkan perubahan nukleotida di posisi tertentu pada sekuen DNA, seperti duplikasi, insersi, dan substitusi basa (Nugraha *et al.*, 2014).

Tabel 1. Hasil Pensejajaran nukleotida dari DNA Gen *Meisa1* Ubi Kayu Roti dan Menggalo Menggunakan Program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*)

Description	max score	total score	Query cover	E-value	Ident
<i>Manihot esculenta</i> Crantz. <i>Isoamylase1</i> (<i>meisa1</i>) mRNA partial cds	150	150	8%	1E-28	95%
<i>Ricinus communis isoamylase</i> , putative, Mrna	95.3	95.3	7%	2E-15	88%

Tabel 2. Posisi SNP (*Single Nucleotida Polymorphisme*) pada DNA Gen *Meisa1* dari Ubi Kayu Roti dan Menggalo

Tipe fragmen	Rentang posisi relatif fragmen (pb)	Jumlah SNP
I1	1-186	21
E1	187-282	7
I2	283-935	233
Jumlah		261

Analisis pensejajaran sekuen nukleotida memperoleh 261 SNP yang terletak pada dua daerah intron dan satu daerah ekson (Tabel 2). Sekuen DNA pada daerah intron tidak ditranslasikan sedangkan daerah ekson merupakan daerah yang ditranslasikan.

Komposisi Nukleotida pada Gen *Meisa1* Ubi Kayu (*Manihot Esculenta* Crantz).

Rata-rata basa nitrogen A paling banyak ditemukan pada ubi kayu menggalo dan roti (Tabel 3), yaitu secara berurutan 34,7% dan 35,2%. Kemudian diikuti rata-rata basa nitrogen T, yaitu ubi menggalo sekitar 28,4% dan ubi roti sekitar 27,8%. Basa nitrogen C memiliki

rata-rata 21,9% untuk ubi kayu menggalo dan 22,5% untuk ubi kayu roti. Rata-rata paling sedikit dimiliki oleh basa nitrogen G, yaitu pada ubi kayu menggalo 14,9% dan ubi kayu roti sekitar 14,6%. Dengan perbandingan tersebut dapat diketahui bahwa perbandingan jumlah basa nitrogen ubi kayu menggalo dan roti tidak berbeda jauh karena berasal dari spesies tanaman yang sama. Rasio $(A+T)/(G+C)$ untuk keenam tanaman ubi kayu hampir sama yaitu berkisar antara 1,67 - 1,78. Hal ini sesuai dengan Hukum Chargaff yang menyatakan bahwa rasio $(A+T)/(G+C)$ akan sama pada organisme yang berasal dari satu spesies dan berbeda untuk setiap spesies (Klug *et al.*, 2003).

Perbedaan komposisi nukleotida dapat disebabkan oleh berbagai macam hal terutama mutasi. Mutasi terdiri dari beberapa jenis antara lain: substitusi, insersi dan delesi. Substitusi terdiri dari dua macam yaitu substitusi transisi dan transversi. Substitusi transisi merupakan pergantian basa purin dengan basa purin lainnya (A-G) atau basa pirimidin dengan basa pirimidin lainnya (C-T). Substitusi transversi adalah pergantian basa purin dengan pirimidin atau sebaliknya (A-T; A-C; G-T; G-C). Mutasi insersi terjadi ketika adanya penyisipan satu atau lebih basa dan mutasi delesi terjadi ketika adanya kehilangan satu atau lebih basa (Faiza, 2008).

Jumlah substitusi transisi dan transversi pada ubi kayu menggalo dan roti dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5. Jumlah substitusi transisi dan transversi tertinggi terjadi pada ubi kayu roti_2, dan terendah terdapat pada ubi

Tabel 4. Substitusi Transisi pada Wilayah Gen *Meis1* dari Genotipe Ubi Kayu Menggalo dan Roti (Model *p-distance*).

Item	1	2	3	4	5
Menggalo 1					
Menggalo 2	37				
Menggalo 3	44	47			
Roti 1	54	63	55		
Roti 2	69	61	67	64	
Roti 3	64	59	54	35	64

Tabel 5. Substitusi Transversi pada Wilayah Gen *Meis1* dari Genotipe Ubi Kayu Menggalo dan Roti (Model *p-distance*).

