

**PERBANDINGAN EFEKTIFITAS METODE CTAB-POREBSKI
DAN METODE CTAB-TANAKA DALAM ISOLASI DNA
DAUN MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)**

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan
Mencapai Derajat Sarjana Sains S-1

Program Studi Biologi



Disusun oleh :

Royan Arief Abdul Lukman
NIM : 05640017

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA
2010**



Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga

FM-UINSK-BM-05-07/R0

PENGESAHAN SKRIPSI/TUGAS AKHIR

Nomor : UIN.02/D.ST/PP.01.1/683/2010

Skripsi/Tugas Akhir dengan judul : Perbandingan Efektifitas Metode CTAB-Porebski dan Metode CTAB-Tanaka Dalam Isolasi DNA Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Nama : Royan Arief Abdul Lukman

NIM : 05640017

Telah dimunaqasyahkan pada : 24 Februari 2010

Nilai Munaqasyah : A

Dan dinyatakan telah diterima oleh Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga

TIM MUNAQASYAH :

Ketua Sidang

Arifah Khushnuryani, M.Si
NIP.19750515 200003 2 001

Penguji I

Pilkeska Hiranurpika, M.Si

Penguji II

Nurpuji Mumpuni, S.Si, M.Kes

Yogyakarta, 11 Maret 2010
UIN Sunan Kalijaga
Fakultas Sains dan Teknologi
Dekan



Dra. Maizer Said Nahdi, M.Si
NIP. 19550427 198403 2 001



SURAT PERSETUJUAN SKRIPSI/TUGAS AKHIR

Hal : Persetujuan Skripsi / Tugas Akhir
Lamp : -

Kepada :

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

Di Yogyakarta

Assalamu'alaikum wr. wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku pembimbing berpendapat bahwa skripsi saudara :

Nama : Royan Arief Abdul Lukman

NIM : 05640017

Judul skripsi : **Perbandingan Efektifitas Metode CTAB-Porebski dan Metode CTAB-Tanaka Dalam Isolasi DNA Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)**

Sudah dapat diajukan kembali kepada Fakultas Sains dan Teknologi Program Studi Biologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Strata Satu dalam bidang Biologi.

Dengan ini kami mengharap agar skripsi/tugas akhir saudara tersebut di atas dapat segera dimunaqasyahkan. Atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

Wassalamu'alaikum wr.wb.

Yogyakarta, 01 Februari 2010

Pembimbing I

Arifah Khushuryani, M.Si
NIP. 19750515-200003-2-001

Pembimbing II

Jumailatus Sholihah, S.Si
NIP. 19760624-200501-2-007



SURAT PERSETUJUAN SKRIPSI/TUGAS AKHIR

Hal : Persetujuan Skripsi / Tugas Akhir

Lamp : -

Kepada :

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

Di Yogyakarta

Assalamu'alaikum wr. wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku pembimbing berpendapat bahwa skripsi saudara :

Nama : Royan Arief Abdul Lukman

NIM : 05640017

Judul skripsi : **Perbandingan Efektifitas Metode CTAB-Porebski dan Metode CTAB-Tanaka Dalam Isolasi DNA Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)**

Sudah dapat diajukan kembali kepada Fakultas Sains dan Teknologi Program Studi Biologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Strata Satu dalam bidang Biologi.

Demikian atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Yogyakarta, 01 Februari 2010

Konsultan

Arifah Khusnuryani, M.Si
NIP. 19750515-200003-2-001

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Royan Arief Abdul lukman
NIM : 05640017
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, bahwa skripsi saya yang berjudul :

Perbandingan Efektifitas Metode CTAB-Porebski dan Metode CTAB-Tanaka Dalam Isolasi DNA Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Adalah asli hasil penelitian saya sendiri dan bukan plagiasi hasil karya orang lain.

