

Identifikasi WIN1 (*Wax Inducer1*) Pada Tanaman Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz)

Lailiyah Maulidatul Hasanah^{1*}, Agung Nugroho Puspito², Sattya Arimurti¹,
Mukhamad Su'udi¹

¹Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember

²Pasca Sarjana, Universitas Jember

Abstract

Cultivable crops in Indonesia are very diverse, including many varieties of rice, corn and cassava. However, agricultural land in Indonesia is shrinking every year as consequences of the increasing population size. There is still large area of dry sub optimal land in Indonesia that under utilized, this area can be optimized as agricultural land. Cassava is a well-known crop with high resistance to drought, they have potential to be cultivated on dry land. The first step of cassava plant breeding for cultivation in sub optimal land is to characterize the drought resistance genes in the plant, one of them is WIN1 (*Wax Inducer 1*). To characterize the gene first DNA were isolated from the leaves of cassava varieties Adira 1 and Malang 6, followed by amplification by PCR, and sequencing analysis. The results showed that the Adira 1 had the same amino acid sequence as the AM560-2 cultivar found in GenBank, while Malang 6 variety have one amino acid difference. The difference originated from genetic mutation in WIN1 and might affecting HCN (Hydrogen cyanide) content in commercial cassava Adira 1 and industrial cassava varieties Malang 6.

Keywords: Cassava, Drought tolerance, Sequencing, Sub optimal, WIN1

Abstrak

Tanaman pangan di Indonesia sangat beragam termasuk diantaranya padi, jagung dan ubi kayu. Namun lahan pertanian di Indonesia semakin sempit seiring dengan laju pertumbuhan penduduk yang semakin tinggi. Lahan kering (sub optimal) di Indonesia masih banyak yang belum dimanfaatkan, yang sebenarnya bisa dioptimalkan sebagai lahan pertanian. Tanaman pangan yang memiliki tingkat ketahanan lebih tinggi terhadap lahan kering adalah tanaman ubi kayu, sehingga berpotensi untuk ditanam pada lahan kering. Tahap pertama pemuliaan tanaman ubi kayu adalah mengetahui karakterisasi gen pada tanaman tersebut salah satunya yaitu *WIN1*. Metode pertama yang dilakukan adalah isolasi DNA daun ubi kayu varietas Adira 1 dan Malang 6, kemudian amplifikasi dengan PCR, dan analisis sekuensing. Hasil menunjukkan tanaman ubi kayu Adira 1 memiliki asam amino yang sama dengan kultivar AM560-2 yang terdapat pada GenBank, sedangkan pada varietas Malang 6 terdapat satu asam amino yang berbeda. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh adanya mutasi gen pada varietas ubi kayu serta perbedaan kandungan HCN pada ubi kayu pangan varietas Adira 1, dan ubi kayu industri varietas Malang 6.

Kata kunci: Sekuensing, Sub optimal, Tahan kering, Ubi kayu, WIN1

* Corresponding Author: Mukhamad Su'udi, email : msuudi52@gmail.com Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember

Pendahuluan

Tanaman memerlukan air yang cukup untuk perkembangan dan pertumbuhan. Fungsi seluler dan reproduksi dari tanaman dapat terganggu apabila kebutuhan airnya tidak tercukupi (Budi *et al.*, 2019). Kondisi kering yang berlangsung secara terus menerus dapat menurunkan produktivitas tanaman pangan seperti padi, jagung, dan ubi kayu. Pengaruh kondisi kering yang dapat menurunkan produktivitas tanaman pangan dapat mengurangi ketahanan pangan dunia, sehingga perlu adanya peningkatan toleransi varietas tanaman yang mampu bertahan pada kondisi kering tersebut.

