

**DETEKSI VARIASI SOMAKLONAL PLANLET *Jatropha curcas* Linn.
HASIL REGENERASI EMBRIO SOMATIK DENGAN MARKA
MOLEKULAR ISSR****Detection of Somaclonal Variation in *Jatropha curcas* Linn. Plantlets
Regenerated from Somatic Embryo using ISSR Markers****Rudiyanto^{1*}, Darda Efendi², Erwin Al-Hafizh¹, Tri Muji Ermayanti¹**¹ Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong, Indonesia 16911² Departemen Agronomi dan Hortikultura, IPB University, Jl. Raya Dramaga Kampus IPB Dramaga Bogor 16680

*Email: rudi006@lipi.go.id

ABSTRACT

Physic nut (*Jatropha curcas* Linn.) has the potential as a source of sustainable biofuels. Somatic embryo proliferation of *J. curcas* may cause somaclonal variations. This research aimed to investigate somaclonal variations of *J. curcas* somatic embryo derived-plantlet using ISSR markers. Somatic embryos of *J. curcas* at the globular phase were cultured on liquid MS medium supplemented with 0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg L⁻¹ of 2,4-D. Parameter observed were embryos weight, embryos volume, colour, and size of embryos. After proliferation, the embryos were cultured on a germination medium until the cotyledonary phase. The plantlet's leaves were used for DNA samples for ISSR analysis. The results showed that proliferation of *J. curcas* somatic embryos was optimal at MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ 2,4-D and produced the highest weight and volume of embryos. The furthest genetic distance occurred between the control and *J. curcas* plantlet which was regenerated from MS + 1 mg L⁻¹ 2,4-D which had 0.60 of similarity coefficient.

Keywords: 2,4-D, ISSR, *J. curcas*, proliferation, somatic embryos**ABSTRAK**

Jarak Pagar (*Jatropha curcas* Linn.) berpotensi sebagai sumber biofuel yang berkelanjutan. Proliferasi embrio somatik *J. curcas* dapat menyebabkan terjadinya variasi somaklonal. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya variasi somaklonal pada planlet *J. curcas* yang diregenerasikan dari embrio somatik dengan marka molekular ISSR. Embrio fase globular dikultur pada media MS cair dengan penambahan 0; 0,5; 1,0; 1,5 dan 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D kemudian diamati bobot embrio, volume embrio, warna dan ukuran embrionya. Setelah proliferasi, embrio dikulturkan pada media perkecambahan hingga fase kotiledon. Sampel DNA untuk analisa ISSR diperoleh dari daun planlet hasil regenerasi embrio somatik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proliferasi embrio somatik *J. curcas* optimal pada media MS yang mengandung 1 mg L⁻¹ 2,4-D dengan nilai bobot dan volume embrio tertinggi. Jarak genetik terjauh terjadi antara tanaman kontrol dengan planlet *J. curcas* yang diregenerasikan dari perlakuan MS yang mengandung 1 mg L⁻¹ 2,4-D dengan koefisien kemiripan 0,60.

Kata Kunci: 2,4-D, embrio somatik, ISSR, *J. curcas*, proliferasi

PENDAHULUAN

Jarak pagar (*Jatropha curcas* Linn.) merupakan tanaman dari famili Euphorbiaceae berbentuk perdu dengan tinggi antara 1–5 m, bercabang tidak teratur, dan batang berkayu berbentuk silindris. Batang tanaman muda bergetah jernih, berwarna hijau, sedangkan batang tua berwarna cokelat (Santoso et al. 2011). Tanaman *J. curcas* memiliki ukuran genom sebesar 416 Mb serta jumlah kromosom $2n = 2x = 22$ (Velázquez 2018).

Terdapat beberapa jenis tanaman *J. curcas* yang dibudidayakan di Indonesia di antaranya varietas IP-1A, IP-2M dan Daun Kuning serta beberapa aksesori unggul lainnya seperti aksesori Banyumas, Pati, Cilacap, Purwodadi, Jepara, Kudus, Pemalang dan Grobogan (Arya et al. 2011). Aksesori Dompu juga merupakan jenis tanaman unggul karena toleran kekeringan dan memiliki kandungan minyak tinggi yaitu 30–37% dengan bobot biji 2,0–2,23 g (Hasnam 2011).

Tanaman *J. curcas* merupakan salah satu jenis tanaman yang sangat potensial dikembangkan sebagai biofuel. Tanaman ini mampu beradaptasi dengan baik pada berbagai kondisi iklim dan mampu memproduksi antara 937–1250 kg minyak/hektar (Duartea 2018, Laviola et al. 2018). Dengan produktivitas biji dan daya adaptasinya tinggi, secara ekonomis *J. curcas* sangat *feasible* untuk dikembangkan sebagai sumber biofuel yang berkelanjutan.

Secara konvensional *J. curcas* dapat diperbanyak secara vegetatif melalui stek maupun secara generatif melalui biji. Keterbatasan jumlah tanaman induk untuk bahan stek dan adanya dormansi biji menjadi kendala dalam produksi bibit *J. curcas* secara luas yang diperlukan untuk industri. Perbanyakan melalui embrio somatik secara *in vitro* dapat diaplikasikan untuk memproduksi bibit tanaman yang seragam, bebas hama penyakit, stabil dan dapat diproduksi dalam waktu yang relatif singkat (Mamiya dan Sakamoto 2001). Inisiasi embrio somatik *J. curcas* optimal pada media MS yang mengandung 2,5 mg L⁻¹ Picloram dengan jumlah eksplan yang membentuk embrio somatik sebanyak 10% pada umur 6 MST dengan jumlah 2 fase globular dan 5 fase torpedo (Al Hafiih 2012).

Dalam perbanyakan secara *in vitro*, sering terjadi keragaman akibat mutasi somatik atau diistilahkan dengan variasi somaklonal. Sel yang mengalami mutasi dapat membentuk sekumpulan sel yang berbeda dengan sel tetuanya (Mattjik 2005). Variasi somaklonal sering menghasilkan tanaman *off-type* yang berbeda dari tanaman induk (Krishna et al. 2016). Variasi somaklonal terjadi pada beberapa level mulai dari tingkat molekuler, sitologi, sitokimia, biokimia dan morfologi (Leva et al. 2014). Keragaman hasil variasi somaklonal ini dapat merugikan karena bibit berbeda dari tanaman induk, namun juga dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan tanaman unggul baru setelah melalui proses seleksi (Mattjik 2005). Perubahan genetik akibat variasi somaklonal dapat pula dimanfaatkan untuk mendapatkan keragaman genetik untuk tujuan pemuliaan (Dey et al. 2015, Naz et al. 2016). Induksi kalus embrio somatik dengan menggunakan 2,4-D dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan terjadinya variasi somaklonal seperti pada kalus embrio somatik strawberi, kedelai, dan tanaman kapas (Bairu et al. 2011).