Yogyakarta, 01 Februari 2010

Yang menyatakan



Royan Arief Abdul Lukman
NIM. 05640017

KATA PENGANTAR

الْحَمْدُ لِلَّهِ الْمَحْمُودِ عَلَى كُلِّ حَالٍ، الْمَوْصُوفِ بِصِفَاتِ الْجَلَالِ وَالْكَمَالِ، الْمَعْرُوفِ بِمَزِيدِ
الْإِنْعَامِ وَالْإِفْضَالِ. أَحْمَدُهُ سُبْحَانَهُ وَهُوَ الْمَحْمُودُ عَلَى كُلِّ حَالٍ. وَأَشْهَدُ أَنْ لَا إِلَهَ إِلَّا اللَّهُ وَحْدَهُ
لَا شَرِيكَ لَهُ ذُو الْعِزَّةِ وَالْجَلَالِ وَأَشْهَدُ أَنَّ مُحَمَّدًا عَبْدُهُ وَرَسُولُهُ وَخَلِيلُهُ الصَّادِقُ الْمَقَالِ.
اللَّهُمَّ صَلِّ عَلَى عَبْدِكَ وَرَسُولِكَ مُحَمَّدٍ وَعَلَى آلِهِ وَأَصْحَابِهِ خَيْرَ صَحْبٍ وَآلٍ وَسَلِّمْ تَسْلِيمًا

Dengan menyebut nama Allah yang maha pengasih lagi maha penyayang. Segala puji syukur hanya bagi Allah yang senantiasa menganugerahkan kenikmatan dzhahir dan batin sehingga penyusun dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini dengan baik. Sholawat dan salam selalu penyusun sanjungkan kepada Nabi Muhammad saw, sanak keluarga, sahabat serta para pengikutnya yang memegang teguh ajarannya.

Skripsi dengan judul “Perbandingan Efektifitas Metode CTAB-Porebski Dan Metode CTAB-Tanaka Dalam Isolasi DNA Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)” merupakan hasil penelitian yang dilakukan di Laboratorium Genetika Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga dan merupakan hasil studi pustaka serta studi literatur jurnal penelitian ilmiah.

Dalam proses skripsi ini tentu melibatkan banyak pihak yang turut membantu penyusun dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi baik secara moril maupun materi, oleh karena itu penyusun menyampaikan banyak terima kasih *jazakumullahu khairan katsiron*. Dengan tidak mengurangi rasa hormat kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, maka secara khusus penyusun sampaikan terima kasih kepada :

1. Ibu Dra. Maizer Said Nahdi, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, beserta staf Pembantu Dekan yang telah menyediakan serta memberikan fasilitas dan persetujuan atas penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Arifah Khusnuryani, M.Si selaku Ketua Program Studi Biologi, Penasihat Akademik dan Dosen Pembimbing I, yang senantiasa bersedia memberikan nasihat dan bimbingan dalam penyusunan skripsi ini dengan baik.
3. Ibu Jumailatus Solihah, S.Si selaku Dosen Pembimbing II yang selalu bersedia meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan dan arahan sampai terselesaikannya penyusunan skripsi ini. Terima kasih banyak, dari ibu saya banyak belajar dan mendapat banyak pengalaman, semoga kita selalu dapat bekerja sama dalam kebaikan.
4. Ibu Pilkeska Hiranurpika, M.Si selaku penguji I, terima kasih atas saran dan bimbingannya.
5. Ibu Nurpuji Mumpuni, M.Kes selaku penguji II, terima kasih atas saran dan bimbingannya.
6. Bapak dan ibu Dosen Prodi Biologi : Mbak Anti Damayanti, S.Si (terima kasih untuk jurnalnya, good luck); Mbak Isma K, M.Si (terima kasih untuk buku skripsinya); Ibu Eka S, M.A; Pak Widodo, M.Pd; yang telah banyak berbagi pengalaman dan ilmunya.
7. Bapak Abdul Ghany dan mama Ismiyati sebagai orang tua dan guru besar dalam hidupku. Terima kasih atas kasih sayang dan pengorbanan yang telah engkau berikan. Do'a dan nasihatmu akan menjadi senjata dalam menggapai kesuksesanku dunia dan akhirat.