Tanaman secara alami memiliki kemampuan untuk mengatasi kekeringan dengan mengembangkan mekanisme fisiologis dan biokimia untuk beradaptasi pada kondisi kekeringan. Adaptasi tumbuhan tersebut dapat berupa mekanisme penutupan stomata, deposisi lilin epidermis, akumulasi osmolit, dan memperlambat pertumbuhan (Al-Abdallat *et al.*, 2014). Kemampuan tanaman dalam beradaptasi pada kondisi kering juga terdapat pada tanaman pangan, namun setiap tanaman pangan memiliki tingkat ketahanan yang berbeda. Tanaman pangan yang memiliki ketahanan tertinggi pada kondisi kering adalah ubi kayu apabila dibandingkan dengan padi dan jagung (Medika *et al.*, 2016). Toleransi ubi kayu terhadap cekaman kering yang lebih tinggi menunjukkan bahwa ubi kayu memiliki potensi lebih besar untuk ditingkatkan menjadi varietas tahan kering dengan keunggulan yang dimilikinya.

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan tanaman yang termasuk dalam suku *Euphorbiaceae* (Caniago *et al.*, 2014). Tanaman ini dapat diperbanyak dengan

menggunakan stek batang dan memiliki varietas yang sangat beragam. Setiap varietas dari tanaman ubi kayu memiliki ciri morfologi yang berbeda dari bentuk daun, tangkai daun, batang, hingga daging umbi. Morfologi ubi kayu secara keseluruhan terdapat buah, bunga, daun pucuk, daun dewasa, batang, dan umbi (Restiani *et al.*, 2014).

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 (Fitriani *et al.*, 2019). Umbi ubi kayu telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan serta digunakan untuk bahan baku industri seperti MOCAP dan tepung tapioka yang rendah amilum namun memiliki kadar amilopektin tinggi. Kandungan amilopektin yang tinggi pada tepung tapioka hanya ditemukan pada tepung tapioka yang berbahan dasar ubi kayu (Silalahi *et al.*, 2019).

Ubi kayu yang memiliki potensi sebagai bahan pangan, pakan dan bahan baku industri yang tahan terhadap kondisi kering. Namun, pada kondisi cekaman kering tingkat produktivitas ubi kayu menurun dan dapat menyebabkan kematian pada tanaman tersebut. Sehingga toleransi ubi kayu terhadap cekaman kering perlu ditingkatkan lagi, agar produktivitasnya dapat meningkat. Oleh karena itu, perlu dilakukan pemuliaan tanaman ubi kayu untuk menjaga produktivitas ubi kayu tetap baik pada lahan kering. Teknik pemuliaan yang paling efektif untuk tanaman ubi kayu yaitu dengan menggunakan teknik molekuler, karena waktu pembungaan ubi kayu yang cukup lama berkisar antara 8-10 bulan yang dipengaruhi oleh genotip serta

kondisi lingkungan (Yuliadi et al., 2011), sehingga pemuliaan tanaman ubi kayu menggunakan teknik konvensional (breeding) kurang efektif untuk dilakukan. Teknik pemuliaan tanaman secara molekuler dapat diawali dengan memahami karakteristik dari gen yang akan digunakan sebagai marka gen toleran kekeringan. Salah satu gen tahan kering yang sudah diketahui terdapat pada tanaman arabidopsis, gandum, murbei, dan tomat yaitu WIN1 (*Wax Inducer1*). Gen ini diketahui mampu mengakumulasi biosintesis kutikula (Kannangara dkk., 2007). Kutikula dapat menjaga air dalam tubuh tanaman serta mengurangi transpirasi air non stomata sehingga dapat mengurangi dehidrasi sel (Schreiber, 2010).

Salah satu faktor transkripsi pertama yang diidentifikasi sebagai regulator biosintesis kutikula adalah AP2 yang merupakan domain *Wax Inducer1* (WIN1) (Aharoni dkk., 2004). Gen ini berfungsi untuk meningkatkan efisiensi penggunaan air dengan memodifikasi sifat difusif daun karena akumulasi lilin tingkat tinggi. Gen WIN1 pada *Arabidopsis thaliana* ditemukan dapat mengoordinasikan ekspresi gen dari sejumlah besar enzim yang terlibat dalam perpanjangan asam lemak dan pembentukan senyawa alifatik. Gen WIN1 pada tanaman ubi kayu, kedelai, kentang dan tanaman lainnya masih belum dieksplorasi. Tujuan dalam penelitian ini yaitu eksplorasi dan identifikasi gen WIN1 secara molekuler pada tanaman ubi kayu.

