

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

ANALISIS FAKTOR GENETIK YANG MENGATUR BIOSINTESIS KAROTENOID PADA UBI KAYU VARIETAS CARVITA25 (*Manihot esculenta* Crantz)

SITI KURNIAWATI



PROGRAM STUDI PEMULIAAN DAN BIOTEKNOLOGI TANAMAN
FAKULTAS PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025





PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi berjudul “Analisis Faktor Genetik yang Mengatur Biosintesis Karotenoid pada Ubi Kayu Varietas Carvita25 (*Manihot esculenta* Crantz)” adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Januari 2025

Siti Kurniawati
NIM A263184112

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RINGKASAN

SITI KURNIAWATI. Analisis Faktor Genetik yang Mengatur Biosintesis Karotenoid pada Ubi Kayu Varietas Carvita25 (*Manihot esculenta* Crantz). Dibimbing oleh SUDARSONO, DIDY SOPANDIE, SINTHO WAHYUNING ARDIE, AHMAD FATHONI dan RIZA ARIEF PUTRANTO.

Karotenoid merupakan senyawa penting pada ubi kayu terutama bagi penduduk yang konsumsi hariannya hanya mengandalkan tanaman ini. Defisiensi provitamin A menjadi masalah kesehatan serius yang mendapat perhatian dunia sehingga banyak upaya biofortifikasi dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan kandungan β -karoten. Varietas ubi kayu dengan karakter warna umbi kuning mengindikasikan adanya kandungan senyawa karotenoid terutama β -karoten. Carvita25 merupakan varietas mutan somaklonal berumbi kuning dari Adira4 yang berumbi putih. Biosintesis senyawa β -karoten dipengaruhi oleh gen fungsional pada jalur karotenoid seperti *phytoene synthase* (*psy*), *phytoene desaturase* (*pds*), ζ -*carotene desaturase* (*zds*), ζ -*carotene isomerase* (*z-iso*), *carotenoid isomerase* (*crtiso*), *lycopene ϵ -cyclase* (*lycE*) dan *lycopene β -cyclase* (*lycB*). Akumulasi senyawa karotenoid pada jaringan atau organ spesifik terutama umbi dikendalikan oleh promotor dari gen yang berperan pada jalur biosintesis karotenoid. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari faktor genetik yang mempengaruhi karakter warna kuning dan akumulasi senyawa karotenoid pada umbi ubi kayu varietas Carvita25 dengan pembandingnya ubi kayu varietas Adira4 berumbi putih.

Percobaan pertama penelitian ini bertujuan untuk mempelajari profil kandungan metabolit terutama senyawa β -karoten dan metabolit lainnya pada umbi Carvita25 dan Adira4 menggunakan metode *high-performance liquid chromatography* (HPLC) dan *liquid chromatography-high resolution mass spectrometry* (LC-HRMS). Analisis kelimpahan transkrip gen menggunakan metode sekuensing RNA (*RNA-seq*) pada sampel umbi Carvita25 dan Adira4. Hasil analisis metabolomik menunjukkan adanya senyawa β -karoten pada umbi Carvita25 sebesar $\pm 22\text{--}23$ $\mu\text{g/g}$ berat basah yang signifikan tinggi dari umbi Adira4 sebesar <0.02 $\mu\text{g/g}$ berat basah yang menyebabkan perbedaan warna umbi. Senyawa 10'-apo- β -karotenal ($\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}$) dan 13-apo- β -karotenon ($\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}$) yang merupakan senyawa turunan dari β -karoten menjadi apokarotenoid teridentifikasi pada umbi Carvita25 dan tidak pada umbi Adira4. Hasil analisis sekuensing RNA menunjukkan bahwa kelimpahan gen fungsional pada jalur biosintesis karotenoid yaitu transkrip *Manes.02G081700.1* atau *Manihot esculenta Phytoene synthase 1* (*MePSY1*) lebih tinggi pada Carvita25 dibandingkan Adira4 sedangkan kelimpahan transkrip *Manes.01G124200.4* atau *Manihot esculenta Phytoene synthase 2* (*MePSY2*) lebih rendah signifikan pada Carvita25 dibandingkan Adira4 ($p < 0.05$). Pengayaan *gene ontology* (GO) menunjukkan adanya gen *cytochrome P450* (*CYP82D47*), *phytochrome B* (*PHYB*), dan beberapa faktor transkripsi seperti AP2-like, MYB, keluarga bHLH, subunit TFIID, *heat shock factor* (HSF), dan beberapa faktor transkripsi lainnya yang kelimpahan transkripsinya signifikan lebih tinggi pada Carvita25 dibandingkan Adira4 terlibat dalam proses biologi, komponen seluler dan fungsi molekuler.