8. Saudara-saudaraku dan adik-adikku: Muhammad Imron Malik, Na'im, Putra, Nisa, Alifah, Izah, Isa, Lala, Bibil, A. Matin, kalian adalah inspirasiku. Mbak Nova, mbak Retno, mbak Ayuk, mas Kris, terima kasih atas dukungannya.
9. Keluarga besar Tentrem dan keluarga besar Margono: bude Watik, mbak Yuli, mbak Tutik, mbak Tari, terima kasih atas do'a dan bantuannya.
10. Sahabat-sahabatku dan teman-teman biologi: Hasim, Edy, Ari, Ucok, Nasir, Ninung, Riya, Agil, Imem, Mufti, Udin, Erwin, Agus, terima kasih atas semuanya, karena kalian diriku lebih bisa memahami arti persahabatan dan kebaikan dalam kehidupan.
11. Mbak Festy AR (terima kasih atas pendampingannya dalam penelitian) dan mas Doni Eko yang sudah banyak membantu dalam jalannya penelitian di Laboratorium Biologi.

Semoga segala bentuk dukungan dan bantuan yang diberikan kepada penyusun, mendapat balasan yang lebih dari Allah swt dan dapat menjadi amal sholih. Amin. Penyusun berharap karya ini dapat memberikan manfaat kebaikan bagi semua pihak. Penyusun juga sadar bahwa dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan, oleh karena itu saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk perbaikan dan pengembangan penelitian ini lebih lanjut.

Yogyakarta, 01 Februari 2010
Penyusun

Royan Arief Abdul Lukman
NIM. 05640017

MOTTO

"My life is for my God"

Orang yang berakal adalah :

*Orang yang mengingat Allah dalam keadaan apapun
(berdiri, duduk, berbaring) dan mereka memikirkan tentang
penciptaan langit dan bumi (seraya berkata) :*

*"Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan
sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami
dari siksa neraka."*

(QS. Ali Imron : 191)

'Kesuksesanku adalah Kebaikanku'

*"Maka kucurahkan segala kemampuan fisik dan intelektualitasku
untuk kebaikan umat, agar aku menjadi orang sukses"*

(Royan Arief A.L.)

HALAMAN PERSEMBAHAN

Kupersembahkan karya ini kepada :

*Bapak Abdul Ghaniy dan Mama Ismiyati, gelar sarjana ini
adalah salah satu buah dari kasih sayang dan
pengorbananmu kepada putramu.*

*Saudara-saudaraku dan para sahabatku tercinta,
kalianlah warna dalam perjuanganku,
terima kasih atas dukungannya.*

Dan

*Almamater yang kbanggakan
Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga
Yogyakarta*

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN NOTA DINAS	iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN	v
KATA PENGANTAR	vi
MOTTO	ix
HALAMAN PERSEMBAHAN	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
ABSTRAK	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Identifikasi Masalah	4
C. Batasan Masalah	5
D. Rumusan Masalah	5
E. Tujuan Penelitian	6
F. Manfaat Penelitian	6
BAB II. TELAAH PUSTAKA	7
A. Tinjauan Pustaka	7

B. Dasar Teori	8
1. Tumbuhan Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	8
2. DNA (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)	10
3. Isolasi DNA Tanaman	11
4. Metode Isolasi DNA (CTAB dan SDS)	13
5. Metode CTAB-Porebski (1997)	14
6. Metode CTAB-Tanaka (2001)	15
7. Spektrofotometri	16
8. Elektroforesis	16
BAB III. METODE PENELITIAN	18
A. Waktu dan Tempat Penelitian	18
B. Alat dan Bahan	18
1. Alat	18
2. Bahan	18
C. Alur Penelitian	19
D. Cara Kerja	21
1. Isolasi DNA Dengan Modifikasi CTAB-Porebski (1997)	21
2. Isolasi DNA Dengan Modifikasi CTAB-Tanaka (2001)	22
3. Analisis Kemurnian DNA Dengan Spektrofotometer	23
4. Analisis Kualitas DNA Dengan Elektroforesis	24
E. Pengamatan Parameter dan Analisis Hasil	25
1. Parameter Kemurnian dan Kualitas DNA	25
2. Analisis Hasil	25

