



Karakterisasi Molekuler Gen *HAP3* pada Tanaman Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz)

Mukhamad Su'udi^{1*}, Agung Nugroho Puspito², Sattya Arimurti¹, Lailiyah Maulidatul Hasanah¹, Asyifa Yasmin Arum¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember, Jember, Indonesia

²Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Jember, Jember, Indonesia

*Corresponding Author: msuudi52@gmail.com

ABSTRACT

Cassava (Manihot esculenta Crantz) is one of the food crops that has higher resistance to dry land, so it is possible to grow it in dry land. Cassava is used as an alternative food crop to maintain world food security, because the tuber has a high carbohydrate value, is easy to plant and is able to support food diversification. Cassava in Indonesia already has several nationally superior varieties such as Adira 1 and Malang 6. The first stage of cassava breeding is knowing the characteristics of genes in these plants, one of which is HAP3. The purpose of this study was to characterize the HAP3 gene in cassava (Manihot esculenta Crantz) using a molecular approach with genomics and bioinformatics. The methods used were DNA isolation of cassava leaves of Adira 1 and Malang 6 varieties, amplification by PCR, analysis of PCR results, and data sequencing. The results showed that the HAP3 gene in cassava varieties Malang 6 and Adira 1 had 100% homology with cultivar AM560-2 in nucleotide and amino acid sequences. HAP3 cassava varieties Malang 6 and Adira 1 have the closest relationship with Hevea brasiliensis plants with a homology value of 90.91% and Ricinus communis 83.33% based on amino acid sequences. The size of HAP3 on cassava varieties Adira 1 and Malang 6 was 546 bp.

Keywords: Cassava, Drought tolerance, *HAP3*, Sequencing

Abstrak

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan salah satu tanaman pangan yang memiliki tingkat ketahanan lebih tinggi terhadap lahan kering sehingga berpotensi untuk ditanam di lahan kering. Ubi kayu dijadikan sebagai tanaman pangan alternatif untuk menjaga ketahanan pangan dunia, karena umbunya yang memiliki nilai karbohidrat tinggi, mudah ditanam dan mampu mendukung diversifikasi pangan. Ubi kayu di Indonesia telah memiliki beberapa varietas unggul nasional seperti Adira 1 dan Malang 6. Tahap pertama pemuliaan tanaman ubi kayu adalah mengetahui karakterisasi gen pada tanaman tersebut salah satunya yaitu *HAP3*. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkarakterisasi gen *HAP3* pada tanaman ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) menggunakan pendekatan molekuler secara genomik dan bioinformatika. Metode yang digunakan adalah isolasi DNA daun ubi kayu varietas Adira 1 dan Malang 6, amplifikasi dengan PCR, analisis hasil PCR, dan sekuensing data. Hasil menunjukkan gen *HAP3* pada tanaman ubi kayu varietas Malang 6 dan Adira 1 memiliki homologi 100% dengan kultivar AM560-2 pada sekuen nukleotida dan asam amino. *HAP3* ubi kayu varietas Malang 6 dan Adira 1 memiliki kekerabatan paling dekat dengan tanaman *Hevea brasiliensis* dengan nilai homologi 90,91% dan *Ricinus communis* 83,33% berdasarkan sekuen asam amino. Ukuran *HAP3* pada ubi kayu varietas Adira 1 dan Malang 6 berukuran 546 bp.

Kata Kunci : , *HAP3*, Sekuensing, Tahan kering, Ubi kayu

PENDAHULUAN

Ubi kayu merupakan tanaman yang memiliki kandungan pati yang tinggi sebagai sumber karbohidrat. Tanaman ini selain memiliki ketahanan pada kondisi kering juga mudah beradaptasi dengan perubahan iklim global, kesuburan tanah yang terus menurun dan perubahan lingkungan lainnya [1]. Ubi kayu telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan serta digunakan untuk bahan baku industri seperti MOCAF (*Modified Cassava Flour*) dan tepung tapioka yang rendah amilum namun memiliki kadar amilopektin tinggi [2,3]. Ubi kayu di Indonesia dimanfaatkan tidak hanya pada bagian umbinya saja, namun dari umbi hingga pucuk daunnya sebagai bahan pangan, bahan baku industri serta pakan ternak. Sehingga tanaman ini juga disebut dengan tanaman multifungsi. Namun, pemanfaatannya sebagai bahan pangan masih sangat rendah meskipun memiliki potensi yang cukup tinggi [4,5]. Sehingga perlu adanya peningkatan kualitas ubi kayu dan mengoptimalkan pemanfaatannya dalam masyarakat. Ubi kayu dapat ditingkatkan kualitasnya dengan meningkatkan ketahanan tanaman terhadap kondisi kering. Hal tersebut dapat meningkatkan pemanfaatan lahan kering di Indonesia yang masih sangat luas sebagai lahan tanaman pangan salah satunya ubi kayu. Kebutuhan pangan dan industri ubi kayu di Indonesia dapat lebih dioptimalkan lagi pemanfaatannya dalam masyarakat.