Percobaan kedua melakukan karakterisasi terhadap struktur dan sekuen gen *MePSY1* antara Adira4 dan Carvita25 yang menunjukkan kelimpahan transkrip

tinggi pada Carvita25. Sekuen genom lengkap (*gMePSY1*) dan sekuen mRNA (*cMePSY1*) antara Adira4 dan Carvita25 menunjukkan adanya perbedaan basa nukleotida. Pada sekuen cds gen *MePSY1* Adira4 dan Carvita25 terdapat satu perbedaan basa nukleotida pada posisi basa ke-606 yang menyebabkan perbedaan dalam pengkodean asam amino yaitu asam aspartat pada Adira4 dan asam glutamat pada Carvita25, yang dapat berdampak pada karakteristik produk protein phytoene synthase yang dihasilkan. Sekuen gen *MePSY1* Adira4 dan Carvita25 menghasilkan asam amino dengan situs aktif yang terkonservasi. Analisis sekuen gen *MePSY1* juga dilakukan pada daerah *upstream* yaitu 5' *untranslated region* (UTR) dan daerah promoter yang dilanjutkan pada percobaan ketiga.

Percobaan ketiga dilakukan dengan tujuan untuk mempelajari dugaan motif elemen *cis-acting* (CAE) yang terdapat pada sekuen promoter gen *MePSY1* Adira4 dan Carvita25. Hasil analisis menggunakan *Plantcare* dan *PLACE* menunjukkan CAE yang berperan pada ekspresi gen spesifik jaringan, motif penting lain seperti respon terhadap cekaman, dan motif yang terlibat dalam aktivasi senyawa karotenoid seperti motif respon terhadap cahaya (*light-responsive element* /LRE). Pada Carvita25 terdapat motif yang tidak teridentifikasi pada Adira4 yaitu motif AT-1, ACGTTBOX dan SGBFGMGMAUX28. Motif AT-1 merupakan salah satu motif penting pada modulasi ekspresi gen. Promoter gen *MePSY1* asal Carvita25 dianalisis lebih lanjut pada percobaan keempat untuk mengetahui fungsi promoter gen *MePSY1* pada tanaman model tembakau cv. Petit Havana SR-1.

Percobaan keempat dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui fungsi promoter gen *MePSY1* asal ubi kayu varietas Carvita25. Dua fragmen promoter gen *MePSY1* yaitu P0PSY1 dan P1PSY1 dengan ukuran 2.671 pb dan 1.229 pb telah berhasil disambungkan dengan gen *GUS* pada vektor biner pCAMBIA.1305.1-*GUSplus-tNOS*, dan ditransformasikan ke dalam tanaman tembakau. Analisis ekspresi *GUS* dilakukan terhadap putatif tanaman tembakau transgenik generasi T0 dan T1. Ekspresi gen *GUS* teramati pada jaringan akar tanaman tembakau putatif transgenik generasi T0 umur 6 bulan yang mampu tumbuh di rumah kaca dengan konstruk promoter P0PSY1 sedangkan P1PSY1 teramati ekspresi gen *GUS* pada jaringan daun, batang dan akar. Putatif tanaman tembakau generasi T1 belum menunjukkan ekspresi gen *GUS* pada fase kecambah umur 8 hari. Pola ekspresi gen *GUS* baru teramati pada kecambah umur 1 bulan pada media MS (Murashige dan Skoog 1962) dengan perlakuan hormon sitokinin BAP di bagian berkas pengangkut daun dan batang, sedangkan pada akar tidak teramati, demikian juga pada perlakuan 50 μ M IAA dan ABA teramati pada bagian berkas pengangkut daun dan batang. Promoter P1PSY1 dengan ukuran 1.229 pb masih terdapat motif-motif yang dapat mengekspresikan gen *GUS* di bagian pembuluh daun dan jaringan *vascular*/pengangkut. Promoter P1PSY1 mengendalikan ekspresi *GUS* hanya pada bagian tertentu dan semakin jelas teramati pada waktu tertentu sehingga berfungsi sebagai promoter spasial dan temporal spesifik jaringan atau organ. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa promoter *MePSY1* dapat berperan untuk mengendalikan ekspresi gen target secara *inducible* di organ pembuluh *vascular*. Informasi variasi basa pada sekuen gen *MePSY1* dan promoternya dapat digunakan pada penelitian selanjutnya dengan tujuan perbaikan nutrisi menggunakan teknologi genome editing.