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	26
A. Hasil Penelitian	26
1. Hasil Spektrofotometri	26
2. Hasil Elektroforesis	27
B. Pembahasan	28
1. Analisis Proses	28
2. Analisis Hasil Metode Spektrofotometri	34
3. Analisis Hasil Metode Elektroforesis	35
BAB V. PENUTUP	37
A. Kesimpulan	37
B. Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Data hasil analisis kemurnian DNA dengan spektrofotometer	27
Tabel 2. Perbedaan perlakuan dan penggunaan bahan antara metode CTAB-Porebski dan metode CTAB-Tanaka	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Daun melinjo muda	19
Gambar 2. Daun melinjo tua	19
Gambar 3. Bagan alur penelitian	20
Gambar 4. Gambaran elektroforesis DNA genom hasil isolasi	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Print out hasil spektrofotometer	41
Lampiran 2. Dokumentasi foto penelitian	42

**PERBANDINGAN EFEKTIFITAS METODE CTAB-POREBSKI
DAN METODE CTAB-TANAKA DALAM ISOLASI DNA
DAUN MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)**

**Royan Arief Abdul Lukman
05640017**

ABSTRAK

Banyaknya manfaat kesehatan yang dapat diperoleh dari tumbuhan melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dan masih sedikitnya penelitian molekuler tentang tumbuhan ini menjadi alasan perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai teknik isolasi DNA daun melinjo. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas metode isolasi DNA dari daun melinjo dengan membandingkan antara metode CTAB-Porebski dengan metode CTAB-Tanaka. Parameter yang digunakan adalah nilai kemurnian dan kualitas DNA hasil isolasi yang diperoleh dari analisis spektrofotometri dan analisis elektroforesis.

Sampel daun melinjo yang digunakan adalah daun muda dan daun tua. Untuk masing-masing sifat daun dilakukan dua kali pengulangan pada setiap metode. Konsentrasi DNA dan kemurniannya diukur dengan metode spektrofotometri, sedangkan untuk visualisasi DNA hasil isolasi menggunakan metode elektroforesis dengan agarose 0,4%. Metode analisis yang digunakan adalah metode deskriptif dengan menjelaskan data berdasar pada landasan teori dan studi literatur dari berbagai referensi dan jurnal ilmiah.

Hasil penelitian secara umum menunjukkan bahwa metode CTAB-Tanaka memberikan hasil isolasi DNA lebih baik pada parameter kemurnian DNA maupun kualitas DNA. Nilai kemurnian DNA yang diperoleh pada metode CTAB-Tanaka berkisar antara 1,7-2,0 sementara pada metode CTAB-Porebski berkisar antara 1,6-1,8. Gambaran elektroforesis DNA genom hasil isolasi dengan metode CTAB-Tanaka terlihat lebih jelas, walaupun masih terdapat *smear*, dibandingkan hasil isolasi dengan metode CTAB-Porebski. Baik hasil pengamatan konsentrasi, kemurnian maupun gambaran elektroforesis yang dihasilkan menunjukkan bahwa metode CTAB-Tanaka lebih efektif dari pada metode CTAB-Porebski.

Kata kunci : Isolasi DNA, metode CTAB-Porebski, metode CTAB-Tanaka, kemurnian DNA, kualitas DNA, spektrofotometri, elektroforesis, melinjo (*Gnetum gnemon* L.).

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Selama ini tumbuhan melinjo dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai sumber makanan alternatif, baik yang berasal dari daun, bunga, dan buahnya. Buah melinjo yang bentuknya seperti biji dapat dimakan atau diolah menjadi makanan *emping* yang memiliki nilai ekonomi cukup potensial. Bunga dan daun melinjo biasa digunakan untuk bahan sayur, sedangkan air daun melinjo juga dapat digunakan sebagai obat mata.¹ Selain itu tumbuhan melinjo juga memiliki beberapa keunggulan di antaranya struktur pohon yang kuat, lebih resisten terhadap hama, dan sekali berbuah dapat menghasilkan jumlah buah melinjo yang sangat banyak yaitu setiap pohon yang besar dapat menghasilkan sekitar 20.000-25.000 biji per tahun.²

Selain sebagai makanan alternatif, manfaat melinjo telah ditemukan oleh para ahli biologi dan kesehatan. Melinjo diketahui mengandung senyawa antioksidan yang cukup tinggi, sehingga sangat reaktif terhadap radikal bebas penyebab berbagai macam penyakit. Selain itu melinjo juga berpotensi sebagai antimikroba alami yang artinya melinjo juga bisa dipakai sebagai pengawet alami makanan sekaligus obat untuk penyakit yang disebabkan oleh

¹ Manner, H.I. *et al.*, *Gnetum gnemon (gnemon)*, (Hawai: Permanent Agriculture Resources (PAR). 2006). p 6-7.