Metode Penelitian

Bahan Tanam

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah ubi kayu Varietas Adira 1 dan Malang 6 yang ditumbuhkan di dalam pot yang berumur 5 bulan.

Isolasi DNA dan Amplifikasi WIN1 Ubi Kayu

Isolasi DNA daun ubi kayu dilakukan menggunakan Kit GenEXTM (Gene All Biotechnology, Korea) sesuai dengan protokol yang direkomendasikan. Satu sampel ubi kayu pada setiap varietas masing-masing diambil daunnya. Secara singkat, 0,1 g daun ubi kayu ditambah dengan buffer PL dan RNase kemudian digerus hingga halus. Sampel yang sudah halus dipindahkan pada tube 1,5 ml dan diinkubasi pada thermoshaker selama 15 menit pada suhu 65°C. Sampel kemudian disentrifugasi dan supernatan dipindahkan pada tube baru kemudian ditambah buffer PP dan dihomogenkan. Sampel disentrifugasi dan diambil supernatnya kemudian ditambah dengan isopropanol. Selanjutnya, sampel disentrifugasi dan supernatan ditambah dengan etanol 70%. Sentrifugasi kembali dan supernatan dibuang. Pelet dikeringkan dalam vacuum dry, kemudian pelet yang sudah kering dilarutkan dengan buffer RE.

Untuk proses amplifikasi WIN1, DNA yang sudah berhasil diisolasi digunakan sebagai template dalam total volume reaksi 20 µl. Reaksi PCR dimulai dengan proses pencampuran komponen yang terdiri dari PCR premix, dH₂O, genom DNA serta forward primer dan reverse primer. Sekuen forward WIN1 (WIN1_1F, 5'-ATGGTGCAATCAAAGAAGTTCAGA-3'), dan sekuen reverse WIN1 (WIN1_636R, 5'-TCAGAGACAGAAGCTACCATCA-3').

Selanjutnya sampel dimasukkan dalam mesin PCR dengan kondisi diatur: Pre Denaturasi 95°C selama 5 menit, 35x siklus (Denaturasi 95°C selama 30 detik, Annealing 59°C selama 30 detik, Ekstensi 72°C selama 1 menit 20 detik) dan final ekstensi 72°C selama 5 menit. Produk PCR selanjutnya

dilihat di UV transilluminator. Pita yang muncul dibandingkan dengan marker yang digunakan (100 bp ladder, Bioneer).

Analisis Sekuen WIN1

Analisis sekuen dilakukan setelah mendapatkan hasil sekuensing. Sekuensing dilakukan menggunakan jasa 1st BASE Malaysia melalui PT Genetica Science dengan metode sanger. Analisis meliputi konfirmasi dengan BioEdit. Untuk meyakinkan kebenaran produk PCR tersebut maka dilakukan konfirmasi dengan menggunakan sekuensing. Sekuen yang didapatkan dianalisis tingkat keterbacaannya dengan menggunakan BioEdit dan langsung membandingkan dengan *peak* yang ada di kromatogram. Hasil tersebut selanjutnya dibandingkan dengan sekuen yang ada di database genom ubi kayu (Phytozome cassava). Untuk memaksimalkan proses analisis berikutnya maka dilakukan *recovery* dengan memanfaatkan sekuen yang ada di database. Tahap selanjutnya adalah sekuen *WIN1* diproses dengan menggunakan software

Spidey dan Bioinformatics.org. Hasil yang berupa sekuen asam amino dianalisa lebih lanjut dengan menggunakan BLAST dan Genedoc. Kontruksi pohon filogeni sekuen asam amino menggunakan MEGA-X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Program yang digunakan adalah *Neighbor-Joining* dengan *Bootstrap 1000* kali.