Kata kunci: apokarotenoid, β -karoten, *MePSY1*, promoter, ubi kayu, umbi akar

SUMMARY

SITI KURNIAWATI. Analysis of the Genetic Factors that Regulate Carotenoid Biosynthesis in Cassava cv. Carvita25 (*Manihot esculenta* Crantz). Supervised by SUDARSONO, DIDY SOPANDIE, SINTHO WAHYUNING ARDIE, AHMAD FATHONI dan RIZA ARIEF PUTRANTO.

Carotenoids are vital compounds in cassava, particularly for individuals who consume this crop on a daily basis. Provitamin A deficiency is a serious health problem that has received global attention, with numerous biofortification efforts having been undertaken with the aim of increasing the content of β -carotene. Cassava varieties exhibiting yellow tuber colouration are indicative of the presence of carotenoid compounds, notably β -carotene. Carvita25 is a somaclonal mutant with yellow-fleshed tubers from Adira4, which has white-fleshed tubers. The formation of β -carotene compounds is regulated by multiple functional genes in the carotenoid biosynthetic pathway, such as *phytoene synthase* (*psy*), *phytoene desaturase* (*pds*), *Z-carotene isomerase* (*z -iso*), *lycopene ϵ -cyclase* (*lycE*) and *lycopene β -cyclase* (*lycB*). The accumulation of carotenoid compounds in specific tissues or organs, especially cassava tubers, is driven by promoters of genes that play a role in the carotenoid biosynthesis pathway. The aim of this research was to study the factors affecting the yellow colour character and the accumulation of carotenoid compounds in Carvita25 tubers, comparing this to the Adira4, which has white tubers.

The primary objective of the present study was to investigate the metabolite profile, with a particular focus on β -carotene compounds and other metabolites, in Carvita25 and Adira4 tubers. This investigation employed high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) methods to analyse the metabolite content. Additionally, RNA sequencing (RNA-seq) was utilised to assess the gene transcript abundance in Carvita25 and Adira4 tuber samples. The results of the metabolomic analysis showed the presence of β -carotene compounds in Carvita25 tubers at $\pm 22\text{--}23\text{ }\mu\text{g/g}$ wet weight, which was significantly higher than Adira4 tubers at $<0.02\text{ }\mu\text{g/g}$ wet weight, which caused differences in tuber colour. The analysis identified the presence of 10'-apo- β -carotenal (C₂₇H₃₆O) and 13-apo- β -carotenone (C₁₈H₂₆O), which are derivative compounds from β -carotene to apocarotenoids, in Carvita25 tubers but not in Adira4 tubers. Furthermore, RNA sequencing analysis revealed that the abundance of functional genes in the carotenoid biosynthesis pathway, specifically Manes.02G081700.1, also known as *Manihot esculenta Phytoene synthase 1* (*MePSY1*) transcript, was higher in Carvita25 than Adira4, while the abundance of Manes.01G124200.4, or *Manihot esculenta Phytoene synthase 2* (*MePSY2*) transcript, was significantly lower in Carvita25 than Adira4 ($p < 0.05$). Gene ontology (GO) enrichment revealed the presence of *cytochrome P450* (*CYP82D47*), *phytochrome B* (*PHYB*), and several transcription factors such as AP2-like, MYB, bHLH family, TFIID subunit, heat shock factor (HSF), and several other transcription factors involved in biological processes, cellular components, and molecular functions.

The second experiment examined the structure and sequencing of the *MePSY1* gene between Adira4 and Carvita25, revealing a high transcript quantity

in Carvita25. Adira4 and Carvita25 have nucleotide variations that affect their whole genomic sequence (*gMePSY1*) and mRNA sequence (*cMePSY1*). There is one nucleotide difference at the 606th base position in the cds sequence of the *MePSY1* gene, Adira4 and Carvita25, which causes a difference in amino acid encoding, namely aspartic acid in Adira4 and glutamic acid in Carvita25, which can affect the properties of the phytoene synthase protein product produced. The *MePSY1* gene sequence in Adira4 and Carvita25 encodes amino acids with conserved active sites. The upstream region, specifically the 5' untranslated region (UTR) and the promoter region, was also analyzed in the third experiment.

The third experiment was designed to investigate the putative cis-acting element (CAE) motifs found in the promoter regions of the *MePSY1* Adira4 and Carvita25 genes. Plantcare and PLACE analyses revealed CAEs involved in tissue-specific gene expression, as well as other essential motifs like as stress response and light-responsive element (LRE) motifs involved in carotenoid compound activation. Carvita25 has motifs that have not been discovered in Adira4, including the AT-1, ACGTTBOX, and SGBFGMGMAUX28. The AT-1 motif is one of the most important motifs for controlling gene expression. The *MePSY1* gene promoter from Carvita25 was further examined in the fourth experiment to evaluate its functions in tobacco model plants cv. Petit Havana SR-1.