Variasi somaklonal dapat dikelompokkan menjadi keragaman yang diwariskan (*heritable*), yaitu yang dikendalikan secara genetik, dan keragaman yang tidak diwariskan, yakni yang dikendalikan secara epigenetik. Keragaman somaklonal yang dikendalikan secara genetik biasanya bersifat stabil dan dapat diturunkan secara seksual ke generasi selanjutnya. Sebaliknya keragaman epigenetik biasanya akan hilang bila diturunkan secara seksual (Mattjik 2005). Variasi somaklonal yang stabil secara genetik dapat terbentuk karena mutasi titik, perubahan jumlah dan struktur kromosom, rekombinasi DNA, metilasi urutan DNA, penghapusan dan transposisi pada genom inti, mitokondria maupun kloroplas. Perubahan genetik ini dapat menyebabkan perubahan yang stabil, yang diturunkan secara seksual pada generasi selanjutnya. Mutasi yang diakibatkan variasi somaklonal ini dapat dimanfaatkan untuk menciptakan keragaman yang kemudian dapat diseleksi untuk mendapatkan kultivar yang diinginkan (Anil et al. 2018).

Untuk mengidentifikasi terjadinya variasi somaklonal dapat dilakukan melalui beberapa pendekatan mulai dari marka morfologis, analisis sitogenetik dan penanda

molekuler serta biokimia (Leva et al. 2014). Marka molekuler berbasis DNA seperti RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) dan ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) dapat digunakan untuk mengidentifikasi terjadinya variasi somaklonal. Marka tersebut dapat digunakan untuk karakterisasi tanaman serta mampu mendeteksi terjadinya variasi somaklonal secara akurat seperti pada kultur tanaman *Cymbopogon winterianus*, *Citronella java* dan *Echinacea purpurea* (Dey et al. 2015). Penanda molekuler ISSR merupakan salah satu marka dengan primer sekuen berulang yang terdiri dari fragmen DNA dengan ukuran 100–3.000 bp yang berlokasi di antara wilayah mikrosatelit dengan wilayah amplifikasi sekuen DNA yaitu pada inter-SSR bagian *flanked* genom secara berlawanan pada area yang dekat dengan sekuen berulang (Sa et al. 2011, Romeida et al. 2012). Deteksi variasi somaklonal secara dini perlu dilakukan dalam perbanyakan tanaman secara *in vitro* agar mendapatkan tanaman yang memiliki sifat agronomi yang diinginkan (Vitavvas et al. 2019). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi terjadinya variasi somaklonal dengan menggunakan marka molekuler ISSR pada planlet *J. curcas* yang diregenerasikan dari embrio somatik.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei–November 2016 di Laboratorium Biak Sel dan Jaringan Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong Bogor dan di Laboratorium Biomolekuler Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman IPB.

Proliferasi dan regenerasi embrio somatik

Penelitian menggunakan tanaman jarak pagar aksesori Dompu berasal dari kebun PT. Indocement Cibinong, Bogor. *Clump* embrio somatik *J. curcas* fase globular dengan bobot 25–30 mg dengan diameter 0,4–0,5 cm dikulturkan pada media MS (Murashige dan Skoog 1962) cair tanpa 2,4-D (kontrol) dan dengan penambahan 0,5; 1,0; 1,5 dan 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D dalam tabung Erlenmeyer dengan jumlah ulangan 12. Untuk menjaga aerasi dalam media kultur, tabung Erlenmeyer diletakkan pada *shaker* pada kecepatan 130–150 rpm di dalam ruang

kultur pada suhu 24 ± 2 °C dengan pencahayaan 600–1000 lux. Pada umur 8 minggu dilakukan pengamatan terhadap peubah bobot embrio (diukur menggunakan timbangan analitik), volume embrio (merupakan selisih volume akuades dalam tabung ukur sebelum dan sesudah dimasukkan *clump* embrio), warna embrio dan ukuran embrio (diukur menggunakan pengaris dan jangka sorong). Setelah tahap proliferasi, embrio somatik kemudian dikulturkan pada media pendewasaan dan perkecambahan embrio hingga fase kotiledon (media MS dengan penambahan 30 g L⁻¹ sukrosa dan 5% PEG). Embrio yang telah berkecambah kemudian disubkultur pada media MS padat dengan penambahan 1 mg L⁻¹ 2-iP selama 2 minggu. Kultur kemudian dipindahkan ke media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh selama 6 minggu. Planlet berumur 6 minggu yang telah berakar diaklimatisasi di rumah kaca pada media tanah, pasir, *cocopeat* dan pupuk kandang dengan perbandingan 2 : 1 : 1 : 1.

Deteksi variasi somaklonal

Deteksi variasi somaklonal dilakukan dengan analisis marka molekuler ISSR dengan mengambil enam sampel daun *J. curcas* yang terdiri atas satu sampel daun dari lapang sebagai kontrol (tetua), dan sampel planlet hasil regenerasi embrio somatik pada perlakuan media MS dengan 0; 0,5; 1,0; 1,5 dan 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D. Tahapan analisis yang dilakukan meliputi isolasi DNA, pemilihan primer, amplifikasi DNA, elektroforesis dan analisis data molekuler.