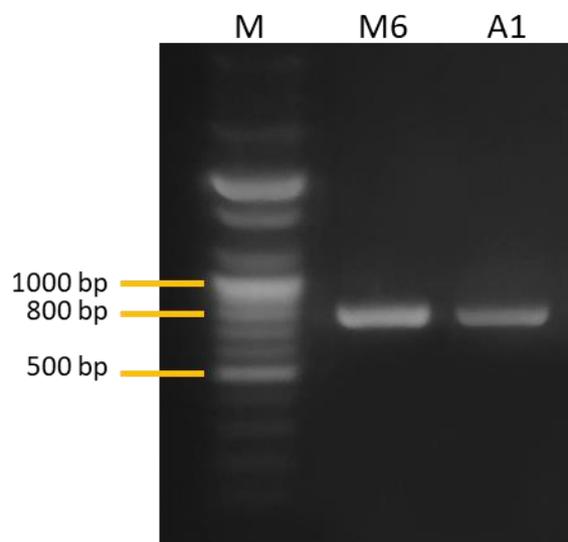
Hasil dan Pembahasan

Analisis PCR

Gen *WIN1* (*Wax Inducer1*) merupakan gen tahan kering yang telah ditemukan pada beberapa tanaman seperti gandum, murbei, tomat, padi dan *barrel medic* (*Medicago truncatula*) (Djemal & Khoudi, 2015; Sajeevan et al., 2017; Al-Abdallat et al., 2014; Wang et al., 2012; Bi et al., 2017). Amplifikasi *WIN1* pada penelitian ini berhasil dilakukan yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA yang tebal, jelas dan tunggal (*single band*) (Gambar 1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa gen *WIN1* juga terdapat pada tanaman ubi kayu varietas Malang 6 dan Adira 1.

Tabel 1.

Hasil amplifikasi PCR Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Keterangan: M (Marker), M6 (Ubi kayu Var. Malang 6), A1 (Ubi kayu Var. Adira 1)



Identifikasi WIN1 (*Wax Inducer1*) Pada Tanaman Ubi Kayu

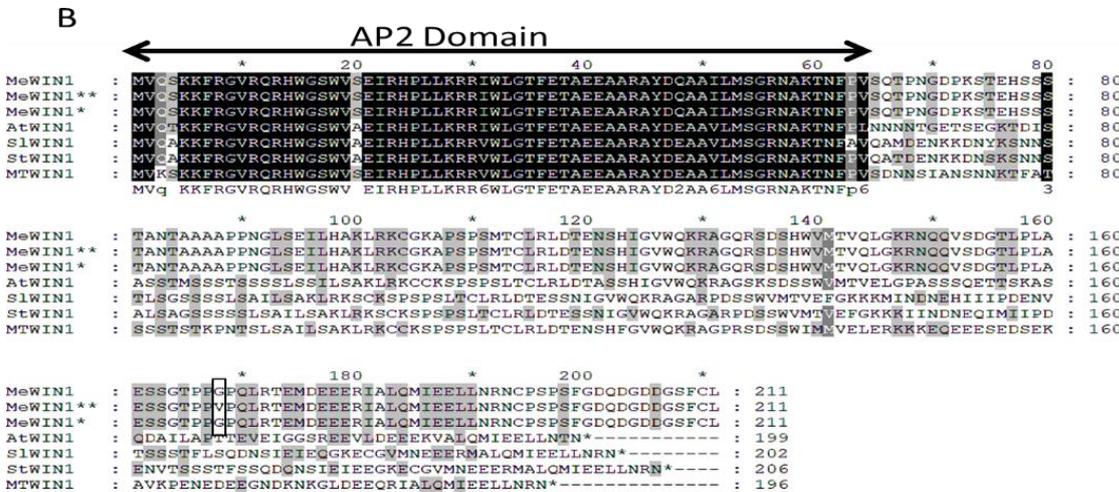
Gambar 1.

Hasil amplifikasi PCR Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Keterangan: M (Marker), M6 (Ubi kayu Var. Malang 6), A1 (Ubi kayu Var. Adira 1)



Gambar 2.