The fourth experiment aimed to determine the function of the *MePSY1* gene promoter from the cassava variety Carvita25. Two promoter fragments of the *MePSY1* gene, P0PSY1 and P1PSY1, with sizes of 2,671 pb and 1,229 pb, were successfully spliced with the *GUS* gene in the binary vector pCAMBIA.1305.1-GUSplus-tNOS and transformed into tobacco plants. *GUS* expression analysis was performed on putative T0 and T1 generation transgenic tobacco plants. The expression of *GUS* was detected in the root tissue of 6-month-old T0 generation putative transgenic tobacco plants grown in a greenhouse with the promoter construct P0PSY1, whereas P1PSY1 *GUS* gene expression was detected in the leaf, stem, and root tissues. At the 8-day-old sprout phase, putative T1 tobacco plants showed no *GUS* expression. *GUS* expression patterns were only observed in 1-month-old sprouts on MS media (Murashige and Skoog 1962) with cytokinin hormone BAP treatment in the leaf and stem transport bundles, while the roots were not observed. Additionally, 50 μ M IAA and ABA treatment was observed in the leaf and stem transport bundles. The P1PSY1 promoter, with a size of 1,229 pb, was found to be capable of expressing the *GUS* in leaf vessels and vascular/transporting tissues. The P1PSY1 promoter has been shown to control *GUS* expression in specific parts of the plant and is more clearly observed at certain times, thus functioning as a tissue- or organ-specific spatial and temporal promoter. The results of this study indicate that the *MePSY1* promoter can play a role in the inducible control of target genes in vascular organs. Information pertaining to base variations in the *MePSY1* gene sequence and promoter may be utilised in further research to improve nutrition through the application of genome editing technology. Keywords: apocarotenoid, β -karoten, cassava, *MePSY1* promoter, tuberous root



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2025

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB



ANALISIS FAKTOR GENETIK YANG MENGATUR BIOSINTESIS KAROTENOID PADA UBI KAYU VARIETAS CARVITA25 (*Manihot esculenta* Crantz)

SITI KURNIAWATI

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor pada
Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman

**PROGRAM STUDI PEMULIAAN DAN BIOTEKNOLOGI TANAMAN
FAKULTAS PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tertutup Disertasi:

1. Prof. Dr. Dewi Sukma, S.P., M.Si.
2. Dr. Ima Mulyama Zainuddin, S.Si., M.Si.

Promotor Luar Komisi Pembimbing pada Sidang Promosi Disertasi:

1. Prof. Dr. Dewi Sukma, S.P., M.Si.
2. Dr. Ratih Asmana Ningrum, S.Si., M.Si.



Judul Disertasi : Analisis Faktor Genetik yang Mengatur Biosintesis Karotenoid pada Ubi Kayu Varietas Carvita25 (*Manihot esculenta* Crantz)

Nama : Siti Kurniawati
NIM : A263184112

@Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Ir. Sudarsono, M.Sc.

Pembimbing 2:
Prof. Dr. Ir. Didy Sopandie, M.Agr.

Pembimbing 3:
Dr. Sintho Wahyuning Ardie, SP, M.Si.

Pembimbing 4:
Dr. Ahmad Fathoni, M.Eng.

Pembimbing 5:
Dr. Riza Arief Putranto, DEA.

Diketahui oleh

Ketua Program Studi
Dr. Ir. Yudiwanti Wahyu EK, M.S.
NIP.196311071988112001

Dekan Fakultas Pertanian
Prof. Dr. Ir. Suryo Wiyono, M.Sc.Agr.
NIP. 196902121992031003

Tanggal Sidang:
11 Desember 2024

Tanggal Pengesahan: 15 JAN 2025

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* atas segala karunia dan kasih sayang-Nya sehingga karya ilmiah dengan judul Analisis Faktor Genetik yang Mengatur Biosintesis Karotenoid pada Ubi Kayu Varietas Carvita25 (*Manihot esculenta* Crantz) telah berhasil diselesaikan.

Ungkapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Sudarsono, M.Sc., Prof. Dr. Didy Sopandie, M.Agr., Dr. Sintho Wahyuning Ardie, S.Si, M.Si., Dr. Ahmad Fathoni, M.Eng. dan Dr. Riza Arief Putranto, D.E.A selaku komisi pembimbing yang telah banyak memberikan arahan dan masukan dalam penelitian ini, serta (Almh) Dr. Nurul Khumaida, M.Agr. yang telah banyak memberi saran dan pendampingan di awal penulisan dan perencanaan penelitian, semoga hasil penelitian ini menjadi amal jariyah.