Ubi kayu di Indonesia telah memiliki beberapa varietas unggul nasional seperti Adira 1 dan Malang 6. Kedua varietas tersebut merupakan varietas unggul hasil persilangan yang dilakukan oleh Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi) seperti yang dideskripsikan pada Tabel 1 [6].

Ubi kayu pada umumnya digolongkan dalam tiga kategori yaitu ubi kayu manis, ubi kayu pahit agak beracun dan ubi kayu beracun. Kategori tersebut dibagi berdasarkan kandungan HCN (asam sianida) pada ubi kayu. Ubi kayu mengandung sianogenik glukosida linamarin dan lotaustralin yang dapat menghasilkan HCN yang memiliki sifat racun, apabila sel tanaman mengalami kerusakan. Tinggi rendahnya kadar HCN ditentukan oleh beberapa faktor yaitu varietas tanaman, genetik tanaman dan kesuburan tanah. Varietas nasional yang termasuk ubi kayu manis yaitu Adira 1, sedangkan varietas

Malang 6 termasuk ubi kayu pahit dan beracun karena memiliki kadar HCN pada umbi segar lebih dari 100 mgHCN/kg [7]. Sehingga ubi kayu varietas Adira 1 dalam pemanfaatannya dapat digunakan sebagai bahan pangan dan varietas Malang 6 digunakan sebagai bahan baku industri. Varietas ubi kayu yang memiliki kadar HCN tinggi tidak menjadi masalah sebagai bahan baku industri karena sebagian besar akan hilang saat proses pencucian, pemanasan, serta pengeringan [8].

Tabel 1. Deskripsi 2 varietas unggul nasional ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz)

Deskripsi	Adira 1	Malang 6
Tahun dilepas	1978	2001
Asal	Persilangan ubi kayu Mangi/Ambon, Bogor 1957	Silang tunggal dari induk betina MLG 10071 dengan jantan MLG 10032
Umur panen	7- 10 bulan	9 bulan
Tinggi batang	1- 2 m	>2 m
Warna pucuk daun	Coklat	Ungu muda
Warna tangkai daun	Merah (bagian atas) Merah muda (bagian bawah)	Hijau muda
Warna batang muda	Hijau muda	Hijau
Warna batang tua	Coklat kuning	Abu-abu
Warna kulit umbi	Coklat (bagian luar) Kuning (bagian dalam)	Putih (bagian luar), kuning (bagian dalam)
Warna daging umbi	Kuning	Putih
Rasa	Enak	Pahit
Ketahanan terhadap hama	Agak tahan tungau merah (<i>Tetranychus bimaculatus</i>)	Agak tahan tungau merah (<i>Tetranychus</i> sp.)
Ketahanan terhadap penyakit	Tahan terhadap bakteri hawar daun, <i>Pseudomonas solanacearum</i> dan <i>Xanthomonas manihotis</i>	-
Sifat adaptif	-	Adaptif terhadap hara sub-optimal

Sumber: Balitkabi, 2016

HAP (Heme Activator Protein) merupakan gen yang mengkode faktor transkripsi CCAAT dan banyak ditemukan pada promotor gen eukariotik. Gen *HAP* tersebut juga ditemukan pada yeast. Kompleks tunggal dari tiga protein yang ditemukan disebut dengan *HAP2*, *HAP3* dan *HAP5*. Sedangkan pada mamalia, ketiga komponen tersebut disebut dengan NF-Y, CBF, atau CP1. Komponen kompleks gen pengikat CCAAT pada Arabidopsis yang telah dilaporkan adalah *HAP2*, *HAP3* dan *HAP5*. Gen pada tanaman yang mengandung elemen promotor CCAAT tidak ditemukan adanya pola ekspresi gen tunggal. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen *HAP* pada tanaman memiliki peran kompleks dalam mengatur transkripsi. Pada tanaman Arabidopsis, subunit *HAP2*, *HAP3* dan *HAP5* menunjukkan terdapat banyak gen untuk masing-masing subunit, hal tersebut berbeda dengan yeast dan hewan yang hanya memiliki representasi tunggal pada setiap

subunit [9]. Penelitian lebih lanjut menunjukkan peran *HAP3/NF-YB* dalam stres kekeringan dapat membuat tanaman mampu bertahan pada kondisi kering [10]. *HAP3* (NF-YB) menyandikan domain protein H4 yang merupakan salah satu dari empat histon bersama dengan H2A, H2B dan H3. Fungsi dari histon tersebut membentuk inti nukleosom pada eukariotik. H4 bersama dengan H3 berperan dalam pembentukan nukleosom dan berfungsi dalam pewarisan struktur kromosom khusus dan kontrol aktivitas gen [11]. Asetilasi histon H4 telah banyak dilaporkan terlibat dalam mengatur pembungaan dan respon kekeringan pada tumbuhan [12].