Hasil amplifikasi PCR Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Keterangan: M (Marker), M6 (Ubi kayu Var. Malang 6), A1 (Ubi kayu Var. Adira 1)



Keterangan: MeWIN1 (*Manihot esculenta* Crantz) (Phytozome,2021), MeWIN1** (*Manihot esculenta* Crantz) Var. Malang 6, MeWIN1* (*Manihot esculenta* Crantz) Var. Adira 1, AtWIN1 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), SlWIN1 (*Solanum lycopersicum* L.), StWIN1 (*Solanum tuberosum* L.), MtWIN1 (*Medicago truncatula* Gaertn.)

Sekuen WIN1 dari kedua varietas ubi kayu masing-masing dianalisis menggunakan BLAST. Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya tingkat kesamaan lebih tinggi antara varietas Adira 1 dan ubi

kayu kultivar AM560-2 pada tingkat asam amino (Wang dkk., 2014) dibandingkan dengan Malang 6. Kultivar AM560-2 merupakan kultivar ubi kayu yang sekuen WIN1 nya sudah terdaftar pada NCBI.

Setelah disejajarkan menggunakan Genedoc hasil menunjukkan bahwa urutan asam amino dari Adira 1 tidak ada beda dengan AM560-2 sedangkan varietas Malang 6 terdapat satu perbedaan urutan asam amino. Perbedaan asam amino terletak pada nomor 168 yaitu asam amino valin (V) pada varietas Malang 6 dan asam amino glisin (G) pada varietas Adira 1 dan kultivar AM560-2 (Gambar 2B). Perubahan tersebut muncul dikarenakan adanya nukleotida yang berubah pada posisi 504 bp dari guanin menjadi timin.

Ubi kayu varietas Malang 6 termasuk ubi kayu pahit dan beracun karena memiliki kadar asam sianida (HCN) pada umbi segar lebih dari 100 mgHCN/kg. Sedangkan ubi kayu varietas Adira 1 termasuk dalam varietas ubi kayu manis dengan kandungan asam sianida 40mgHCN/kg (Ariani dkk., 2017). Pemanfaatan varietas ubi kayu Malang 6 dan Adira 1 menyesuaikan dengan kandungan HCN yang dimiliki kedua varietas tersebut. Varietas Malang 6 dimanfaatkan sebagai bahan baku industri dalam pembuatan tepung tapioka dan juga MOCAF karena kadar HCN yang tinggi pada varietas Malang 6 dapat dihilangkan dengan proses pengeringan, fermentasi, dan juga pencucian melalui olahan industri. Sedangkan varietas Adira 1 dimanfaatkan sebagai ubi kayu pangan yang dapat langsung dikonsumsi dengan pengolahan sederhana (Balitkabi, 2014). Varietas Adira 1 dimanfaatkan sebagai ubi kayu pangan yang dapat langsung dikonsumsi dengan pengolahan sederhana. Kemungkinan terbesar kultivar AM560-2 termasuk ubi kayu pangan karena salah satu faktor yang mempengaruhi kandungan HCN adalah faktor genetik (Cardoso dkk., 2005). Pada tanaman ubi kayu, senyawa glukosida sianogen yang merupakan senyawa penyusun HCN disintesis di daun dan

diangkut ke umbi (Wheatley and Chuzel, 1993). Sedangkan kandungan lilin pada permukaan daun tanaman semakin meningkat dengan adanya ekspresi gen *WIN1* (Sajeewan et al., 2017). Sehingga pada kultivar AM560-2 menghasilkan urutan asam amino *WIN1* yang sama dengan varietas Adira 1. Namun terkait kultivar AM560-2 masih belum terdapat laporan khusus terkait pemanfaatannya.