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan mengikuti prosedur CTAB (*cetyl trimethylammonium bromide*) (Healey et al. 2014) dengan beberapa modifikasi. Penelitian ini menggunakan sampel daun sebanyak kurang lebih 100 mg. Daun digerus dengan mortar yang sebelumnya telah diberi buffer ekstraksi CTAB 700 µL dan PVP (*polyvinylpyrrolidone*) 10 mg kemudian setelah daun larut dan tergerus sempurna larutan dipindahkan ke dalam tabung 2 mL kemudian di-*vorteks* agar homogen. Campuran selanjutnya diinkubasi di dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 30 menit. Pemurnian DNA dilakukan dengan penambahan 700 µL buffer purifikasi/buffer CIA (kloroform: isoamil alkohol = 24 : 1 v/v)

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA ISSR dari sampel *J. curcas* Kumar et al. (2009)

No	Sequence 5'-3'	Nilai TM	% GC
1	GAGAGAGAGAGAGAGAC	48,5	52,63
2	GAGAGAGAGAGAGAGAT	48,0	47,37
3	GAGAGAGAGAGAGAGAA	49,3	47,37
4	AGAGAGAGAGAGAGGC	46,8	52,94
5	GAGAGAGAGAGAGAGAC	46,8	52,94

lalu di-vorteks selama 15 detik. Pemisahan fraksi di dalam campuran dilakukan dengan sentrifuse 10.000 rpm selama 5 menit. Fase cair (*supernatan*) yang diperoleh dipindahkan ke *microtube* steril baru. Tahap purifikasi dengan buffer CIA ini dilakukan dua kali. Supernatan berwarna kuning (bagian atas) diambil kemudian dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL lalu diberi alkohol absolut (100%) hingga volume 1,5 mL penuh lalu dikocok kemudian diinkubasi 4 °C selama 30 menit. Setelah fase inkubasi, larutan kemudian disentrifuse pada kecepatan 8.000 rpm selama 5 menit. Fase cair dibuang dan fase padat/pelet dikeringkan selama sekitar 30 menit di dalam vakum desikator. Selanjutnya pelet dilarutkan dalam 150 µL akuabides dan dibolak-balik. *Working solution* dibuat dengan mengencerkan larutan DNA dengan mengambil 40 µL larutan DNA + 160 µL akuabides.

Pemilihan primer

Sebanyak 5 primer digunakan dalam mengamplifikasi DNA (Tabel 1). Primer-primer tersebut merupakan primer yang telah didesain oleh Kumar et al. (2009).

Amplifikasi dan elektroforesis

Komposisi reaksi PCR (*polymerase chain reaction*) terdiri dari DNA sampel 2,5 µL, PCR mix 5 µL, dan primer 2,5 µL (total 10 µL). Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR *Esco Thermal Cycler* 2012. Denaturasi awal (pra PCR) pada suhu 94°C selama 5 menit sebanyak satu siklus, dilanjutkan dengan 40 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 1 menit, *annealing* (penempelan primer) pada suhu 50°C selama 1 menit, dan *extension* pada 72°C selama 2 menit. Setelah selesai 40 siklus selanjutnya diakhiri dengan *final extension* pada 72°C selama 10 menit sebanyak satu siklus kemudian pendinginan 4°C (Kumar et al.

2009). Hasil dari reaksi kemudian dielektroforesis pada gel agarose dengan konsentrasi 1,5%. Gel kemudian diwarnai dengan pencelupan ke dalam larutan *ethidium bromide* selama sekitar 15 detik lalu gel direndam di dalam air selama 10 menit. Hasil elektroforesis diamati di bawah UV transiluminator untuk melihat pola pita yang dihasilkan.

Analisis data molekular

Data pengamatan polimorfisme pita marka ISSR didapatkan dari skoring. Setiap pita yang muncul mewakili satu karakter dan diberi nilai berdasarkan ada tidaknya pita. Data skoring tersebut kemudian ditransformasi ke dalam bentuk data biner. Nilai 1 bila ada pita dan nilai 0 bila tidak ada pita. Kategori pita polimorfik apabila pita yang muncul tidak dimiliki oleh antar individu aksesi planlet *J. curcas* yang berasal dari regenerasi embrio somatik dibandingkan dengan tetua kontrol pada ukuran yang sama. Data biner yang diperoleh digunakan untuk menyusun matriks kesamaan genetik. Berdasarkan nilai kesamaan genetik tersebut, kemudian dilakukan analisis pengelompokan data matrik (*cluster analysis*) dan pembuatan dendrogram pohon kekerabatan menggunakan metode UPGMA (*unweighted pair group method arithmetic*) melalui program NTSYS (*numerical taxonomy and multivariate system*) versi 2.01 (Rohlf 1998). Langkah berikutnya adalah analisis kofenetik MxComp. Analisis ini digunakan untuk membandingkan matriks kemiripan atau ketidakmiripan dengan matrik nilai kofenetik yang bertujuan mengukur tingkat hubungan antara dua matrik melalui program NTSYS. Keselarasan pengelompokan ditentukan dari kriteria *goodness of fit* berdasarkan nilai korelasi menurut Rohlf (1998) yaitu sangat baik ($r \geq 0.9$), baik ($0.8 \leq r < 0.9$), lemah ($0.7 \leq r < 0.8$), dan sangat lemah ($r < 0.7$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai rata-rata bobot, volume, warna dan ukuran embrio *J. curcas* yang dikulturkan pada media MS cair tanpa 2,4-D (kontrol) dan dengan penambahan 0,5; 1,0; 1,5 dan 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D umur 8 minggu terdapat pada Tabel 2. Bobot dan volume embrio tertinggi terdapat pada perlakuan MS dengan penambahan 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D berbeda nyata dengan perlakuan 0 (kontrol), 0,5, 1,5 dan 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D. Bobot dan volume embrio yang tinggi menunjukkan bahwa pada perlakuan MS + 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D proliferasi embrio somatik fase globular optimal. Pemberian 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D berfungsi untuk mencegah terjadinya diferensiasi sel ke tahap pendewasaan dan perkecambahan sehingga proliferasi embrio fase globular meningkat. Pada tanaman krisan, media MS yang mengandung 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D menghasilkan proliferasi kalus embriogenik tertinggi (Manil dan Senthil 2011), sedangkan pada kultur embrio *Anthurium andraeanum* proliferasi optimal pada media ½ MS dengan penambahan 1 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ Kinetin (Wang et al. 2019).