NF-YB telah diidentifikasi mampu meningkatkan regulasi ketahanan kering pada tanaman *Arabidopsis* (*AtNF-YB1*) dan gen ortolog pada tanaman jagung (*ZmNF-YB2*) yang menghasilkan ekspresi gen yang sama. Tanaman jagung dan *Arabidopsis* transgenik yang mengekspresikan *HAP3/NF-YB* terbukti mampu bertahan pada kondisi defisit air dan pulih lebih cepat saat pemberian air setelah cekaman. Toleransi terhadap kondisi kering pada tanaman transgenik *ZmNFYB2* ditunjukkan dengan sejumlah parameter terkait stres kekeringan yang meliputi kandungan klorofil, konduktansi stomata, suhu daun, penurunan layu, dan ketahanan fotosintesis. Adaptasi terhadap stres kekeringan tersebut juga berkontribusi untuk meningkatkan hasil biji tanaman jagung pada lingkungan dengan kondisi air yang terbatas [10].

Tujuan dari penelitian ini adalah mengkarakterisasi gen *HAP3* pada tanaman ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) menggunakan pendekatan molekuler secara genomik dan bioinformatika.

METODE PENELITIAN

Koleksi sampel

Sampel ubi kayu yang digunakan dalam penelitian ini meliputi varietas Adira 1 dan Malang 6 yang diperoleh dari Balitkabi Malang. Ubi kayu ditanam pada pot dengan komposisi media tanaman tanah kompos dan pasir malang (2:1). Sekuen DNA ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) dikoleksi dari database yang tersedia pada website genom tanaman (ubi kayu) (<https://Phytozome.jgi.doe.gov>). Sekuen yang di peroleh kemudian disimpan dalam microsoft word.

Gen tahan kekeringan *HAP3* diperoleh dari koleksi pada database genom tanaman *Arabidopsis thaliana* (<https://www.arabidopsis.org>) dengan cara memasukan kata kunci “*drought tolerance*” pada bagian search website *Arabidopsis*, kemudian di cek kesesuaian dengan gen tahan kering yang terdapat pada ubi kayu dengan BLAST pada website database genom tanaman (ubi kayu) (<https://Phytozome.jgi.doe.gov>). Pemilihan gen *HAP3* dengan melihat referensi tentang ekspresi gen tersebut, dan keberhasilan di ekspresikannya pada tanaman lain. Referensi tersebut diperoleh dari database genom tanaman *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org).

Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom daun ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) dilakukan pada umur 82 HST (hari setelah tanam) menggunakan metode Kit GenEXTM (Gene All Biotechnology, Korea). Langkah pertama yang dilakukan adalah mengambil sampel daun ubi kayu dan ditimbang sebanyak 0,1 gram, kemudian digerus di atas mortar menggunakan alu dengan ditambahkan *buffer* PL sebanyak 1 ml dan RNase 3 µl. Setelah halus dan homogen, sampel diambil 500 µl dan dipindahkan pada *microtube* baru. Selanjutnya sampel diinkubasi dalam *thermoshaker* selama 15 menit pada suhu 65°C. Sampel kemudian disentrifugasi pada suhu ruang 10.000 rpm selama 1 menit. Setelah itu, diambil supernatan sebanyak 400 µl dan dipindahkan pada *microtube* baru. Supernatan kemudian ditambah *buffer* PP dan divortex agar homogen selama 15 detik. Kemudian diinkubasi pada suhu 4°C (*on ice*) untuk mengoptimalkan hasil isolasi. Selanjutnya disentrifugasi kembali pada suhu ruang, 10.000 rpm selama 1 menit 30 detik. Supernatan dibuang dan pada pellet ditambah etanol 70% sebanyak 300 µl kemudian dihomogenkan. Disentrifugasi kembali pada suhu ruang selama 1 menit 30 detik. Kemudian supernatan dibuang dan pellet dikeringkan pada desikator agar kandungan etanol 70% hilang. Tahap terakhir yaitu penambahan *buffer* RE sebanyak 50 µl kemudian diinkubasi pada *thermoshaker* 65°C

selama 20 menit untuk menghomogenkan pellet DNA dan *buffer* RE.

Amplifikasi HAP3 menggunakan PCR

Amplifikasi *HAP3* dengan panjang ampikon 546 bp menggunakan mesin PCR dilakukan dengan mereaksikan 2x PCR Master mix, dH₂O, genom DNA serta primer *forward* (5'-ATGGCGGATTCGGACAACGACTCTGG-3') dan *reverse* (5'-CTAATTAGGCCTAGAACCACTATAGC-3'). Tahap pertama yaitu membuat *cocktail*, volume *cocktail* yang dibutuhkan setiap 1 *microtube* PCR adalah 20 µl. *Microtube* PCR yang sudah berisi PCR Master mix disiapkan, kemudian PCR *microtube* ditambah primer *forward* dan *reverse* masing-masing sebanyak 1 µl, *template* DNA genom yang dimasukkan adalah 2 µl, dan 16 µl dH₂O, lalu *cocktail* dihomogenkan. Langkah-langkah tersebut dilakukan pada kondisi dingin (di atas box es). *Cocktail* dimasukkan dalam tube PCR untuk 35x siklus dan dinyalakan mesin *polymerase chain reaction* (PCR), diatur kondisinya yang meliputi pre-denaturasi suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 59°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 1 menit, 20 detik, dan *final extension* 72°C selama 5 menit.

