

**“PENGARUH PENGGUNAAN NITROGEN CAIR DAN
BUFFER *Cetyltrimethylamonium Bromide* (CTAB) UNTUK
EKSTRAKSI DNA TERHADAP KUANTITAS DAN
KUALITAS DNA JAGUNG PULUT”**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Teknik**



Disusun Oleh :

FRISTY DAMANIK

NIM. 4512044046

**PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA
UNIVERSITAS BOSOWA
MAKASSAR**

2018

LEMBAR PERSETUJUAN

**PENGARUH PENGGUNAAN NITROGEN CAIR DAN BUFFER
Cetyltrimethylamonium Bromide (CTAB) UNTUK EKSTRAKSI DNA
TERHADAP KUANTITAS DNA JAGUNG PULUT**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Teknik**



Disusun oleh :

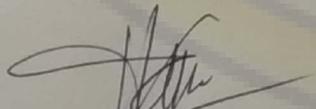
FRISTY DAMANIK

NIM. 4512044046

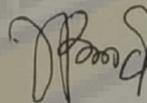
Telah diperiksa dan disetujui oleh :

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II



Dr. Hamsina, S.T., M.Si
NIDN : 0924067601



Hermawati, S.Si., M.Eng
NIDN : 0024077101

HALAMAN PENGESAHAN

“Pengaruh Penggunaan Nitrogen Cair Dan Buffer *Cetyltrimethylamonium Bromide* (CTAB) Untuk Ekstraksi DNA Terhadap Kuantitas dan Kualitas DNA Jagung Pulut”

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Teknik



Disusun Oleh

FRISTY DAMANIK
NIM. 4512044046

Skripsi ini telah diuji dan dinyatakan lulus
Pada tanggal 14 Maret 2018

Pembimbing

1. Dr. Hamsina, S.T., M.Si
2. Hermawati, S.Si., M.Eng

Tanda Tangan

.....
.....

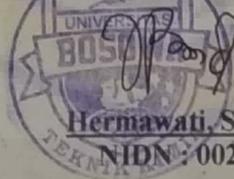
Penguji

1. Dr. Ridwan, S.T., M.Si
2. M. Tang, S.T., M.PKim

Tanda Tangan

.....
.....

Makassar, Maret 2018
Ketua Program Studi Teknik Kimia



Hermawati, S.Si., M.Eng
NIDN : 0024077101

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut yang diekstraksi menggunakan nitrogen cair, dan *buffer* CTAB serta melihat perbandingan kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut yang diekstraksi menggunakan nitrogen cair dan *buffer* CTAB.

Metode yang digunakan adalah isolasi DNA menggunakan nitrogen cair dan *buffer* CTAB. Uji kualitas dan kuantitas DNA menggunakan spektrofotometer, elektroforesis horizontal di gel agarosa dan elektroforesis vertikal di gel poliakrilamid.

Hasil Pengamatan dengan menggunakan nanophotometer kemurnian DNA yang diekstraksi dengan nitrogen cair bervariasi berkisar antara 1,328– 2,325 OD (*optical density*) dan konsentrasi DNA nya berkisar antara 82,3 – 225 ng/ μ l, sedangkan yang diekstraksi menggunakan Buffer CTAB kemurnian DNA nya berkisar antara 1,094 - 1,238 OD (*optical density*) dan konsentrasi DNA nya antara 214 – 239 ng/ μ l. Pengamatan dengan menggunakan elektroforesis horizontal di gel agarosa kuantitas DNA yang diekstraksi dengan nitrogen cair mempunyai konsentrasi yang bervariasi sedangkan yang diekstraksi dengan buffer CTAB konsentrasi hampir seragam 100 ng. Amplifikasi kualitas DNA dapat dilihat dari munculnya pita-pita DNA pada hasil akhir elektroforesis vertikal di gel *poliakrilamid* dimana terdapat 3 sampel pita DNA yang tidak muncul pada sample yang diekstraksi dengan nitrogen cair sedangkan yang diekstraksi dengan *buffer* CTAB muncul satu pita yang tebal disetiap sample yang menandakan tanaman tersebut tidak terkontaminasi dengan tanaman lain.