Asam amino *WIN1* pada ubi kayu memiliki persentase homologi sebanyak 61,50% dengan *Arabidopsis thaliana*. Sedangkan persentase homologi dengan beberapa tanaman yang lain seperti tomat, kentang, dan medicago berturut-turut adalah 57,28%, 60,58% dan 63,96% (Zhuang dkk., 2012). *WIN1 (Wax Inducer1)* pertama kali diisolasi dari tanaman *Arabidopsis thaliana*, *WIN1* termasuk dalam domain AP2 yang berperan dalam regulasi dan biosintesis lilin dan kutikula (Aharoni dkk., 2004). Gen *WIN1* pada *Arabidopsis thaliana* ditemukan memiliki peran dalam mengkoordinasi ekspresi gen dari sejumlah besar enzim yang terlibat dalam perpanjangan asam lemak dan pembentukan senyawa alifatik. Profil ekspresi gen *WIN1* ditemukan dapat mempengaruhi banyak gen yang terlibat dalam biosintesis lilin. Over ekspresi *WIN1* pada *Arabidopsis thaliana* transgenik menunjukkan perbedaan morfologi dengan *Arabidopsis thaliana* wild-type yaitu daunnya lebih mengkilap dan hijau (Kannangara et al., 2007).

WIN1 menghasilkan akumulasi lilin yang signifikan dengan mengatur ekspresi banyak gen di jalur biosintesis lilin. Selain itu, *WIN1* telah terbukti memicu produksi lilin, meningkatkan toleransi kekeringan dan memodulasi permeabilitas kutikula ketika adanya over ekspresi dalam *Arabidopsis thaliana* (Aharoni dkk., 2004). Ekspresi gen *WIN1* pada beberapa tanaman

Identifikasi WIN1 (*Wax Inducer1*) Pada Tanaman Ubi Kayu

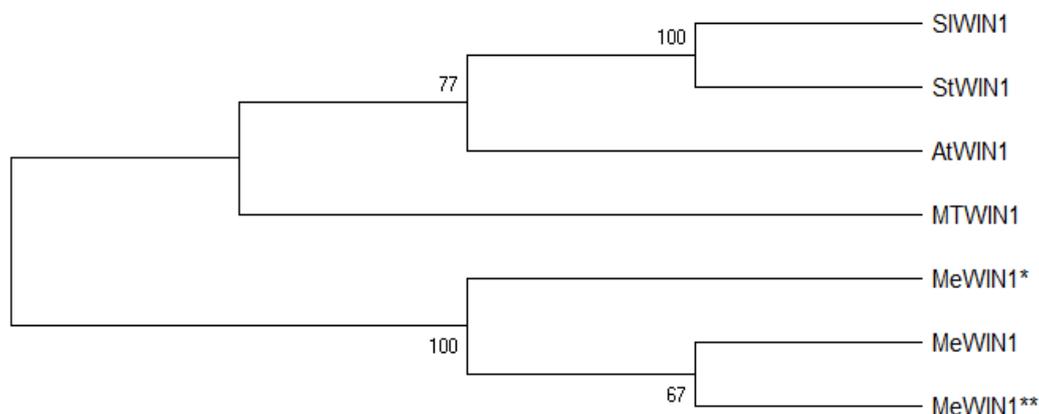
lain seperti tomat menggunakan karakterisasi gen ortolog terdekat WIN1 dalam tomat, yaitu SISHN1. Urutan asam amino dari protein SISHN1 menunjukkan tingkat kemiripan yang tinggi dengan protein Arabidopsis thaliana WIN1. Gen SISHN1 diinduksi sebagai respon terhadap kondisi kekeringan yang mengindikasikan peran potensial dalam memediasi toleransi terhadap stres dehidrasi (Al-Abdallat dkk., 2014).

Hasil analisis filogenetik menunjukkan tingkat kekerabatan WIN1 pada varietas Malang 6, Adira 1 dan kultivar AM560-2 sangat dekat. Kontruksi filogeni menunjukkan bahwa tingkat kekerabatan asam amino WIN1 pada ubi kayu lebih dekat

dengan *Medicago truncatula* dan selanjutnya adalah *Arabidopsis thaliana* (Gambar 3). *Medicago truncatula* merupakan salah satu tanaman legum yang memiliki ukuran genom diploid kecil, mudah untuk ditanam, dan memiliki siklus hidup yang relatif singkat (May, 2004). Kekerabatan ditentukan berdasarkan jarak terdekat dengan tanaman ubi kayu karena pembuatan pohon filogenetik menggunakan Neighbor-joining sehingga untuk menentukan tingkat kekerabatan yang dimiliki dapat dilihat dari jarak antara tanaman dalam pohon filogenetik, semakin dekat maka tingkat kekerabatan semakin tinggi dan memiliki kemungkinan berasal dari satu nenek moyang yang sama (Dharmayanti, 2011).