Analisis Hasil PCR menggunakan elektroforesis

Analisis hasil amplifikasi DNA target dilakukan dengan menggunakan elektroforesis. Pertama membuat gel elektroforesis *agarose* 1,25%. Gel *agarose* dibuat dengan mencampurkan 0,625 gram *agarose* dalam 49 ml akuades steril dan 1 ml *buffer* TAE (*Tris Acetic-EDTA*) 1x di dalam tabung Erlenmeyer. Erlenmeyer kemudian dipanaskan pada *hot plate* hingga mendidih. Kemudian Erlenmeyer diangkat dan diletakkan pada suhu ruang, didiamkan hingga mencapai suhu ± 60°C (Fibriana *et al.*, 2012). Kemudian ditambahkan *Ethidium Bromide* (EtBr) sebanyak 0,5 µl ke dalam larutan *agarose*. Alat elektroforesis dipersiapkan dengan memasang set secara lengkap, dipasang sisiran untuk membentuk sumuran, kemudian gel *agarose* dituang ke dalam cetakan yang tersedia, ditunggu hingga gel memadat. Setelah memadat, sisiran kemudian dilepaskan dan

dituang 350 ml *buffer* TAE (*Tris Acetic EDTA*) 1x diatas gel sebagai *running buffer* hingga gel *agarose* terendam seluruhnya.

Sumuran yang terbentuk kemudian diisi dengan *marker* sebanyak 10 µl pada sumuran pertama dan pada sumuran selanjutnya diisi dengan sampel hasil PCR sebanyak 10 µl yang akan dianalisis DNA nya. Kabel arus negatif dan positif dipasang. Waktu yang dibutuhkan 30 menit pada 100 Volt, diatur pada alat elektroforesis. Kemudian tekan tombol *Run*, *Running* yang berhasil ditandai dengan munculnya gelembung kecil setelah itu ditunggu hingga 30 menit. Selanjutnya divisualisasi dengan meletakkan gel di atas *UV-transilluminator* untuk melihat ada tidaknya pita DNA hasil PCR.

Sekuensing DNA

Hasil amplifikasi *HAP3* kemudian disekuensing (pembacaan sekuen DNA) oleh 1st BASE Malaysia melalui PT Genetica Science. Data hasil yang diperoleh berupa kromatogram yang kemudian dianalisis menggunakan software *BioEdit*.

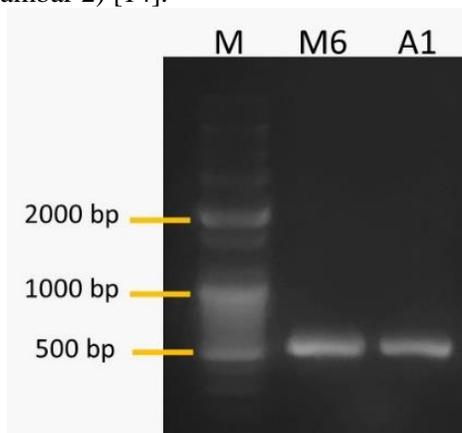
Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan cara deskripsi kualitatif. Hasil amplifikasi dari DNA target diterjemahkan menggunakan primer spesifik. Data kualitatif diperoleh dengan melihat kemunculan pita DNA target. Pita DNA hasil dari elektroforesis didokumentasikan dan dilihat ukurannya melalui perbandingan *marker* yang disertakan saat elektroforesis. Data hasil sekuensing diolah pada software *BioEdit*. Kemudian dianalisis menggunakan software BLAST pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) untuk mengetahui kesamaan urutan basa nukleotida dengan gen *HAP3* yang berada di database. Urutan basa nukleotida yang dikoleksi kemudian diterjemahkan menjadi asam amino menggunakan www.bioinformatics.org. Data basa nukleotida dan asam amino kemudian disejajarkan menggunakan software *GeneDoc* untuk mengetahui homologi nukleotida dan asam amino tiap sampel. Selanjutnya kontruksi pohon filogeni sekuen asam amino menggunakan MEGA-X (*Molecular Evolutionary*

Genetics Analysis). Program yang digunakan adalah Neighbor-Joining dengan Bootstrap 1000 kali.