² Anonim. *Melinjo* (artikel), (http://www.iptek.net.id/ind/teknologi_pangan. 2009a). Tanggal akses 13 Juli 2009.

bakteri.³ Akan tetapi di sisi lain melinjo juga mengandung kadar purin yang cukup tinggi, sehingga sangat berpotensi menyebabkan penyakit asam urat.

Walaupun saat ini melinjo telah diketahui banyak manfaatnya dari pada kerugiannya, tetapi penelitian molekuler ke arah genetik masih belum banyak dilakukan. Hal ini dimungkinkan karena tumbuhan melinjo belum banyak dikenal oleh masyarakat sebagai tumbuhan kesehatan dan proses pertumbuhannya relatif lebih lama. Sebagai langkah awal agar dapat menumbuhkan, mengembangkan dan merekayasa secara genetik melinjo sebagai tanaman kesehatan yang lebih produktif, maka tahap isolasi DNA sangatlah menentukan. Tahap ini merupakan langkah awal penelitian molekuler pada arah genetik, yaitu mencari metode isolasi DNA daun melinjo paling efektif dengan indikator utama berupa nilai kemurnian DNA dan kualitas DNA melalui visualisasi pergerakan DNA dengan elektroforesis.

Metode isolasi DNA tumbuhan yang umum digunakan adalah metode CTAB (*Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*) dan SDS (*Sodium Deodecyl Sulfate*). Akan tetapi, metode ini juga telah banyak mengalami modifikasi yang disesuaikan dengan tujuan isolasi dan jenis tumbuhan yang akan diisolasi DNAny, karena dengan tujuan isolasi dan sifat tumbuhan yang berbeda biasanya efektifitas dalam isolasi DNA juga berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan DNA yang murni dari daun melinjo. Kesulitan yang mungkin dihadapi dalam isolasi ini adalah adanya kandungan poliphenol dan polisakarida yang dapat mempengaruhi kemurnian DNA hasil isolasi.

³ Kato, *et al.*, *Gnetum Extract*. (European Patent Application. 2007). p. 1

Metode isolasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode CTAB dengan pertimbangan lebih efektif dari pada metode SDS⁴, yaitu dengan membandingkan antara metode CTAB-Porebski⁵ dengan metode CTAB-Tanaka⁶ untuk mencari tingkat efektifitas ekstraksi DNA daun melinjo yang paling tinggi. Sebelumnya pernah dilakukan penelitian Teknik Isolasi DNA dan Analisis PCR Gen pinII pada Genom Ubi Jalar oleh Sisharmini *et al.* (2001) dengan metode CTAB Porebski *et al.* (1997), Varadarajan dan Prakash (1991) dan metode CTAB Tanaka dan Nakatani (2001). Metode CTAB-Tanaka juga pernah diterapkan pada penelitian pengembangan marker CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*) untuk identifikasi kultivar ubi jalar.⁷

Selain itu, modifikasi CTAB juga pernah dilakukan oleh Porebski *et al.* (1997) untuk protokol ekstraksi DNA tanaman yang memiliki kandungan polisakarida dan poliphenol tinggi.⁸ Beberapa penelitian yang menggunakan metode CTAB-Porebski diantaranya protokol untuk isolasi DNA dari daun

⁴ El-Twab, M.H., *et al.*, *Extracting total genomic DNA of Chrysanthemum sensu lato by CTAB and SDS Without Both Liquid Nitrogen and Phenol*. (El-Minia: International Society of Chromosome Botany. 2008), p. 85.

⁵ Metode CTAB ini dimodifikasi oleh Sue Porebski, L. Grant Bailey dan Bernard R. Baum dalam penelitiannya yang berjudul *Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components* tahun 1997.