Warna embrio *J. curcas* dalam kultur media cair bervariasi mulai dari putih kekuningan hingga kuning kecoklatan. Pada perlakuan 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D warna embrio sebagian besar mencoklat yang mengindikasikan turunnya viabilitas embrio untuk dapat berkecambah (Rudiyanto et al. 2014b). Bandyopadhyay dan Hamill (2018) menyatakan bahwa embrio somatik tanaman normal pada kultur embrio umumnya berwarna kuning kemerahan atau putih telur, bentuknya bulat dengan diameter sekitar 250 µm. Pada kultur embrio *J. curcas* dengan perlakuan tanpa dan dengan penambahan 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D, embrio yang terbentuk berukuran sedang hingga besar, sedangkan pada perlakuan 1,0 dan 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D embrio yang terbentuk berukuran kecil-sedang (Tabel 2).

Tahapan perbanyak tanaman *J. curcas* melalui embrio somatik terdapat pada Gambar 1. Gambar 1A menunjukkan embrio somatik fase globular yang dikulturkan pada media MS padat dengan penambahan 1 mg L⁻¹ 2,4-D, sedangkan Gambar 1B menunjukkan embrio somatik fase globular yang diperbanyak pada

media MS cair dengan penambahan 1 mg L⁻¹ 2,4-D untuk mengoptimalkan tahap proliferasi embrio. Gambar 1C menunjukkan embrio somatik yang telah berkembang lebih lanjut pada media MS padat yang mengandung 30 g L⁻¹ sukrosa dengan penambahan 5% PEG. Menurut Rudiyanto et al. (2014b), perkecambahan embrio somatik *J. curcas* optimal pada media MS dengan penambahan sukrosa 20 atau 30 g L⁻¹ yang dikombinasikan dengan 5% PEG. Pada media ini jumlah embrio berkecambah per *clump*, persentase embrio normal berkecambah dan persentase *clump* embrio berkecambah lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya.

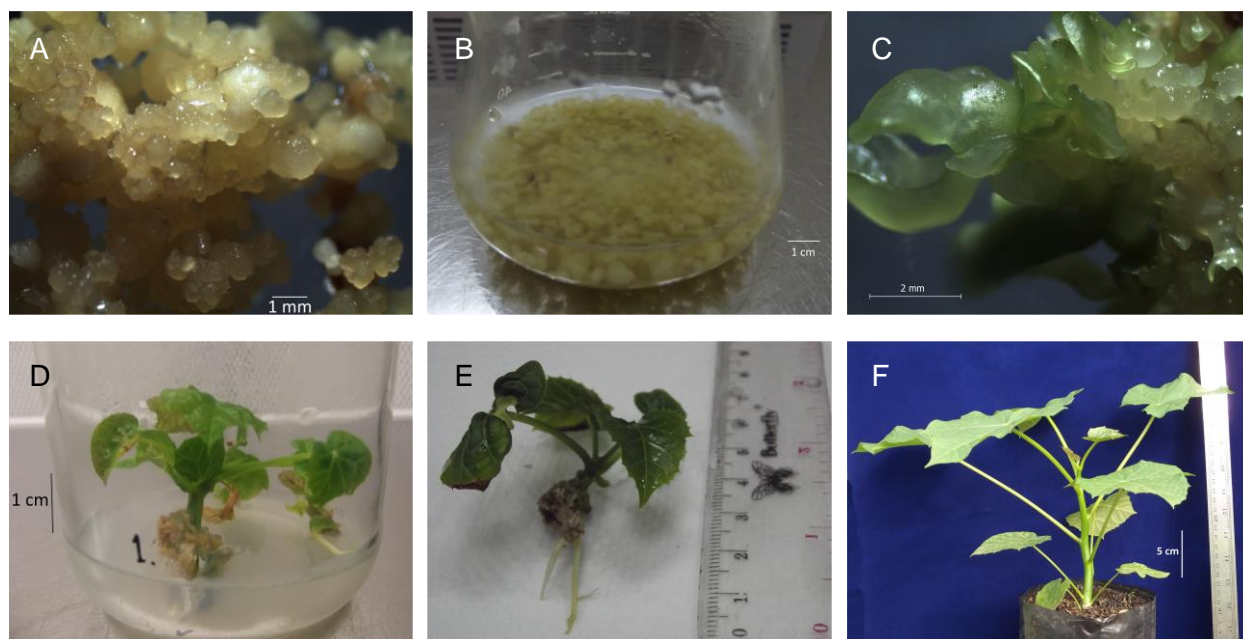
Gambar 1D menunjukkan planlet *J. curcas* pada media MS dengan penambahan 1 mg L⁻¹ 2-iP hasil regenerasi embrio somatik. Media ini digunakan berdasarkan penelitian Rudiyanto et al. (2014a) bahwa pertumbuhan planlet *J. curcas* hasil regenerasi embrio somatik dapat dioptimalkan dengan mengkulturkan planlet pada media MS dengan penambahan 1 mg L⁻¹ 2-iP. Gambar 1E menunjukkan planlet *J. curcas* yang telah berumur 8 minggu dan Gambar 1F adalah tanaman *J. curcas* yang telah diaklimatisasi dan ditanam di rumah kaca.

Perbandingan profil pita DNA yang dihasilkan dari kelima primer ISSR antara tanaman kontrol dengan kelima planlet *J. curcas* hasil perlakuan tahap proliferasi embrio somatik menunjukkan adanya polimorfisme/perbedaan pola pita DNA. Tanaman yang digunakan sebagai sampel adalah sebagai berikut: 1) kontrol (tanaman di lapang), 2) planlet 1 (tanpa 2,4-D), 3) planlet 2 (0,5 mg L⁻¹ 2,4-D), 4) planlet 3 (1 mg L⁻¹ 2,4-D), 5) planlet 4 (1,5 mg L⁻¹ 2,4-D 1,5 mg L⁻¹) dan 6) planlet 5 (2 mg L⁻¹ 2,4-D). Pada beberapa planlet terutama planlet 3 (sampel 4), terdapat perbedaan dengan profil pita tetuanya. Berdasarkan data amplifikasi, kelima primer ISSR tersebut dapat memberikan gambaran keragaman genetik yang terjadi akibat variasi somaklonal (Gambar 2). Widiastuti et al. (2013) menyatakan bahwa amplifikasi dapat terjadi jika dua mikrosatelit sekuen berulang yang sama dalam orientasi terbalik berlokasi cukup dekat satu sama lain sehingga memungkinkan sekuen di antaranya untuk teramplifikasi.