Dr. Syamsidah Rahmawati dan Dr. Puspita Lisdiyanti selaku Kepala Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI yang telah memberi ijin untuk melanjutkan studi melalui skema *degree by research*, Dr. Ratih Asmana Ningrum, S.Si., M.Si selaku Kepala Pusat Riset Rekayasa Genetika BRIN, Dr. Iman Hidayat dan Dr. Andes Hamuraby Rozak, M.Sc selaku Kepala Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan BRIN atas dukungan pendanaan DIPA ORHL melalui skema DBR pada Rumah Program ORHL. Prof. Dr. Dewi Sukma, S.P., M.Si. yang telah berkenan menjadi penguji luar komisi pada ujian tertutup dan sidang promosi, Dr. Ima Mulyama Zainuddin, S.Si., M.Si yang telah berkenan menjadi penguji luar komisi pada ujian tertutup dan Dr. Ratih Asmana Ningrum, S.Si., M.Si yang telah berkenan menjadi penguji luar komisi pada sidang promosi. Prof. Dr. Ir. Darda Efendi dan Dr. N. Sri Hartati yang telah bersedia menjadi penguji pada ujian lisan. Dr. Ir. Yudiwanti Wahyu EK, M.S. selaku ketua prodi PBT yang telah banyak membantu dalam penyelesaian program doktor, kesekretariatan prodi PBT dan dekanat, Bu Neng, Bu Mimin dan Bu Ana untuk semua bantuan administrasi selama perkuliahan dan penyelesaian studi.

Pencapaian menuntut ilmu hingga jenjang doktor ini, saya persembahkan untuk kedua orang tua, Bapak (alm) Djoemani dan Mamah (almh) Siti Aminah, semoga Allah mengangkat derajat kalian bersama orang-orang berilmu. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada suami tercinta Ayah Misran, S.Sos., M.M dan anak-anak tercinta Sidiq Maulana, Luluk Yumna Noor Farida, Fitri Ramadani Zakiyah, serta seluruh keluarga besar, Teh Nung, Mas Tri, Latifah, Aidal, Mas Teguh, Mba Ida, Salsa, Faris, dan Biyan atas segala doa dan curahan kasih sayangnya.

Dr.rer.nat. Dwi Setyo Rini, M.Si. yang telah memberikan bantuan pendanaan analisis, Dr. Aniversari Apriana untuk semua bantuan tenaga dan pemikiran serta Eva Erdayani, Ph.D. untuk fasilitas dalam menyelesaikan penulisan. Prof. Dr. Enny Sudarmonowati dan Dr. N. Sri Hartati atas bimbingan dan arahnya dalam melakukan penelitian pada komoditas ubi kayu. Hariyatun, M.Si dan Dr. Agus Rahmat untuk bantuan bahan, peralatan penelitian dan kerja samanya, Nanang Taryana dan Nawawi yang telah membantu pada penyediaan bahan tanaman selama penelitian. Rekan-rekan di kelompok riset sistem pemuliaan cepat tanaman, Pak Toto, Mas Dani, Mas Aqwin, Mba Wening, Nadia dan Amalia. Rekan-rekan di kelompok riset interaksi tumbuhan dan lingkungan, Mas Muchdar Davis, Mba Risma dan Mba Hartati untuk dukungan dan kerjasamanya. Rekan-rekan di Pusat

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Riset Rekayasa Genetika dan ex Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Rekan-rekan seperjuangan PBT angkatan 2018/2019 yang telah menyelesaikan studi doktoralnya, program *degree by research* LIPI tahun 2019, serta rekan-rekan yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Terima kasih atas semua perhatian, bantuan dan dukungan semangatnya. Kalian akan selalu ada di hati saya.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, Januari 2025

Siti Kurniawati

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Ruang Lingkup Penelitian	4
1.4 Kebaruan (<i>Novelty</i>)	6
1.5 Hipotesis	6
II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Tanaman Ubi Kayu (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	7
2.2 Ubi Kayu Varietas Carvita25	8
2.3 Senyawa Karotenoid Tanaman dan Turunannya Apokarotenoid	9
2.4 Studi Metabolomik dan Transkriptomik pada Ubi Kayu dan Tanaman lainnya	11
2.5 Promoter dalam Pemuliaan Tanaman	13
III ANALISIS TRANSKRIPTOMIK DAN METABOLOMIK UBI KAYU VARIETAS ADIRA4 DAN CARVITA25	15
3.1 Abstrak	15
3.2 Pendahuluan	16
3.3 Bahan dan Metode	17
3.4 Hasil dan Pembahasan	20
3.5 Simpulan	31
IV ISOLASI DAN KARAKTERISASI GEN <i>MePSY1</i> ASAL VARIETAS ADIRA4 DAN CARVITA25	33
4.1 Abstrak	33
4.2 Pendahuluan	34
4.3 Bahan dan Metode	35
4.4 Hasil dan Pembahasan	38
4.5 Simpulan	50
V ISOLASI DAN KARAKTERISASI PROMOTER GEN <i>MePSY1</i> ASAL UBI KAYU ADIRA4 DAN CARVITA25	51
5.1 Abstrak	51
5.2 Pendahuluan	52
5.3 Bahan dan Metode	53
5.4 Hasil dan Pembahasan	54
5.5 Simpulan	60
VI ANALISIS FUNGSI PROMOTER GEN <i>MePSY1</i> ASAL UBI KAYU PADA TANAMAN TEMBAKAU TRANSGENIK	61
6.1 Abstrak	61
6.2 Pendahuluan	62
6.3 Bahan dan Metode	63
6.4 Hasil dan Pembahasan	66
6.5 Simpulan	74