⁶ Metode CTAB ini dimodifikasi oleh M. Tanaka dan M. Nakatani dalam penelitiannya yang berjudul *Protocol for RAPD Analysis of Sweet Potato* tahun 2001.

⁷ Tanaka, M. *et al.*, *Development of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)-based markers for identification of sweetpotato cultivars*, (Okinawa: National Agricultural Research Center. 2009).p.1.

⁸ Porebski, S.L. *et al.*, *Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components*. (Kanada: Plant Molecular Biology Reporter. 1997), p. 8.

Trochetia boutoniana,⁹ dan analisis filogenetik molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (*Euphorbiaceae*) menggunakan urutan basa DNA daerah *internal transcribed spacer* (ITS).¹⁰ Metode CTAB-Porebski dan metode CTAB-Tanaka pada beberapa penelitian digunakan untuk ekstraksi DNA daun yang bergetah atau mengandung kadar poliphenol dan polisakarida tinggi seperti daun ubi jalar, daun *Trochetia boutoniana*, daun meniran (*Phyllanthus niruri* L) dan daun stroberi. Karena ada kesamaan sifat antara daun melinjo dengan beberapa jenis daun di atas yang cukup banyak memiliki kandungan getah (poliphenol), maka kedua metode CTAB ini akan diujikan pada daun melinjo dengan pertimbangan probabilitas tingkat kemurnian yang lebih tinggi.

B. Identifikasi Masalah

Beberapa masalah yang dapat diidentifikasi dalam penelitian ini adalah :

1. Banyaknya kandungan purin pada melinjo yang dapat menyebabkan penyakit asam urat.
2. Tumbuhan melinjo belum banyak dikenal oleh masyarakat sebagai tanaman kesehatan.
3. Penelitian molekuler ke arah genetik masih belum banyak dilakukan pada tumbuhan melinjo.
4. Adanya kandungan poliphenol dan polisakarida dalam daun melinjo.

⁹ Puchooa, D., et al., *A Protocol for the Isolation of DNA from Trochetia boutoniana*. (Mauritius: International Journal of Agriculture and Biology. 2005).p. 82.

¹⁰ Hidayat, T., et al., *Analisis Filogenetik Molekuler Pada Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae) Menggunakan Urutan Basa DNA Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS)*, (Bandung: Jurnal Matematika dan Sains. 2008).h. 17.

5. Adanya kandungan selulosa yang cukup banyak terutama pada daun tua.

C. Batasan Masalah

1. Penelitian ini difokuskan pada penelitian molekuler yaitu mencari metode isolasi DNA yang efektif.
2. Metode isolasi DNA yang digunakan adalah metode CTAB-Porebski dan metode CTAB-Tanaka.
3. Objek penelitian yang dijadikan sampel adalah daun melinjo muda dan tua.
4. Indikator efektifitas yang digunakan adalah nilai kemurnian DNA hasil spektrofotometer dan kualitas DNA hasil elektroforesis.

D. Rumusan Masalah

Dalam penelitian ini dapat diuraikan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Bagaimana efektifitas metode CTAB-Porebski (1997) terhadap kemurnian dan kualitas DNA hasil isolasi pada daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) ?
2. Bagaimana efektifitas metode CTAB-Tanaka (2001) terhadap kemurnian dan kualitas DNA hasil isolasi pada daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) ?
3. Bagaimana perbandingan efektifitas metode CTAB-Porebski (1997) dan metode CTAB-Tanaka (2001) terhadap kemurnian dan kualitas DNA hasil isolasi pada daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) ?
4. Faktor apa saja yang mempengaruhi tingkat efektifitas dalam isolasi DNA daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) pada metode CTAB-Porebski (1997) dan metode CTAB-Tanaka (2001) ?

E. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah :

1. Mengetahui efektifitas metode CTAB-Porebski (1997) terhadap nilai kemurnian dan kualitas DNA hasil isolasi pada daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.).
2. Mengetahui efektifitas metode CTAB-Tanaka (2001) terhadap nilai kemurnian dan kualitas DNA hasil isolasi pada daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.).
3. Mengetahui perbandingan efektifitas metode CTAB-Porebski (1997) dan metode CTAB-Tanaka (2001) terhadap nilai kemurnian dan kualitas DNA hasil isolasi pada daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.).
4. Mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat efektifitas dalam isolasi DNA daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.) pada metode CTAB-Porebski (1997) dan metode CTAB-Tanaka (2001).

F. Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Menambah kekayaan ilmu pengetahuan dan studi literatur di bidang biologi molekuler dan bioteknologi.
2. Memberikan pengetahuan awal pada penelitian berikutnya khususnya di bidang bioteknologi yang menggunakan teknik isolasi DNA genom pada daun melinjo (*Gnetum gnemon* L.).
3. Menambah studi literatur bagi praktisi dan pengembang produk pertanian transgenik khususnya pada tumbuhan melinjo (*Gnetum gnemon* L.).

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang Perbandingan Efektifitas Metode CTAB-Porebski dan Metode CTAB-Tanaka Dalam Isolasi DNA daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Efektifitas metode CTAB-Porebski menunjukkan hasil nilai kemurnian DNA (rasio A_{260}/A_{280}) bervariasi, untuk sampel daun melinjo muda nilainya 1,8 dan 1,6 sedangkan untuk sampel daun melinjo tua nilainya 1,8 dan 1,7. Sementara untuk kualitas DNA hasil isolasi pada gel elektroforesis menunjukkan tidak adanya pita DNA dan adanya *smear* yang diindikasikan RNA atau fragmen DNA.
2. Efektifitas metode CTAB-Tanaka menunjukkan hasil nilai kemurnian DNA (rasio A_{260}/A_{280}) berkisar antara 1,7-2,0, untuk sampel daun melinjo muda nilainya 1,8 dan untuk sampel daun melinjo tua nilainya 1,7 dan 2,0. Sementara untuk kualitas DNA hasil isolasi pada gel elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA yang cukup jelas dan adanya *smear* yang diindikasikan RNA atau fragmen DNA.
3. Perbandingan kedua metode terhadap nilai kemurnian DNA menunjukkan bahwa kedua metode belum bisa dibandingkan metode mana yang lebih efektif, karena selisih antar nilai kemurniannya tidak signifikan. Pada perbandingan kualitas DNA terlihat jelas metode CTAB-Tanaka memiliki

kualitas yang lebih baik dengan adanya pita DNA walaupun masih terlihat adanya *smear*, sedangkan pada metode CTAB-Porebski tidak terlihat adanya pita DNA dan hanya terlihat adanya *smear*.

4. Beberapa faktor yang mempengaruhi efektifitas metode yang meliputi nilai kemurnian dan kualitas DNA pada kedua metode adalah tidak digunakannya bahan enzim RNase sebagai pendegradasi RNA. Penggunaan phenol pada metode CTAB-Porebski juga diindikasikan dapat merusak sebagian rantai DNA. Tidak digunakannya bahan proteinase K pada metode CTAB-Tanaka menyebabkan kurang maksimalnya proses degradasi protein kontaminan. Selain faktor penggunaan bahan, perlakuan pada proses isolasi yang kurang maksimal dan kurangnya kehati-hatian juga dapat berpengaruh terhadap hasil yang diperoleh.

B. Saran

Penelitian ini merupakan tahap awal dari proses panjang penelitian molekuler yaitu untuk mencari metode yang paling efektif dalam isolasi DNA daun melinjo. Pada analisis kemurnian yang tertera adalah rasio A_{260}/A_{280} untuk asam nukleat dan belum spesifik pada DNA sehingga perlu dilakukan analisis lebih lanjut untuk mengetahui kemurnian DNA yang spesifik. Untuk analisis kualitas dengan elektroforesis masih sebatas melihat pita DNA yang muncul, agar hasil yang diperoleh lebih sempurna maka perlu ditambahkan DNA *marker* untuk mengetahui ukuran DNA yang diperoleh dalam satuan bp (*base pair*).