HASIL PENELITIAN

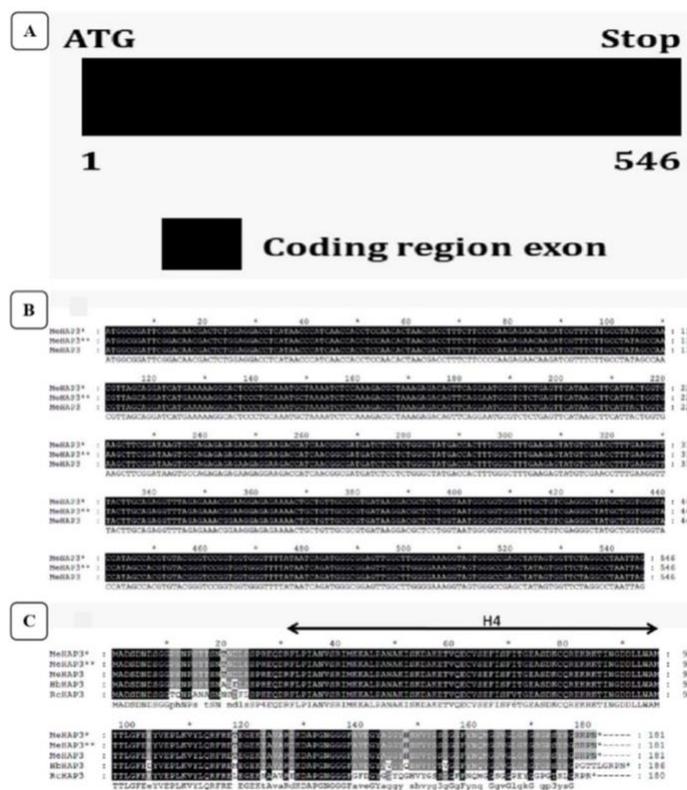
HAP3/NF-YB merupakan gen yang telah diidentifikasi mampu meningkatkan regulasi ketahanan kering pada tanaman Arabidopsis (*AtNF-YB1*) dan gen ortolog pada tanaman jagung (*ZmNF-YB2*) yang menghasilkan ekspresi gen yang sama. Tanaman jagung dan Arabidopsis transgenik yang mengekspresikan *HAP3/NF-YB* terbukti mampu bertahan pada kondisi defisit air dan pulih lebih cepat saat pemberian air setelah cekaman. Gen *HAP3* pada tanaman ubi kayu varietas Malang 6 dan Adira 1 berhasil diamplifikasi pada penelitian ini (Gambar 1). Keberhasilan amplifikasi DNA gen *HAP3* dipastikan dengan membandingkan ukuran pita DNA yang tervisualisasi dengan marker DNA ladder 100 bp Bioneer. Pita DNA *HAP3* setelah disejajarkan menunjukkan ukuran DNA pada kisaran 546 bp. Ukuran tersebut sesuai dengan ukuran *HAP3* berdasarkan desain primer yang telah dibuat dan sesuai dengan hasil PCR pada penelitian sebelumnya [13]. Gen *HAP3/NF-YB* pada ubi kayu memiliki struktur tanpa intron dan memiliki panjang 546 bp berdasarkan informasi dari GenBank *Phytozome* (Gambar 2) [14].



Gambar 1. Hasil amplifikasi PCR ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) menggunakan primer set *HAP3*, M = marker, M6 = Malang 6, A1 = Adira 1.

Gen *HAP3* pada tanaman Arabidopsis dan jagung tidak terdapat intron serta memiliki ukuran

berturut-turut 495 bp dan 558 bp (10). Ukuran *HAP3* pada tanaman Arabidopsis dan jagung tersebut hampir sama dengan ukuran *HAP3* yang terdapat pada tanaman ubi kayu kultivar AM560-2, varietas Adira 1 dan varietas Malang 6. Hasil amplifikasi PCR *HAP3* pada tanaman ubi kayu menunjukkan kesesuaian dengan tanaman yang telah dilaporkan sebelumnya, sehingga tingkat keakuratan hasil amplifikasi PCR semakin tinggi. Oleh sebab itu perlu dilakukan sekuensing untuk mengetahui sekuen *HAP3* yang berhasil diamplifikasi pada tanaman ubi kayu varietas Malang 6 dan Adira 1.



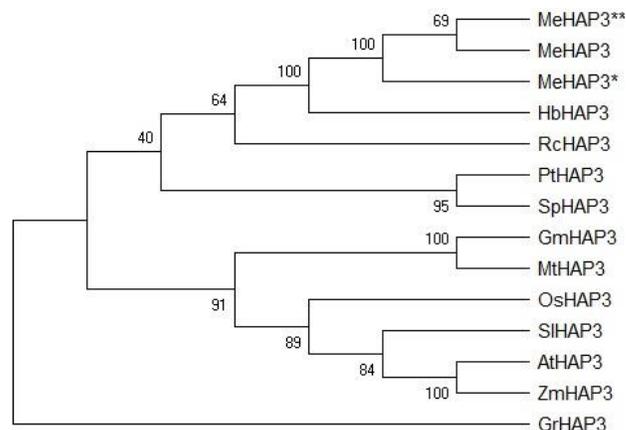
Gambar 2. A) Struktur Gen *HAP3* dan Alignment *HAP3* ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) B) Sekuen CDS ubi kayu varietas Adira 1 (Me *HAP3**), ubi kayu varietas Malang 6 (Me*HAP3***), ubi kayu kultivar AM560-2 (Me *HAP3*); C) Sekuen asam amino *HAP3* pada beberapa tanaman.