VII	PEMBAHASAN UMUM	75
VIII	SIMPULAN DAN SARAN	80
8.1	Simpulan	80
8.1	Saran	80
	DAFTAR PUSTAKA	81
	LAMPIRAN	98
	RIWAYAT HIDUP	107

Hak Cipta milik IPB University

DAFTAR TABEL

1	Sekuen primer hasil perancangan yang digunakan dalam kegiatan penelitian untuk validasi ekspresi	20
2	Karakteristik daun dan umbi ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	20
3	Ringkasan pembacaan data transkriptom dari sampel umbi ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	25
4	Variasi basa nukleotida pada daerah gen <i>phytoene synthase</i> antara ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	31
5	Matriks persentase identitas homologi <i>full-length</i> genom gen <i>MePSY1</i> dari ubi kayu varietas Adira4, Carvita25 dan aksesori rujukan AM560-2	40
6	Elemen <i>cis-regulatory</i> pada daerah 5'UTR gen <i>MePSY1</i> antara ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	41
7	Posisi basa nukleotida pada sekuen genome dan cds gen <i>MePSY1</i> asal ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	41
8	Matriks persentase identitas homologi sekuen <i>full-length</i> CDS gen <i>MePSY1</i> antara Adira4, Carvita25 dan aksesori rujukan AM560-2	42
9	Daftar variasi basa nukleotida pada gen <i>MePSY1</i> antara ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	42
10	Daftar posisi residu situs aktif pada gen <i>MePSY1</i> antara ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	45
11	Prediksi <i>Gene Ontology</i> (GO) antara gen <i>MePSY1</i> ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	48
12	Matriks persentase identitas homologi sekuen promotor PPSY1 antara ubi kayu varietas Adira4, Carvita25 dan aksesori rujukan AM560-2	55
13	Daftar putatif elemen <i>cis-acting</i> (CAE) diidentifikasi pada promotor p <i>MePSY</i> secara <i>in silico</i> menggunakan PlantCARE (PC) dan PLACE (P) antara ubi kayu varietas Adira4 (A4) dan Carvita25 (C25)	56
14	Sekuen primer yang digunakan dalam kegiatan amplifikasi promotor gen <i>MePSY1</i>	63
15	Hasil transformasi tanaman tembakau menggunakan bantuan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain LBA4404 yang membawa konstruk promotor P0PSY1 dan P1PSY1	69

DAFTAR GAMBAR

1	Diagram alir penelitian disertasi yang terdiri dari empat rangkaian percobaan	5
2	Tegakan tanaman ubi kayu	7
3	Tanaman ubi kayu varietas Carvita25 (A) dan varietas Adira4 (B), warna daun (C) dan daging umbi (D) dari dua varietas ubi kayu Adira4 (kiri) dan Carvita25 (kanan)	9
4	Jalur biosintesis karotenoid dan apokarotenoid pada tanaman (Sathasivam <i>et al.</i> 2021 modifikasi)	11
5	Konversi all-trans- β -karoten melalui perantara 9-cis- β -apo-10'-carotenal menjadi prekursor SL 9-cis- β -carotene	11