Tabel 2. Rata-rata bobot, volume, warna dan ukuran embrio *J. curcas* umur 8 minggu yang dikulturkan pada media MS cair tanpa dan dengan penambahan 0.5-2.0 mg L⁻¹ 2,4-D

Konsentrasi 2,4-D (mg L ⁻¹)	Bobot Embrio (mg)	Volume Embrio (mL)	Warna Embrio	Ukuran Embrio
0	2,36 ± 0,31 ^b	2,05 ± 0,29 ^b	kuning	sedang-besar
0,5	2,48 ± 0,58 ^b	2,53 ± 0,58 ^b	putih-kuning	sedang
1,0	4,00 ± 0,27 ^a	3,80 ± 0,22 ^a	kuning	kecil-sedang
1,5	2,82 ± 0,14 ^b	2,74 ± 0,38 ^b	kuning	kecil-sedang
2,0	2,52 ± 0,04 ^b	2,40 ± 0,08 ^b	kuning-coklat	kecil

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 5\%$

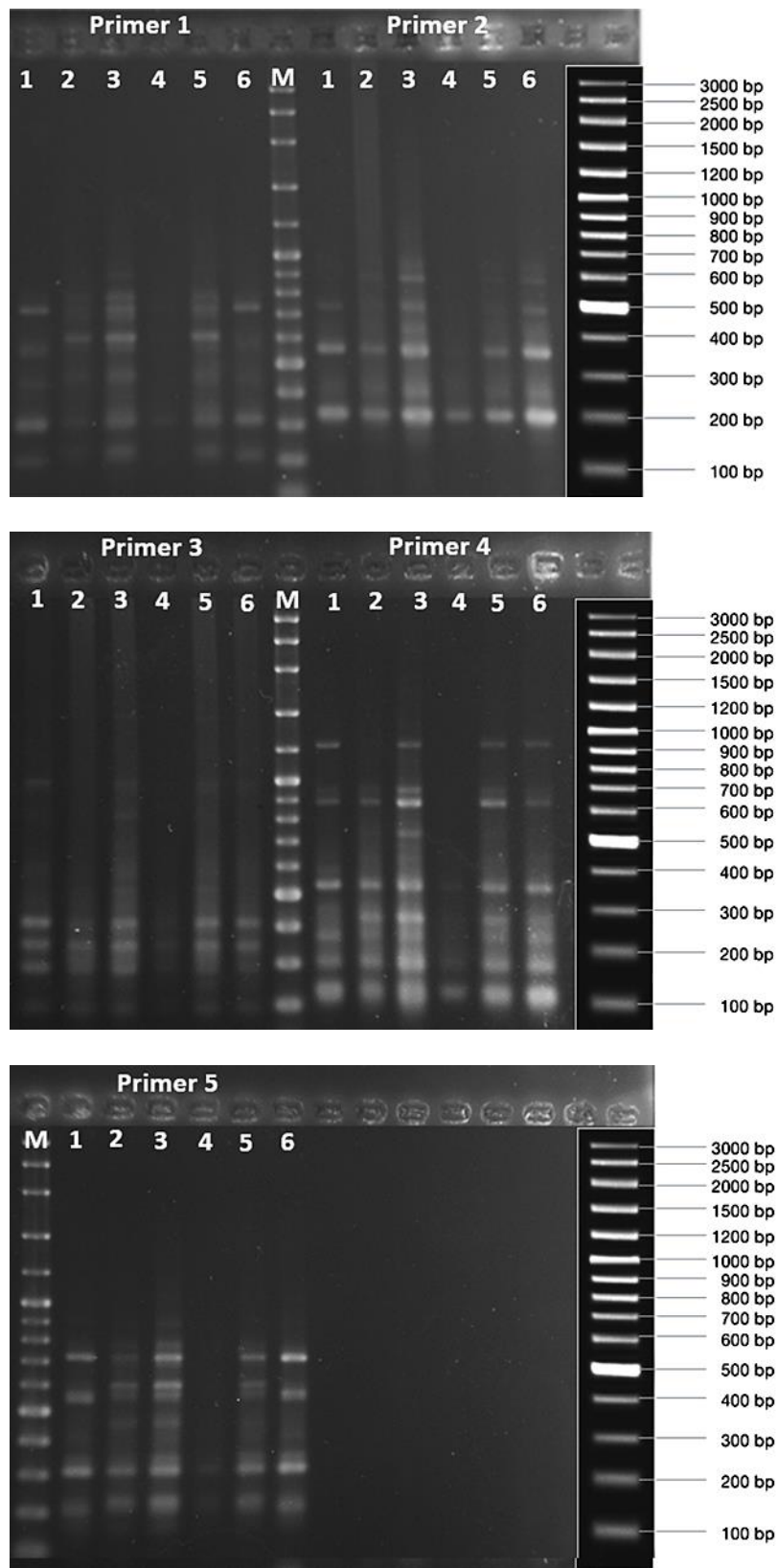


Gambar 1. Tahapan regenerasi *J. curcas* melalui embrio somatik: A). Fase globular pada media MS padat + 1 mg L⁻¹ 2,4 D; B). Proliferasi pada media MS cair + 1 mg L⁻¹ 2,4-D; C). Embrio somatik mulai berkecambah pada media MS + 30 g L⁻¹ Sukrosa+ 5% PEG; D). Planlet pada media MS + 1 mg L⁻¹ 2-iP; E). Planlet umur 8 minggu siap aklimatisasi; dan F). Tanaman *J. curcas* umur 8 MST di rumah kaca hasil regenerasi embrio somatik

Hasil amplifikasi dari 5 primer menghasilkan sejumlah pita, dan pola pitanya dikelompokkan menjadi dua, yaitu pita polimorfik dan pita monomorfik. Polimorfik ditandai dengan ada atau tidaknya pita yang dihasilkan suatu sampel. Menurut Widiastuti et al. (2013), pita polimorfik yang dihasilkan dari teknik ISSR berasal dari variasi sekuen DNA pada tempat penempelan primer. Tingkat polimorfik pita DNA yang dihasilkan berdasarkan penanda ISSR yang digunakan pada *J. curcas* cukup tinggi yakni 65,91%. Menurut Baruah et al. (2017), polimorfik merupakan gambaran amplifikasi yang diperoleh dari perbedaan fragmen DNA yang diobservasi dan diskor sebagai tanda ada atau tidaknya perbedaan sekuen sehingga

menunjukkan ada tidaknya variasi. Meningkatnya pita polimorfik yang dihasilkan dalam suatu populasi menunjukkan adanya keragaman genetik.