Gambar 3

Analisis filogenetik WIN1 ubi kayu (Manihot esculenta Crantz.) dan spesies tanaman yang lain.



Kesimpulan dan Saran Kesimpulan

Karakterisasi WIN1 pada tanaman ubi kayu varietas Adira 1 memiliki kemiripan dengan ubi kayu kultivar AM560-2 yang terdapat pada database NCBI, sedangkan WIN1 yang terdapat pada varietas Malang 6 terdapat satu perbedaan asam amino yaitu

valin. Sehingga membuat susunan asam amino berbeda.

Saran

Penelitian ini dapat dilanjutkan pada tingkat isolasi RNA sehingga pemanfaatan gen WIN1 pada tanaman ubi kayu dapat lebih aplikatif hingga pada tahap transformasi genetik.

Daftar Pustaka

- Aharoni, A., S. Dixit, R. Jetter, E. Thoenes, G. Van Arkel, dan A. Pereira. 2004. The shine clade of ap2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in arabidopsis w inside a box sign. *Plant Cell*. 16(9):2463–2480.
- Al-Abdallat, A. M., H. S. Al-Debei, J. Y. Ayad, dan S. Hasan. 2014. Over-expression of slshn1 gene improves drought tolerance by increasing cuticular wax accumulation in tomato. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(11):19499–19515.
- Ariani, L., T. Estiasih, dan E. Martati. 2017. Physicochemical characteristic of cassava (manihot utilisima) with different cyanide level. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 18(2):119–128.
- Bal itkabi. 2014. *Varietas Unggul Ubikayu Untuk Bahan Pangan Dan Bahan Industri*. Dalam Kementerian Pertanian Badan Litbang Pertanian
- Bi, H., S. Luang, Y. Li, N. Bazanova, N. Borisjuk, M. Hrmova, dan S. Lopato. 2017. Wheat drought-responsive wxpl transcription factors regulate cuticle biosynthesis genes. *Plant Molecular Biology*. 94(1–2):15–32.
- Budi, Rahmad Setia, Arif Anwar. 2019. Pengaruh cekaman kekeringan terhadap penampilan dan produksi beberapa galur padi asal sigambiri merah pada tanaman m4. *AGRILAND Jurnal Ilmu Pertanian*. 7(2):39:45.
- Caniago Murtiana, Dewi Indriyani Roslim, H. 2014. DESKRIPSI karakter morfologi ubi kayu (manihot esculenta crantz) juray dari kabupaten rokan hulu. 1(2):613–619.
- Cardoso, A. P., E. Mirione, M. Ernesto, F. Massaza, J. Cliff, M. Rezaul Haque, dan J. H. Bradbury. 2005. Processing of cassava roots to remove cyanogens. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18(5):451–460.
- Dharmayanti, N. I. 2011. Filogenetika molekular: metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*. 21(1):1–10.
- Djermal, R. dan H. Khoudi. 2015. Isolation and molecular characterization of a novel win1/shn1 ethylene-responsive transcription factor tdshn1 from durum wheat (triticum turgidum. l. subsp. durum). *Protoplasma*. 252(6):1461–1473.
- Fitriani, H., N. S. Hartati, dan E. Sudarmonowati. 2019. Evaluation of adaptation and production of three selected cassava (manihot esculenta crantz) in peat land area of central kalimantan. *Jurnal ILMU DASAR*. 20(2):75.
- Kannangara, R., C. Branigan, Y. Liu, T. Penfield, V. Rao, G. Mouille, H. Höfte, M. Pauly, J. L. Riechmann, dan P. Broun. 2007. The transcription factor win1/shn1 regulates cutin biosynthesis in arabidopsis thaliana. *Plant Cell*. 19(4):1278–1294.
- Laimeheriwa, B. M. 2018. Mekanisme terjadinya variasi individu dalam populasinya. (December)
- May, G. D. 2004. From model to crops: integrated medicago genomics for alfalfa improvement. *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*. 325–332.
- Medika Cherli, Zainal Abidin, E. K. 2016. DAMPAK el nino terhadap produksi dan pendapatan agroindustri berbasis singkong di desa karang anyar kecamatan gedongtataan kabupaten pesawaran. 4(4):342–350.
- Restiani Rini , Dewi Indriyani Roslim, H. M. 2014. KARAKTER morfologi ubi kayu