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. 1994. ***Biologi Molekuler Sel (mengenal sel) edisi kedua***. Jakarta: Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.
- Anonim. 2009.^a ***Melinjo***. http://www.iptek.net.id/ind/teknologi_pangan. Tanggal akses 13 Juli 2009.
- . 2009.^b ***Butylated Hydroxytoluene***. www.chemicaland21.com/lifescience/foco/BHT.htm. Tanggal akses 08 Oktober 2009.
- Ardiana, D. W. 2009. ***Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Pepaya dan Jeruk Dengan Menggunakan Modifikasi Bufer CTAB***. Solok: Buletin Teknik Pertanian Vol. 14 No.1: 12-16.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., and Mitchell, L.G. 2002. ***Biologi (edisi kelima)***. Jakarta: Erlangga.
- Elrod, S.L., and Stansfield, W.D. 2007. ***Genetika (edisi keempat)***. Jakarta: Erlangga.
- El-Twab, M.H., and Zahran, F.A. 2008. ***Extracting total genomic DNA of Chrysanthemum sensu lato by CTAB and SDS Without Both Liquid Nitrogen and Phenol***. International Society of Chromosome Botany 3: 83-88.
- Hadi, M., dan Nurlaila, I., 2008. ***Soliton dan DNA***. <http://www.nano.lipi.go.id/utama.cgi>. Tanggal akses 30 September 2009.
- Hidayat, T., Kusumawaty, D., Kusdianti, Yati, D.D., Muchtar, A.A., dan Mariana, D. 2008. ***Analisis Filogenetik Molekuler Pada Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae) Menggunakan Urutan Basa DNA Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS)***. Bandung: Jurnal Matematika dan Sains Vol. 13 No. 1.h.16-21.
- Kato, Eishin, Hosoda, and Fukushi. 2007. ***Gnetum Extract***. European Patent Application. <http://www.freepatentsonline.com/EP1790239A1:1-18>
- Lodhi, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden, and B.I. Reisch. 1994. ***A simple and efficient method for DNA extractions from grapevine cultivars, Vitis species and Ampelopsis***. Plant Molecular Biology Reporter 12(1): 6-13.

- Manner, H.I., and C.R. Elevitch. 2006. *Gnetum gnemon (gnemon)*, ver 1.1 In: Elevitch, C.R. (ed.). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Hawaii: Permanent Agriculture Resources (PAR) : 1-9.
- Nishiguchi, M.K., Doukakis, P., Egan, M., Kizirian, D., Philips, A., Prendini, L., Rosenbaum, H.C., Torres, E., Wyner, Y., DeSalle, R., and Giribet, G. 2002. *DNA Isolation Procedures (DNA Isolation from Plants and Algae)*. Methods and Tools in Biosciences and Medicine, Birkhauser Verlag Basel : 276-277.
- Porebski, S.L., Bailey, L.G., and Baum, B.R.. 1997. *Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components*. J. Plant Molecular Biology Reporter 15(1): 8-15.
- Puchooa, D. 2004. *A Simple, Rapid and Afficient Methode For The Extraction of Genomic DNA From Lychee*. Mauritius: African Journal of Biotechnology Vol. 3(4): 253-255.
- Puchooa, D., and Venkatasamy, K. 2005. *A Protocol for the Isolation of DNA from Trochetia boutoniana*. Mauritius: International Journal of Agriculture and Biology : 82-85..
- Sisharmini, A., Ambarwati, A.D., Santoso, T.J., Utami, D.W., dan Herman, M. 2001. *Teknik Isolasi DNA dan Analisis PCR Gen pinII pada Genom Ubi Jalar*. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian :125-132.
- Siswoyo, T.A., 2007. *Anti Oksidan dari Biji Melinjo*. www.temppointeraktif.com. Tanggal akses 13 Juli 2009.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Tanaka, M., Takahata, Y., Nakayama, H., Yoshinaga, M., Kumagai, T., and Nakatani, M. 2009. *Development of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)-based markers for identification of sweetpotato cultivars*. Okinawa: National Agricultural Research Center.
- Verheij, E.W.M. and Sukendar.1992. *Gentum Gnemon L.* In : Verheij, E.W.M. & Coronel, R.E. Plant Resources of South-East Asia No 2. Edible fruits and nuts. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia. p. 182 - 184
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.