Dari 44 pita DNA yang dihasilkan terdapat 15 pita yang monomorfik dan 29 pita polimorfik. Dari kelima primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA *template J. curcas*, primer 4 dan 5 menghasilkan pita polimorfik yang terbanyak dengan ukuran pita berkisar antara 200–1.200 bp sedangkan pada primer 3 hanya menghasilkan pita polimorfik yang sedikit (Gambar 2 dan Tabel 3). Jumlah pita yang dihasilkan tergantung pada banyaknya fragmen DNA yang teramplifikasi saat dilakukan PCR.



Gambar 2. Pola pita amplifikasi DNA sampel tanaman *J. curcas* dari planlet yang ditanam pada media MS yang mengandung 2,4-D dan tanaman kontrol yang tumbuh di lapang. M: Marka, 1: kontrol (tanaman di lapang), 2: planlet 1 (tanpa 2,4-D), 3: planlet 2 (0.5 mg L⁻¹ 2,4-D), 4: planlet 3 (1 mg L⁻¹ 2,4-D), 5: planlet 4 (1.5 mg L⁻¹ 2,4-D 1.5 mg L⁻¹), 6: planlet 5 (2 mg L⁻¹ 2,4-D)

Tabel 3. Rekapitulasi jumlah amplifikasi pita DNA dari satu tanaman *J. curcas* dari lapang dan lima planlet *J. curcas* hasil regenerasi embrio somatik pada 5 primer ISSR

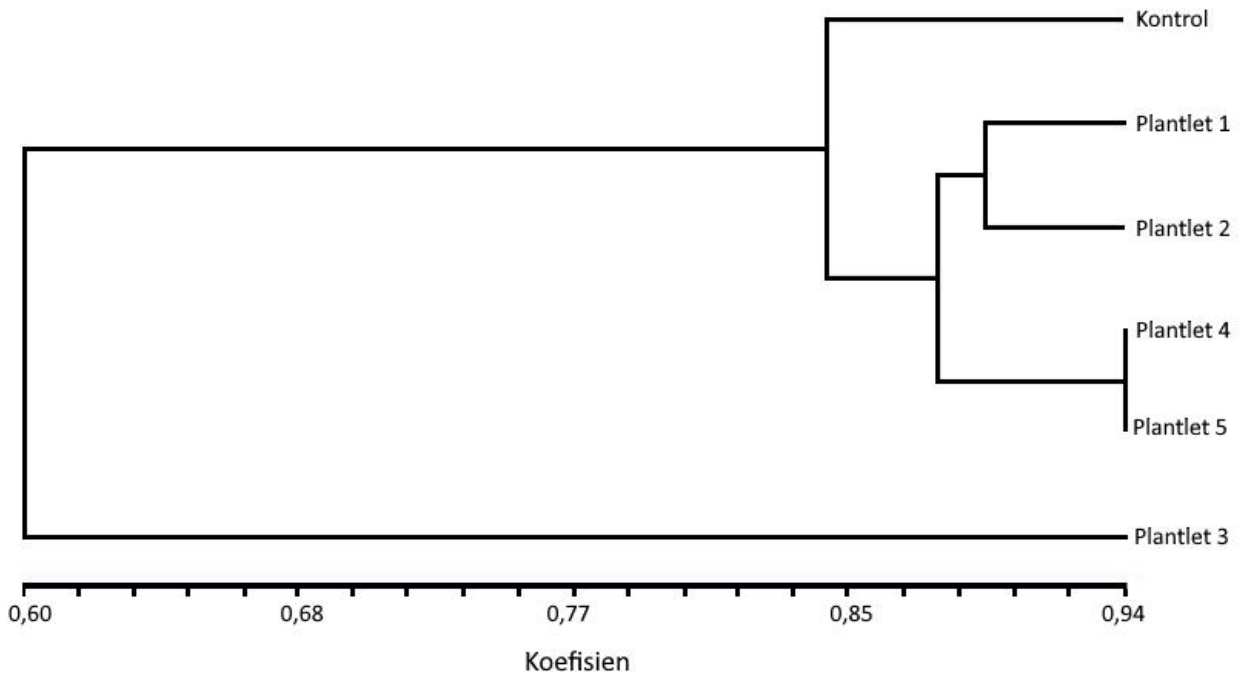
Primer	Ukuran Pita (bp)	Pita Polimorfik	Pita Monomorfik	Jumlah Pita
Primer 1	200–900	6	3	9
Primer 2	300–1000	5	2	7
Primer 3	200–1000	4	4	8
Primer 4	200–1200	7	3	10
Primer 5	200–900	7	3	10
Jumlah pita		29 (65,91%)	15 (34,09%)	44 (100%)

Keragaman yang terjadi pada pola pita ISSR yang dihasilkan menunjukkan telah terjadi variasi somaklonal akibat perubahan pada sequence DNA baik itu karena terjadinya mutasi delesi, insersi maupun duplikasi (Naz et al. 2016). Hasil analisis ISSR pada kalus cabai yang dikultur pada media dengan penambahan 2,4-D menunjukkan variasi genetik yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Semakin lama kalus dikulturkan pada media dengan penambahan 2,4-D maka variasi genetiknya semakin meningkat (Bello et al. 2014).