- (manihot esculenta crantz) hijau dari kabupaten pelalawan. 1(2):619–623.
- Sajeevan, R. S., K. N. Nataraja, K. S. Shivashankara, N. Pallavi, D. S. Gurumurthy, dan M. B. Shivanna. 2017. Expression of arabidopsis shn1 in indian mulberry (*morus indica* l.) increases leaf surface wax content and reduces post-harvest water loss. *Frontiers in Plant Science*. 8(April):1–13.
- Schreiber, L. 2010. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science*. 15(10):546–553.
- Silalahi, K. J. A., S. D. Utomo, A. Edy, dan N. Sa'diyah. 2019. EVALUASI karakter morfologi dan agronomi ubi kayu (*manihot esculenta crantz*) 13 populasi f 1 di bandar lampung. *Jurnal Agrotek Tropika*. 7(1):281.
- Wang, W., B. Feng, J. Xiao, Z. Xia, X. Zhou, P. Li, W. Zhang, Y. Wang, B. L. Møller, P. Zhang, M. C. Luo, G. Xiao, J. Liu, J. Yang, S. Chen, P. D. Rabinowicz, X. Chen, H. Bin Zhang, H. Ceballos, Q. Lou, M. Zou, L. J. C. B. Carvalho, C. Zeng, J. Xia, S. Sun, Y. Fu, H. Wang, C. Lu, M. Ruan, S. Zhou, Z. Wu, H. Liu, R. M. Kannangara, K. Jørgensen, R. L. Neale, M. Bonde, N. Heinz, W. Zhu, S. Wang, Y. Zhang, K. Pan, M. Wen, P. A. Ma, Z. Li, M. Hu, W. Liao, W. Hu, S. Zhang, J. Pei, A. Guo, J. Guo, J. Zhang, Z. Zhang, J. Ye, W. Ou, Y. Ma, X. Liu, L. J. Tallon, K. Galens, S. Ott, J. Huang, J. Xue, F. An, Q. Yao, X. Lu, M. Fregene, L. A. B. López-Lavalle, J. Wu, F. M. You, M. Chen, S. Hu, G. Wu, S. Zhong, P. Ling, Y. Chen, Q. Wang, G. Liu, B. Liu, K. Li, dan M. Peng. 2014. Cassava genome from a wild ancestor to cultivated varieties. *Nature Communications*. 5
- Wang, Y., L. Wan, L. Zhang, Z. Zhang, H. Zhang, R. Quan, S. Zhou, dan R. Huang. 2012. An ethylene response factor *oswr1* responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice. *Plant Molecular Biology*. 78(3):275–288.
- Wheatley, C.C. and Chuzel, G. 1993. *Cassava: The Nature of the Tuber and Use as a Raw Material*
- Yuliadi, E., Sunyoto., Kristina, A. dan A. 2011. Aplikasi paclobutrazol melalui daun tanaman ubi kayu (*manihot esculenta crantz*.) untuk merangsang pembungaan dini di dataran rendah. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 12(1):50–57.
- Zhuang, Y., X. Zhou, dan S. Wang. 2012. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Plant Systematics and Evolution = Entwicklungsgeschichte Und Systematik Der Pflanzen*. 298(7):3389–3402.