Item	1	2	3	4	5
Menggalo 1					
Menggalo 2	62				
Menggalo 3	55	69			
Roti 1	86	114	87		
Roti 2	101	99	116	93	
Roti 3	83	97	82	65	96

Ketidakmiripan Genetik Ubi Kayu Menggalo dan Ubi Kayu Roti Berdasarkan Urutan Nukleotida dari Gen *Meis1*

Informasi ketidakmiripan genetik antara ubi kayu menggalo dan roti dapat dilihat berdasarkan matriks perbedaan nukleotida (Tabel 6). Ketidakmiripan genetik antara ubi kayu menggalo dan roti sangat rendah, yang berarti kemiripannya sangat tinggi. Jarak genetik hanya berkisar pada nilai 0,11 - 0,21. Perbedaan nukleotida tertinggi ubi kayu roti pada tanaman yang kedua (roti_2) menyebabkan posisi yang memisah dari ubi roti pada tanaman pertama (roti_1) dan ketiga (roti_3) yang jelas terlihat pada dendrogram (Gambar 4).

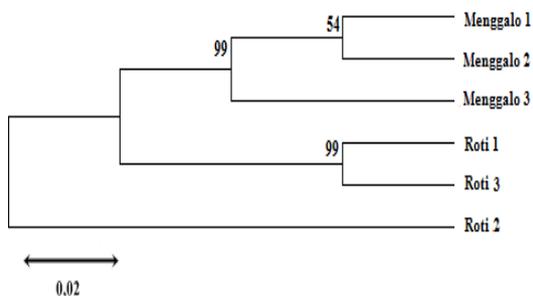
Tabel 3. Komposisi Nukleotida pada Gen *Meis1* Ubi Kayu Roti dan Menggalo Kayu Menggalo_2 dan Menggalo_3.

Item	T	C	A	G	A+T	G+C	A+T/G+C
Menggalo 1	27.8	21.8	34.7	15.7	62.5	37.5	1.67
Menggalo 2	29.4	23	33.4	14.1	62.8	37.1	1.69
Menggalo 3	28.1	21	36	14.9	64.1	35.9	1.78
Rata-rata	28.4	21.9	34.7	14.9	63.1	36.83	
Roti 1	27.6	20.9	36.2	15.3	63.8	36.2	1.76
Roti 2	28	24.2	35.1	13.8	63.1	38	1.66
Roti 3	27.8	22.4	34.3	14.7	62.1	37.1	1.67
Rata-rata	27.8	22.5	35.2	14.6	63	37.1	

Pada Gambar 4, dapat dilihat bahwa dendrogram berdasarkan sekuen nukleotida dari gen *meisa1* dianalisis menggunakan metode *Neighbour Joining* dengan *bootstrap* 500 kali. Pada penelitian ini dendrogram bertujuan untuk melihat pemisahan antara ubi kayu menggalo dengan ubi kayu roti berdasarkan sebagian sekuen DNA dari gen *meisa1*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ubi kayu menggalo_1, menggalo_2 dan menggalo_3 membentuk satu kelompok, kemudian ubi kayu roti_1 dan roti_3 membentuk satu kelompok. Kelompok ubi kayu menggalo dan roti kemudian bergabung dan diikuti dengan ubi kayu roti 2.

Tabel 6. Jarak Genetik Berdasarkan Sekuen Nukleotida Gen *Meisa1* dari Ubi Kayu Menggalo dan Roti

Item	1	2	3	4	5
Menggalo 1					
Menggalo 2	0,11				
Menggalo 3	0,11	0,13			
Roti 1	0,16	0,20	0,16		
Roti 2	0,19	0,18	0,21	0,18	
Roti 3	0,17	0,18	0,15	0,11	0,18



Gambar 4. Dendrogram Menggunakan Metode *Neighbour-Joining* dengan *Bootstrap* 500 Kali Pengulangan Berdasarkan Sekuen Nukleotida dari Gen *Meisa1* pada Tanaman Ubi Kayu dari Genotipe Roti dan Menggalo