Disimpulkan bahwa ekstraksi daun jagung pulut menggunakan *buffer* CTAB lebih baik dibanding dengan menggunakan nitrogen cair karena hasil penggunaan *buffer* CTAB menunjukkan tingginya konsentrasi DNA yang didapat dan teramplifikasi lewat proses elektroforesis vertikal di gel *polyakrilamid*.

Kata kunci : Isolasi DNA, jagung pulut, konsentrasi DNA, kemurnian DNA

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-NYA penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik, Jurusan Teknik Kimia pada Fakultas Teknik Universitas Bosowa Makassar. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak penulis akan mengalami banyak kesulitan. Oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Ibu Dr. Hamsina, ST.,M.Si sebagai Dekan Fakultas Teknik sekaligus sebagai Dosen Pembimbing I yang telah memberikan saran dan masukan selama menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu Hermawati, S.Si.,M.Eng sebagai Ketua Jurusan Teknik Kimia sekaligus sebagai Dosen Pembimbing II yang telah membantu dan memberikan saran dan masukan selama proses penulisan skripsi ini.
3. Seluruh Dosen Pengajar Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Bosowa yang telah memberikan ilmu kepada penulis selama menjalani studi.
4. Ibu Nurmiaty Darwis, ST sebagai Laboran sekaligus admin di Jurusan Teknik Kimia yang telah banyak memberikan bantuan kepada penulis selama proses penulisan skripsi ini.
5. Keluarga besar saya yang telah memberikan bantuan dukungan material maupun moral; dan
6. Seluruh staff Laboratorium Balitsereal yang telah banyak membantu selama penelitian dan penulisan skripsi ini.

7. Dan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu namanya yang juga turut memberikan bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata Penulis berharap Tuhan Yang Maha Esa yang membalas semua kebaikan semua pihak yang membantu. Dan semoga ini bermanfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, Maret 2018