Skema struktur promotor terdiri dari situs pengikatan faktor transkripsi dan kotak TATA langsung menuju ke situs awal transkripsi (transcription start site/TSS) dan unit transkripsi (ekson dan intron)	13
Profil <i>total ion chromatogram</i> (TIC) hasil LC-HRMS pada sampel umbi ubi kayu varietas Adira4 (atas) dan Carvita25 (bawah)	21
Diagram venn jumlah metabolit pada umbi ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	21
Diagram <i>pie</i> kandungan senyawa kimia yang terdapat pada umbi ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	22
Analisis pengayaan GO yang menampilkan 25 <i>GO-term</i> pertama dengan pengayaan paling signifikan pada sampel ubi kayu Adira4 (A) dan Carvita25 (B)	23
Senyawa apokarotenoid yang terdeteksi pada sampel umbi varietas Carvita25	24
<i>Volcano plot</i> dari di set data umbi ubi kayu Carvita25 terhadap Adira4 yang mengalami perbedaan kelimpahan transkrip	26
<i>Principal Component Analysis</i> (PCA) menunjukkan hubungan transkriptom antara ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25 berdasarkan transkrip yang terdeteksi pada sampel umbi (FPKM>1). Pengelompokan berdasarkan replikasi genotipe dan pemisahan antara genotipe divisualisasikan oleh PC1 vs PC2	27
Pengayaan <i>Gene Ontology</i> (GO) pada kategori <i>biological process</i> (BP), <i>cellular component</i> (CC) dan <i>molecular function</i> (MF) dari 515 gen yang diekspresikan secara berbeda. Hasilnya disajikan dalam dua gambar: (A) Pengayaan gen yang kelimpahannya tinggi pada Carvita25 terhadap Adira4, dan (B) Pengayaan gen yang kelimpahannya turun pada Carvita25 terhadap Adira4	28
Representasi diagram <i>heat map</i> kelimpahan transkrip gen terkait biosintesis karotenoid pada umbi ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25 berdasarkan data sekuensing RNA (A), dan gen-gen fungsional pada jalur metabolisme karotenoid yang menunjukkan perbedaan kelimpahan transkrip pada ubi kayu Adira4 dan Carvita25 (B). Kolom dan baris mewakili sampel dan transkrip gen. Skala warna menunjukkan perubahan lipatan dalam ekspresi gen (biru untuk kelimpahan tinggi, merah untuk kelimpahan rendah)	30
Hasil qRT-PCR menggunakan empat gen fungsional karotenoid pada sampel umbi ubi kayu varietas Adira4 dan Cavita25	31
Profil ekspresi gen <i>PSY1</i> pada umbi ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25	39
Hasil amplifikasi fragmen <i>MePSY1</i> menggunakan cetakan DNA ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25 dengan ukuran ± 2.127 (A), dan hasil pemotongan plasmid rekombinan menggunakan ER <i>Sac1</i> dan <i>BamH1</i> menghasilkan pita insert gen <i>MePSY1</i> dan plasmid vektor kloning (B)	39
Skema struktur gen <i>MePSY1</i> dari ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25. A. Skema hasil amplifikasi genom gen <i>MePSY1</i> dengan pasangan primer menghasilkan ampikon genom dengan ukuran 2.009	

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

	bp, B. Bagian genom gen <i>MePSY1</i> terdiri dari 6 exon dan 5 intron, C. Skema bagian CDS utuh ukuran 1.296 bp	40
20	Posisi variasi basa nukleotida pada gen <i>MePSY1</i> ubi kayu varietas Adira4, Carvita25, dan aksesori rujukan AM560-2	42
21	Posisi variasi basa nukleotida antara sekuen genom gen <i>MePSY1</i> antara ubi kayu varietas Adira4, Carvita25 dan aksesori rujukan AM560-2 (atas) dan sekuen cds gen <i>MePSY1</i> antara ubi kayu varietas Adira4, Carvita25 dan aksesori rujukan AM560-2 (bawah)	43
22	Hasil pensejajaran asam amino gen <i>MePSY1</i> antara ubi kayu varietas Adira4, Carvita25 dan aksesori rujukan AM560-2. Perbedaan asam amino asam aspartat (D) pada Adira4 dan asam glutamat (E) pada Carvita25 posisi ke 193 (blok kuning). Kotak merah dan huruf tebal bergaris bawah menunjukkan situs aktif protein <i>Phytoene synthase</i> . Bayangan abu-abu menunjukkan conserved domain dan tanda segitiga menunjukkan posisi awal situs aktif	44
23	Pohon filogenetik berdasarkan residu asam amino gen <i>MePSY1</i> antara ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25 dan spesies tanaman lainnya yang divisualisasikan menggunakan Phylo.io versio 1.0k.	46
24	Pemodelan tiga dimensi MePSY1.A4 dan MePSY1.C25 berdasarkan prediksi Phyre2 dan I-Tasser. (A) struktur sekunder MePSY1.A4, dan (B) MePSY1.C25 dengan untai heliks α dan β -strand. Untai berwarna biru merupakan ujung N dan merah merupakan ujung C; (C) dan (D) prediksi situs pengikatan ligan protein PSY1.A4 dan PSY1.C25; (E) dan (F) prediksi residu <i>active site</i> PSY1.A4 dan PSY1.C25	49
25	Skema daerah promotor pada gen <i>MePSY1</i> yang diamplifikasi dari ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25 dengan ukuran 2.199 pb	53
26	Hasil optimasi amplifikasi fragmen promotor gen <i>MePSY1</i> menggunakan cetakan DNA ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25 dengan suhu penempelan primer mulai dari 60°C hingga 70°C (A) dan pita PCR lima koloni rekombinan dari masing-masing promotor PPSY.A4 dan PPSY.C25 (B)	55
27	Sekuen promotor gen <i>MePSY1</i> ubi kayu varietas Adira4 dan Carvita25. Warna menunjukkan jenis motif elemen <i>cis-acting</i>	58
28	Skema promotor dan delesi promotor gen <i>MePSY1</i> yang diperoleh dari DNA genomik ubi kayu varietas Carvita25 akan diligasasi dengan gen <i>GUS</i> dan digunakan untuk transformasi tanaman	63
29	Skema konstruksi kaset promotor gen <i>MePSY1</i> pada vector biner pCAMBIA1305.1	64
30	Hasil amplifikasi promotor P0PSY1, promotor delesi P1PSY1 dan P2PSY1 (kiri) dan hasil <i>digest</i> vector biner pCAMBIA.1305.1-PPSY1 dengan enzim restriksi <i>BamH1</i> - <i>NCO1</i> (kanan).	67
31	Proses transformasi tanaman tembakau dengan menggunakan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain LBA4404 yang membawa konstruk mutan promotor gen <i>MePYS1</i> . A. Stek tanaman tembakau yang digunakan sebagai eksplan, C. Kokultivasi daun tembakau dengan suspensi <i>Agrobacterium</i> , D. Daun tembakau di media seleksi I, D. Daun tembakau di media seleksi II, F. Tunas yang beregenerasi dari kalus daun yang mampu tumbuh di media seleksi, G. Tunas di media	