KESIMPULAN

Penelitian ini telah memperoleh fragmen DNA dari gen *meisa1* berukuran ± 3000 pb pada ubi kayu menggalo dan roti yang diteliti. Ada 261 SNP (*Single Nucleotida Polymorphism*) pada keenam tanaman ubi kayu yang diteliti. Rata-rata basa nitrogen A paling banyak

ditemukan pada ubi kayu menggalo dan roti. Rasio (A+T)/(G+C) untuk keenam tanaman ubi kayu hampir sama yaitu berkisar antara 1,67-1,78. Jumlah substitusi transisi dan transversi tertinggi terjadi pada ubi kayu roti_2, dan terendah terdapat pada ubi kayu menggalo_2 dan menggalo_3. Kemiripan genetik antara ubi kayu menggalo dan roti sangat tinggi. Sekuen DNA gen *meisa1* dari keenam tanaman ubi kayu belum bisa memisahkan secara tegas kelompok tanaman ubi kayu menggalo dan roti.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada SIMLITABMAS DIKTI yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Fundamental tahun kedua 2015 atas nama Dr. Dewi Indriyani Roslim, M.Si.

DAFTAR PUSTAKA

Baguma, Y. 2004. Regulation of Starch Synthesis in Cassava. Tesis. Uppsala: University of Agricultural Sciences, Swedish.

Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2011. Inovasi Pengolahan Singkong Meningkatkan Pendapatan dan Diversifikasi Pangan. Departemen Pertanian, Jakarta.

Beyene, D., Y. Baguma, S. B. Mukasa, C. Sun, and C. Jansson. 2010. Characterisation and Role of Isoamylase1 (*meisa1*) Gene in Cassava. *African Crop Science Journal*, 18(1): 1-8.

Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1992. Cassava Program 1987-1991. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia

Deschamps, P., H. Moreu, A. Z. Worden, D. Dauvillee, and S. G. Ball. 2008. Early Gene Duplication within Chloroplastida and its Correspondence with Relocation of Starch Metabolism to Chloroplasts. *Genetics*, 178: 2373-2387.

Faiza, U. 2008. Karakteristik Marka Genetik DNA Mitokondria Sebagai Acuan Konversi Genetik Harimau Sumatera. Tesis Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Fang, G. S, Hammer, and R. Grumet. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Fokus*, 12: 13-15.

Kim, S. H., T. Hamada, M. Otani, and S. Takiko. 2005. Cloning and Characteri-

- zation of Sweetpotato Isoamylase Gene (IbIsa1) Isolated from Tuberos Root. *Breeding Science*, 55: 453-458.
- Klug, W. S., and M. R. Cummings. 2003. Concepts of Genetics Seven Edition. Pearson Education, Inc. United States of America.
- Nakamura, Y., T. Umemoto, Y. Takahata, K. Komae, E. Amano, and H. Satoh. 1996. Changes in Structure of Starch and Enzyme Activities Affected by Sugary Mutations in Developing Rice Endosperm. Possible Role of Starch Debranching Enzyme in Amylopectin Biosynthesis. *Plant Physiol*, 97: 491-498.
- Nugraha, F., D. I. Roslim dan Herman. 2014. Analisis Sebagian Sekuen Gen *Ferritin2* pada Padi (*Oryza sativa*) Indragiri Hulu, Riau. *Biosaintifika*, 6(2): 70-79.
- Roslim, D.I, Herman, dan N. Sofiyanti. 2014. Plasma Nutfah Ubi Kayu di Provinsi Riau. UR Press, Pekanbaru.
- Saghai-Marouf, M. A., K. M. Solimah, R. A. Jorgensen, and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA Spacer Length Polymorphism in Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location and Population Dynamics. *Proc Natl Acad Sci*, 81: 8014-8018.
- Takashima, Y., T. Senoura, T. Yoshizaki, S. Hamada, H. Ito, and H. Matsui. 2007. Differential Chain-Length Specificities of Two Isoamylase-Type Starch-Debranching Enzymes from Developing Seed of Kidney Bean.