Proses analisis telah dilakukan pada beberapa tahapan dan dilanjutkan dengan analisis hasil sekuensing *HAP3*. Hasil sekuensing yang diperoleh berupa kromatogram yang kemudian diolah

menggunakan *software* BioEdit dan NCBI untuk memperoleh sekuen utuh gen *HAP3*. Setelah dianalisis diperoleh hasil sekuen dengan ukuran 546 bp. Ukuran tersebut sesuai dengan ukuran *HAP3* pada kultivar ubi kayu AM560-2 yang telah terdaftar pada GenBank dan hasil kontruksi melalui *software* *MgAlign*. Hasil sekuen DNA yang diperoleh dari varietas Malang 6 dan Adira 1 kemudian disejajarkan dengan sekuen CDS kultivar AM560-2 menggunakan GeneDoc untuk mengetahui tingkat kesamaannya. Setelah disejajarkan, hasil yang diperoleh menunjukkan tingkat kesamaan 100% pada sekuen nukleotida dan asam amino (Gambar 2).

Hasil sekuen DNA yang telah disejajarkan kemudian ditranslasi pada asam amino dan dilanjutkan dengan analisis BLAST pada NCBI dan *Phytozome* untuk mengoleksi sekuen tanaman lain yang memiliki kesamaan dengan ubi kayu varietas Malang 6 dan Adira 1. Tanaman yang berhasil dikoleksi dan memiliki kemiripan dengan sekuen *HAP3* pada ubi kayu kemudian disejajarkan untuk mengetahui kemiripan asam amino pada tiap spesies (Gambar 2).

Untuk mengetahui kekerabatan gen *HAP3* pada tanaman ubi kayu dengan tanaman lain maka diperlukan adanya analisis filogenetik dengan mengoleksi asam amino *HAP3* pada beberapa tanaman terutama pada tanaman jagung dan *Arabidopsis* yang sudah dilaporkan mampu meningkatkan toleransi terhadap cekaman kering. Konstruksi filogenetik *HAP3* menggunakan sekuen asam amino memiliki tujuan yang berkaitan dengan ekspresi gen dan tingkat homologi dari gen tersebut pada ubi kayu dengan spesies tanaman lainnya. Analisis filogenetik *HAP3* dilakukan dengan menggunakan *software* MEGA-X. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa tanaman ubi kayu berkerabat paling dekat dengan *Hevea brasiliensis* (karet) dan *Ricinus communis* (jarak) (Gambar 3).



Gambar 3. Filogenetik *HAP3* berdasarkan sekuen asam amino (Keterangan: *AtHAP3* (AT2G38880.8), *HbHAP3* (XP_021669737.1), *RcHAP3* (XP_015577020.1), *PtHAP3* (Potri.001G367500.1), *SpHAP3* (SapurV1A.0115s0270.1), *ZmHAP3* (ABC59232.1), *GmHAP3* (Glyma.02G300200.1), *OsHAP3* (Os07g41580.1), *SIHAP3* (Solyc04g054150.1.1), *GrHAP3* (Gorai.002G099900.1), *MtHAP3* (Medtr5g095740.1))

PEMBAHASAN

Keberhasilan amplifikasi DNA gen *HAP3* dipastikan dengan membandingkan ukuran pita DNA yang tervisualisasi dengan marker DNA ladder 100 bp Bioneer. Pita DNA *HAP3* setelah disejajarkan menunjukkan ukuran DNA pada kisaran 546 bp. Ukuran tersebut sesuai dengan ukuran *HAP3* berdasarkan desain primer yang telah dibuat dan sesuai dengan hasil PCR pada penelitian sebelumnya [13]. Gen *HAP3/NF-YB* pada ubi kayu memiliki struktur tanpa intron dan memiliki panjang 546 bp berdasarkan informasi dari GenBank *Phytozome* (Gambar 2a) [14].

HAP3 telah ditemukan pada tanaman *Arabidopsis*. *HAP3* memiliki peran yang beragam diantaranya yaitu, meregulasi waktu pembungaan, meningkatkan ketahanan pada kondisi kering dan berperan dalam perkembangan akar [26,21,25]. Peran *HAP3* dalam meningkatkan ketahanan tanaman pada kondisi kering yang telah dilaporkan terdapat pada tanaman *Arabidopsis* dan jagung. Pola ekspresi gen *HAP3* yang terdapat pada tanaman *Arabidopsis* (*AtNF-YB1*) melalui *quantitative* RT-PCR menunjukkan adanya peningkatan ekspresi sebanyak 12 kali lipat selama kondisi stres kekeringan. Ekspresi gen pada tanaman jagung ditunjukkan dengan perlakuan cekaman yang menunjukkan tanaman transgenik (*ZmNF-YB*)

terdapat beberapa daun yang menggulung namun tetap hijau, memiliki tingkat kelayuan lebih rendah dibandingkan dengan *wild type*, dan kemampuan pulih lebih cepat setelah diberi penyiraman Kembali [10].