pemanjangan tunas, H, I. Tanaman tembakau putatif transgenik yang berhasil diaklimatisasi.	68
Hasil PCR galur tanaman tembakau transgenik yang mengandung konstruk promotor <i>MePSY1</i> . Pada contoh PCR tersebut galur tanaman transgenik positif positif mengandung konstruk promotor P0PSY1 dan P1PSY1. M=1 Kb, 1-6= galur tembakau P0PSY1, 1-4= galur tembakau P1PSY1, K(-)= Air.	69
Hasil transformasi transien: pengujian histokimia kecambah tembakau transgenik umur 7 hari. Gambar diambil dengan optilab di bawah mikroskop stereo perbesaran 2x. A. ekspresi gen <i>GUS</i> dikendalikan promotor 35S pada akar, batang dan daun kecambah tembakau, B. promotor P0PSY1 tidak mengekspresikan gen <i>GUS</i> pada kecambah tembakau, C. ekspresi gen <i>GUS</i> dikendalikan promotor P1PSY1 terekspresi di kotiledon kecambah tembakau	70
bagian tanaman tembakau transgenik generasi T0 yang mengandung promotor <i>MePSY1</i>	70
Ekspresi gen <i>GUS</i> yang dikendalikan oleh promotor CaMV35S dan promotor <i>MePSY1</i> . pada kecambah tembakau transgenik generasi T1 umur 8 hari setelah semai	71
Ekspresi gen <i>GUS</i> pada tanaman tembakau transgenik yang mengandung promotor <i>MePSY1</i> dengan ukuran 2.671 bp (P0PSY1) dan 1.241 pb (P1PSY1) diinduksi dengan zat pengatur tumbuh 0.5 mg/L BAP (sitokinin). K=kontrol.	71
Ekspresi gen <i>GUS</i> pada tanaman tembakau transgenik yang mengandung promotor gen <i>MePSY1</i> dengan ukuran 1.229 pb (P1PSY1) diinduksi dengan zat pengatur tumbuh IAA dan ABA selama 2 jam dan 4 jam dan perlakuan rendaman selama 4 jam	73
Skema regulasi transkripsi gen <i>MePSY1</i> pada umbi ubi kayu varietas Carvita25. Kotak krem menunjukkan regulasi transkripsi yang terjadi pada umbi yang dibahas dalam penelitian ini ditunjukkan dengan warna biru. Garis biru putus-putus menunjukkan interaksi tidak langsung/tidak diketahui.	78

DAFTAR LAMPIRAN

1	Daftar senyawa metabolit pada sampel umbi Adira4 dan Carvita25 menggunakan metode LC-HRMS	99
2	Hubungan antara fungsi ID GOTERM dan ID gen pada ubi kayu terkait dengan analisis ekspresi gen antara varietas putih Adira4 (A4) dan kuning Carvita25 (C25)	104