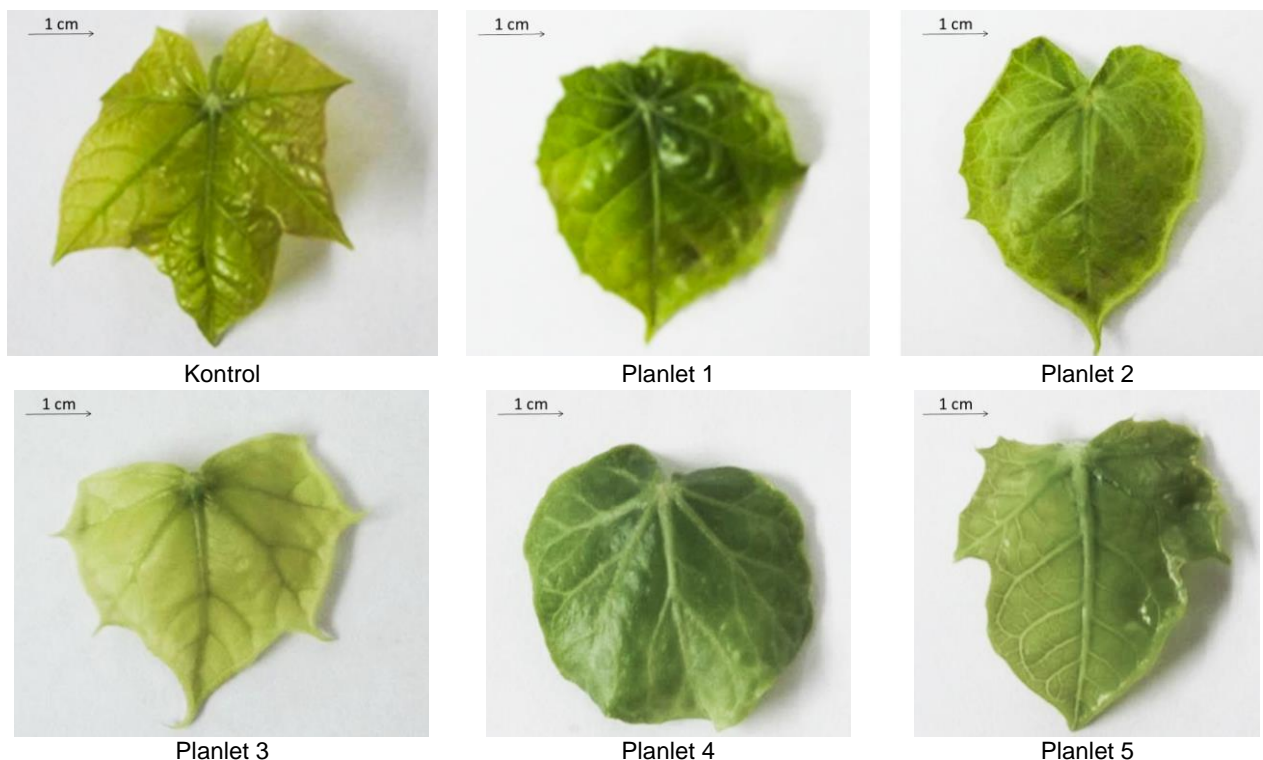
Analisis pengelompokan dengan metode UPGMA berdasarkan penanda ISSR terhadap tanaman kontrol dan 5 planlet *J. curcas* hasil regenerasi embrio somatik menghasilkan dendogram dengan nilai

koefisien kemiripan antara 0,60–0,94 atau keragaman genetik sebesar 16–40% (Gambar 3).

Pada nilai koefisien kemiripan 0,84, tanaman kontrol berada satu kelompok dengan 4 planlet *J. curcas*. Planlet *J. curcas* hasil regenerasi embrio somatik terbagi lagi menjadi dua sub kelompok yaitu planlet yang berasal dari tahap proliferasi embrio somatik dengan penambahan 0 dan 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D dengan koefisien kemiripan 0,90 dan satu sub kelompok lain yakni planlet *J. curcas* yang berasal dari proliferasi embrio somatik dengan penambahan 1,5 dan 2 mg L⁻¹ 2,4-D dengan koefisien kemiripan 0,94. Hal ini menunjukkan bahwa jarak genetik antara tanaman kontrol dengan keempat planlet lainnya cukup dekat dan tidak terdapat



Gambar 3. Dendogram koefisien similaritas tunas *J. curcas* dari lapang dengan planlet hasil regenerasi embrio somatik berdasarkan penanda ISSR hasil analisis gerombol dengan metode UPGMA. (Keterangan: Kontrol: Tunas tanaman dari lapang, planlet 1, 2, 3, 4, dan 5 berturut-turut adalah planlet yang berasal dari embrio somatik pada media MS yang mengandung 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, dan 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D)



Gambar 4. Variasi morfologi daun *J. curcas curcas* kultivar Dompu tanaman lapang (kontrol) dan planlet hasil regenerasi embrio somatik

perbedaan yang signifikan karena variasi somaklonal yang terjadi rendah. Jarak genetik terjauh terjadi antara tanaman kontrol dengan planlet 3 (1 mg L^{-1} 2,4-D) dengan koefisien kemiripan 0,60. Hal ini menunjukkan bahwa variasi somaklonal yang terbesar terjadi pada planlet yang diregenerasikan dari tahap proliferasi embrio somatik dengan penambahan 1 mg L^{-1} 2,4-D (Gambar 3).

Selain berdasarkan penanda ISSR, perbedaan akibat variasi somaklonal juga terlihat pada sampel daun tanaman *J. curcas* antara kontrol dengan planlet hasil regenerasi embrio somatik. Dilihat dari segi warna, bentuk, tekstur serta morfologi terlihat bahwa daun muda planlet *J. curcas* pada planlet 3 memiliki perbedaan yang paling mencolok apabila dibandingkan dengan kontrol (tanaman dari lapang) maupun planlet *J. curcas* lainnya. Warna daun terlihat hijau muda kekuningan dengan ujung daun runcing. Permukaan daun tipis dan tidak adanya lapisan lilin (Gambar 4).

KESIMPULAN

Variasi somaklonal yang tinggi terjadi pada planlet *J. curcas* yang diregenerasikan

dari tahap proliferasi embrio somatik pada media MS dengan penambahan 1 mg L^{-1} 2,4-D. Jarak genetik antara tanaman kontrol dengan keempat planlet lainnya (perlakuan 0; 0,5; 1,5 dan 2,0 mg L^{-1} 2,4-D) cukup dekat dan tidak terdapat perbedaan signifikan karena variasi somaklonal yang terjadi kecil. Semakin tinggi proliferasi embrio somatik pada fase globular maka variasi somaklonal semakin meningkat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Yudiansyah S.Si dari Laboratorium Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman IPB yang telah membantu dalam kegiatan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Al Hafiih E (2012) Studi induksi dan pendewasaan embrio somatik jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan berbagai jenis eksplan dan zat pengatur tumbuh. Thesis, IPB Bogor
- Anil VS, Bennur S, Lobo S (2018) Somaclonal variations for crop improvement:

- Selection for disease resistant variants *in vitro*. *Plant Sci Today* 5: 44–54. doi: 10.14719/pst.2018.5.2.382
- Arya IGM, Indradewa D (2011) Kajian fisiologis dan agronomis ketahanan kekeringan varietas tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) di lahan pasir pantai di Kabupaten Purworejo. Disertasi, UGM Yogyakarta
- Bandyopadhyay S, Hamill JD (2000) Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. *Ann Bot* 86: 237–244. doi: 10.1006/anbo.2000.1192
- Bairu WM, Aremu AO, Staden JV (2011) Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63: 147–173. doi: 10.1007/s10725-010-9554-x
- Baruah J, Gogoi B, Das K, Ahmed NM, Sarmah DK, Lal M, Bhau BS (2017) Genetic diversity study amongst *Cymbopogon* species from NE-India using RAPD and ISSR markers. *Ind Crops Prod* 95: 235–243. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.10.022
- Bello-Bello JJ, Iglesias-Andreu LG, Aviles-Vinas SA, Gomez-Uc E, Canto-Flick A, Santana-Buzzy N (2014) Somaclonal variation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as assessed ISSR molecular markers. *Hort Sci* 49: 481–485. doi: 10.21273/hortsci.49.4.481
- Dey T, Saha S, Ghosh PD (2015) Somaclonal variation among somatic embryo derived plants — Evaluation of agronomically important somaclones and detection of genetic changes by RAPD in *Cymbopogon winterianus*. *South Afr J Bot* 96: 112–121. doi: 10.1016/j.sajb.2014.10.010
- Duarte AB, Gomes WS, Nietzsche S, Pereira MCT, Rodrigues BRA, Ferreira LB, Paixão PTM (2018) Genetic diversity between and within full-sib families of *Jatropha* using ISSR markers. *Ind Crops Prod* 124: 899–905. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.08.066
- Hasnam (2011) Prospect of genetics improvement of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Perspektif* 10: 70–80
- Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ (2014) Protocol: A simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10: 21. doi: 10.1186/1746-4811-10-21
- Krishna H, Alizadeh M, Singh D, Singh U, Chauvan N, Eftekhari M, Sadh RK (2016) Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* 6: 54. doi: 10.1007/s13205-016-0389-7
- Kumar RS, Parthiban KT, Rao G (2009) Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol Biol Rep* 36: 1951–1956. doi: 10.1007/s11033-008-9404-3
- Laviola BG, Alves AA, Rosado TB, Bhering LL, Formighieri EF, de Azevedo Peixoto L (2018) Establishment of new strategies to quantify and increase the variability in the Brazilian *Jatropha* genotypes. *Ind Crop Prod* 117: 216–223. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.03.003
- Leva AR, Petrucci R, Rinaldi LMR (2012) Somaclonal variation in tissue culture: A case study with olive. In: Leva AR, Rinaldi LMR (eds) *Recent Advances in Plant In vitro Culture*. Intech, London. doi: 10.5772/50367
- Manil T, Senthil K (2011) Multiplication of chrysanthemum through somatic embryogenesis. *Asian J Pharm Technol* 1: 13–16. Corpus ID: 89742871
- Mamiya K, Sakamoto Y (2001) A Method to procedure encapsulatable units for synthetic seed in *Asparagus officinalis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 64: 27–32. doi: 10.1023/A:1010620313812
- Mattjik NA (2005) Peranan kultur jaringan dalam perbaikan tanaman. Orasi Ilmiah Guru Besar Tetap Kultur Jaringan. Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Naz R, Anis M, Alatar AA (2016) ISSR marker-based detection of genomic stability in *Cassia occidentalis* L. plantlets derived from somatic embryogenesis. *Eng Life Sci* 16: 17–24. doi: 10.1002/elsc.201500050

- Rohlf FJ (1998) NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.02i. Exeter Software, New York
- Romeida A, Sutjahjo SH, Purwito A, Sukma D, Rustikawati (2012) Variasi genetik mutan angrek *Spathoglottis plicata* Blume. berdasarkan marker ISSR. J Agron Indones 40: 218–224. doi: 10.24831/jai.v40i3.6829
- Rudiyanto, Efendi D, Ermayanti TM (2014a) Perlakuan media untuk pertumbuhan planlet dan aklimatisasi tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* Linn.) hasil embriogenesis. Pp 373–380. Pros Sem Nas XXIII, Kimia dalam Industri dan Lingkungan
- Rudiyanto, Efendi D, Ermayanti TM (2014b) Somatic embryo germination of *Jatropha curcas* L. in presence of sucrose and poly ethylene glycol (PEG). Ann Bogor 18: 35–43. doi: 10.14203/ann.bogor.2014.v18.n1.35-43
- Sá O, Pereira JA, Baptista P (2011) Optimization of DNA extraction for RAPD and ISSR analysis of *Arbutus unedo* L. leaves. Int J Mol Sci 12: 4156–4164. doi: 10.3390/ijms12064156
- Santoso BB, Hariyadi, Purwoko BS (2011) Pola peningkatan hasil tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) ekotipe Lombok Barat selama empat tahun siklus produksi. J Agron Indones 39: 137–143. doi: 10.24831/jai.v39i2.15424
- Sánchez-Velázquez JU, Pacheco N, López-Puc G, Ramos-Díaz A (2018) Behavior of genetic diversity in F1 crosses of selected accessions of *J. curcas*. Ind Crops Prod 122: 669–674. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.05.029
- Vitamvas J, Viehmannova I, Cepkova PH, Mrhalova H, Eliasova K (2019) Assessment of somaclonal variation in indirect morphogenesis-derived plants of *Arracacia xanthorrhiza*. Pesq Agropec Bras 54: e301. doi: 10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.00301
- Wang G, Xu C, Yan S, Xu B (2019) An efficient somatic embryo liquid culture system for potential use in large-scale and synchronic production of *Anthurium andraeanum* seedlings. Front Plant Sci 10: 29. doi: 10.3389/fpls.2019.00029
- Widiastuti A, Sobir, Suhartanto MR (2013) Analisis keragaman genetik manggis (*Garcinia mangostana*) diiradiasi dengan sinar gamma berdasarkan penanda ISSR. Bioteknol 10: 15–22. doi: 10.13057/biotek/c100103