HAP3 (NF-YB) memiliki domain protein H4 yang merupakan salah satu dari empat histon bersama dengan H2A, H2B dan H3. Fungsi dari histon tersebut membentuk inti nukleosom pada eukariotik. H4 bersama dengan H3 berperan dalam pembentukan nukleosom dan berfungsi dalam pewarisan struktur kromosom khusus dan kontrol aktivitas gen [11]. Asetilasi histon H4 telah banyak dilaporkan terlibat dalam mengatur pembungaan dan respon kekeringan [12].

Pensejajaran asam amino dari beberapa tanaman menunjukkan bahwa sekuen asam amino *HAP3* pada ubi kayu memiliki tingkat homologi yang tinggi dengan *RcHAP3* (*Ricinus communis* atau tanaman jarak) dan *HbHAP3* (*Hevea brasiliensis* atau tanaman karet). Persentase homologi asam amino tanaman ubi kayu dengan tanaman karet sebesar 90,91% dan tanaman jarak 83,33%. Tanaman jarak dan karet merupakan tanaman yang berada dalam satu suku dengan tanaman ubi kayu yaitu suku Euphorbiaceae. Kemiripan sekuen asam amino *HAP3* pada ubi kayu dengan tanaman jarak dan tanaman karet salah satunya karena berada dalam satu suku sehingga memiliki sekuen asam amino yang hampir sama. Karena secara morfologi suku Euphorbiaceae memiliki tingkat kesamaan pada bagian buah, yaitu tipe buah kendaga. Tipe buah kendaga menyerupai buah berbelah, namun setiap bagian buahnya masih dapat memecah lagi. *HAP3/NF-YB* dalam tumbuhan selain berperan dalam cekaman kering juga berperan dalam proses pembungaan dan perkembangan embrio, [26,27] sehingga sekuen *HAP3* pada suku Euphorbiaceae memiliki tingkat kemiripan yang tinggi pada tanaman ubi kayu, karet dan jarak. Hal tersebut juga berkaitan dengan laporan terkait domain dari *HAP3* yaitu H4 yang berperan dalam mengatur pembungaan serta respon kekeringan [12].

Peran *HAP3/NF-YB* pada toleransi kekeringan telah diidentifikasi pada tanaman jagung dan Arabidopsis. Tanaman jagung dan Arabidopsis transgenik mampu bertahan pada kondisi kering lebih baik dibandingkan dengan *wild type*. Hal tersebut ditunjukkan dengan tingkat kelayuan pada tanaman yang mengalami stres kering masih rendah dan dapat pulih lebih cepat dibandingkan dengan

wild type setelah penyiraman kembali. Tingkat kematian tanaman transgenik *AtNFYB1* dan *ZmNF-YB2* yang ditunjukkan dalam penelitian tersebut sangat rendah, sedangkan tanaman *wild type* hanya sedikit yang mampu bertahan hidup. *ZmNFYB2* juga mampu meningkatkan hasil biji jagung dengan memanfaatkan lahan kering [10].

Tingkat kekerabatan ditunjukkan dengan kedekatan jarak ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) dengan kedua tanaman tersebut pada pohon filogenetik dan tingkat homologi yang tinggi. Tingkat kekerabatan dilihat berdasarkan jarak antar spesies pada pohon filogenetik, karena metode pembuatan pohon filogenetik menggunakan *Neighbor-joining* yang tingkat kekerabatannya dilihat berdasarkan jarak antara spesies yang dihasilkan [18].

Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa *MeHAP3* berada dalam satu *clade* dengan tanaman *HbHAP3*, *RcHAP3*, *PtHAP3* dan *SpHAP3*. Keempat tanaman tersebut merupakan tanaman yang tergolong dalam satu bangsa (ordo) dengan ubi kayu yaitu Malpigiales [14]. Secara morfologi pada bagian buah ubi kayu cenderung memiliki kemiripan dengan tanaman karet (*HbHAP3*) dengan homologi asam amino sebanyak 90,91% dan tanaman jarak (*RcHAP3*) 83,33%. Kapas hitam (*PtHAP3*) memiliki homologi 81,48% dengan ubi kayu, dan memiliki kemiripan morfologi pada bagian bunga dengan *Salix purpurea* (*SpHAP3*) yang memiliki homologi 81,21% dengan tanaman ubi kayu. Sedangkan tingkat homologi tanaman ubi kayu dengan tanaman yang sudah dilaporkan yaitu Arabidopsis (*AtHAP3*) 81,91% dan jagung (*ZmHAP3*) 65,73%.

Persentase homologi yang memiliki nilai lebih dari 50% menunjukkan nilai homologi antara tanaman tersebut tinggi dan menghasilkan ekspresi gen yang sama [19]. Hasil homologi dari tanaman ubi kayu varietas Adira 1 dan Malang 6 dengan tanaman jagung dan Arabidopsis dapat menjadi informasi bahwa gen *HAP3* pada varietas ubi kayu tersebut memiliki potensi yang sama yaitu mampu meningkatkan toleransi terhadap stres kering, seperti pada tanaman yang telah dilaporkan. Sehingga dengan mengetahui sekuen nukleotida dari gen *HAP3* dapat diperoleh sekuen asam amino yang dapat dianalisis, dan dapat memberikan informasi penting terkait ekspresi gen *HAP3* pada tanaman ubi kayu varietas Malang 6 dan Adira 1.

KESIMPULAN

Gen *HAP3* pada tanaman ubi kayu varietas Malang 6 dan Adira 1 memiliki homologi 100% dengan kultivar AM560-2 pada sekuen nukleotida dan asam amino. *HAP3* ubi kayu varietas Malang 6 dan Adira 1 memiliki kekerabatan paling dekat dengan tanaman *Hevea brasiliensis* dengan nilai homologi 90,91% dan *Ricinus communis* 83,33% berdasarkan sekuen asam amino. Ukuran *HAP3* pada ubi kayu varietas Adira 1 dan Malang 6 berukuran 546 bp.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Fitriani H, Hartati NS, Sudarmonowati E. Evaluation of Adaptation and Production of Three Selected Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Peat Land Area of Central Kalimantan. *J Ilmu Dasar*. 2019;20(2):75.
- [2] Arief RW, Asnawi R, Utomo JS. Pengembangan Pemanfaatan Ubikayu Di Provinsi Lampung Melalui Pengolahan Tepung Ubikayu Dan Tepung Ubikayu Modifikasi. *Bul Palawija*. 2012;91(24):82–91.
- [3] Andarini Selian N, Ginting S. Karakteristik Mutu Fisik, Kimia, dan Fungsional Tepung Ubi Kayu dan MOCAF (Modified Cassava Flour) Characteristic Quality of Physical, Chemical, and Functional Cassava Flour and Mocaf (Modified Cassava Flour) Using Conventional Drying and Mechanical Drying Methods. *Ilmu dan Teknol Pangan JRekayasa Pangan dan Pert*. 2019;7(2).
- [4] Dewi I.N, Hapsari E. Manfaat Ubi Kayu dalam Pemenuhan Kebutuhan Hidup Petani HKM Wana Lestari I, Kecamatan Playen, Kabupaten Gunungkidul. *J Hutan Pulau-pulau Kecil*. 2019 Oct 1;3(2):136–47.
- [5] Ispandi A. Peningkatan Produksi Ubikayu di Lahan Kering rklm Kering’.
- [6] Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Balitkabi). 2016. Deskripsi Varietas Unggul Ubi Kayu 1978-2016. <http://balitkabi.litbang.pertanian.go.id/wpcontent/uploads/2016/09/ubikayu.pdf> [Diakses pada February 20, 2021]
- [7] Novi Ariani L, Estiasih T, Martati Jurusan Teknologi Hasil Pertanian -Fakultas Teknologi Pertanian -Universitas Brawijaya Jalan Veteran E, Korespondensi P. Karakteristik Sifat Fisiko Kimi Ubi Kayu Berbasis Kadar Sianida Physicochemical Characteristic Of Cassava (*Manihot utilisima*) with Different Cyanide Level. *J Teknol Pertan*. 2017;18(2).
- [8] Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Balitkabi). 2014. Varietas Unggul Ubikayu Untuk Bahan Pangan Dan Bahan Industri. <http://www.litbang.pertanian.go.id/info-teknologi/1648/> [Diakses pada March 20, 2021].
- [9] Edwards D, Murray JAH, Smith AG. Multiple Genes Encoding the Conserved CCAAT-Box Transcription Factor Complex Are Expressed in Arabidopsis [Internet]. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/117/3/1015/6102183>
- [10] Nelson DE, Repetti PP, Adams TR, Creelman RA, Wu J, Warner DC, et al. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. 2007 [cited 2022 Jun 30];104. Available from: www.pnas.org/cgi/content/full/0707193104/DC1. [www.pnas.orgcgicdoi10.1073/pnas.0707193104](https://doi.org/10.1073/pnas.0707193104)
- [11] Lu S, Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019;48. Available from: <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/mmdb/cdd/rp-sbproc>
- [12] He Y, Michaels SD, Amasino RM. Regulation of Flowering Time by Histone Acetylation in Arabidopsis. *Science* (80-). 2003;302(5651):1751–4.
- [13] Saputri, V. Y. 2021. Identifikasi Gen Tahan Kekeringan Pada Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) Melalui Analisis Genom Dan Bioinformatika. Universitas Jember.
- [14] Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, et al. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(D1):1178–86.
- [15] Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierec J, Samach A, et al. CONSTANS and the CCAAT Box Binding Complex Share a Functionally Important Domain and Interact

- to Regulate Flowering of Arabidopsis W OA. Available from: www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.106.043299
- [16] Ballif J, Endo S, Kotani M, MacAdam J, Wu Y. Over-expression of *HAP3b* enhances primary root elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem*. 2011 Jun 1;49(6):579–83.
- [17] Lee H, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):2152–6.
- [18] Dharmayanti NLPI. Filogenetika Molekuler : Metode Taksonomi Organisme. *Wartazoa*. 2011;21(30):1–10.
- [19] Baker D, Sali A. Protein structure prediction and structural genomics. *Science* [Internet]. 2001 Oct 5 [cited 2022 Jul 2];294(5540):93–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11588250/>