Penulis

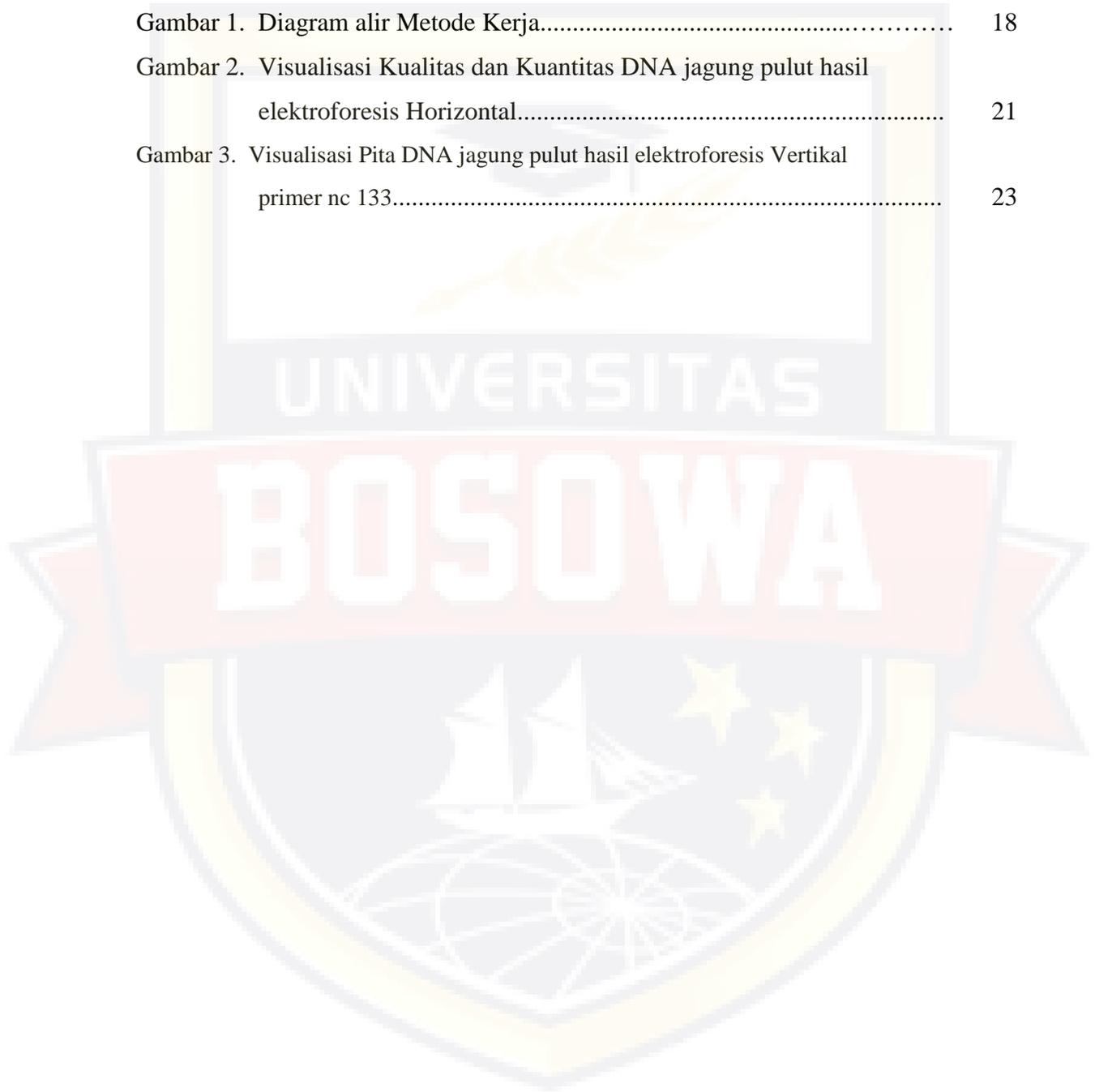
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	ii
INTISARI	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan.....	4
1.4. Manfaat.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Karakteristik Jagung.....	5
2.2. Isolasi DNA.....	7
2.3. Nitrogen.....	8
2.4. Cetyltrimethylamonium Bromide (CTAB).....	10
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	12
3.1. Waktu dan Tempat.....	12
3.2. Alat dan Bahan.....	12
3.2.1 Alat	12
3.2.2 Bahan.....	12
3.3. Prosedur Kerja.....	13
3.3.1 Isolasi DNA menggunakan buffer CTAB.....	13
3.3.2 Isolasi DNA menggunakan nitrogen cair.....	14
3.3.3 Uji kualitas dan kuantitas DNA di gel agarosa.....	15

3.3.4	Proses <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	16
3.3.5	Elektroforesis gel poliakrilamid.....	17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		19
4.1.	Hasil dan Pembahasan Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Jagung Pulut Menggunakan Alat Spektrofotometer	19
4.2	Hasil dan Pembahasan Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Jagung Pulut di Gel Agarosa dari Proses Elektroforesis Horizontal	21
4.3	Hasil dan Pembahasan Amplifikasi dari Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Jagung Pulut di Gel polyakrilamid melalui proses Elektroforesis Vertikal.....	23
BAB V PENUTUP.....		25
5.1.	Kesimpulan.....	25
5.2.	Saran.....	25
DAFTAR PUSTAKA.....		26
LAMPIRAN.....		28

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Diagram alir Metode Kerja.....	18
Gambar 2. Visualisasi Kualitas dan Kuantitas DNA jagung pulut hasil elektroforesis Horizontal.....	21
Gambar 3. Visualisasi Pita DNA jagung pulut hasil elektroforesis Vertikal primer nc 133.....	23



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Komposisi kimia jagung berdasarkan bobot kering.....	6
Tabel 2.4	Komponen pembuatan Buffer <i>Cetyltrimethylaminium Bromide</i> (CTAB).....	11
Tabel 4.1.1	Konsentrasi dan Kemurnian DNA Jagung Pulut.....	19
Tabel 4.2.1	Konsentrasi DNA jagung pulut yang di lihat dari pendaran cahaya di gel agarose	22



DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1	Pengenceran DNA Jagung Pulut dari Uji Kualitas dan kuantitas DNA di alat spektrofotometer.....	29
LAMPIRAN 2	Pengenceran DNA Jagung Pulut dari Uji Kualitas dan kuantitas DNA di gel agarosa.....	31
LAMPIRAN 3	Larutan-larutan Kerja.....	33
LAMPIRAN 4	Gambar Proses Isolasi DNA Jagung Pulut.....	33
LAMPIRAN 5	Gambar Uji kualitas dan Kuantitas DNA Jagung Pulut.....	33

BOSOWA

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Jagung menempati posisi penting dalam perekonomian Indonesia karena merupakan salah satu sumber karbohidrat dan bahan baku industri pakan dan pangan. Tanaman jagung juga mempunyai banyak kegunaan, batang dan daun yang masih muda dapat digunakan untuk pakan ternak. Batang dan daun tanaman jagung yang sudah tua (setelah panen) dapat digunakan untuk pupuk hijau atau pupuk kompos. Bahkan di daerah sentral tanaman jagung, batang dan daun jagung yang sudah kering banyak dimanfaatkan untuk kayu bakar. Buah jagung yang masih muda banyak digunakan sebagai bahan sayuran, perkedel, sambal goreng dan sebagainya. Biji jagung yang telah tua bisa digunakan untuk pengganti nasi, dibuat marning, brondong, tepung, dan sebagainya (Warisno, 1998).

Karena banyaknya manfaat jagung, hal ini mengakibatkan kebutuhan jagung di dalam negeri terus meningkat dari tahun ke tahun dan untuk memenuhi kebutuhan jagung harus dilakukan impor terutama dari Amerika. Diperkirakan kebutuhan jagung dalam negeri akan terus meningkat sehubungan dengan bertambahnya jumlah penduduk dan berkembangnya industri pangan dan pakan. Oleh karena itu, produksi jagung dalam negeri perlu ditingkatkan sehingga volume impor dapat dikurangi dan bahkan ditiadakan. Ketergantungan akan jagung impor berdampak buruk terhadap keberlanjutan penyediaan jagung di dalam negeri mengingat komoditas ini di negara produsen utama telah digunakan untuk berbagai keperluan, termasuk untuk bahan baku bioenergi. Di Amerika Serikat, misalnya, telah dicanangkan penggunaan jagung sebagai sumber bioenergi. Pada saatnya nanti akan terjadi persaingan penggunaan jagung untuk pangan, pakan, bahan baku industri, dan bioenergi. Apabila kebutuhan jagung nasional masih bergantung pada impor dikhawatirkan akan mematikan industri pangan dan pakan berbasis jagung

karena berkurangnya pasokan bahan baku. Hal ini mengancam ketahanan pangan dan keberlanjutan usaha peternakan (Anonim, 2005).

Upaya peningkatan produksi jagung dapat dilakukan melalui berbagai cara, antara lain melalui perbaikan genetik tanaman. Perbaikan genetik jagung bertujuan untuk mengatasi kendala pertumbuhan tanaman, terutama cekaman lingkungan biotik dan abiotik. Perbaikan genetik jagung dapat dilakukan secara konvensional maupun melalui rekayasa genetik (genetic engineering) (Soemartono, 1992). Dengan berkembangnya bioteknologi, perbaikan genetik jagung melalui rekayasa genetik akan menjadi andalan dalam pemecahan masalah per Jagung di masa mendatang. Seperti diketahui, pemuliaan secara konvensional mempunyai keterbatasan dalam mendapatkan sifat unggul dari tanaman.

Pemuliaan tanaman merupakan suatu metode eksploitasi potensi genetik tanaman untuk mendapatkan varietas unggul baru yang berdaya hasil dan berkualitas tinggi pada kondisi lingkungan tertentu (Guzhov. Y, 1989). Eksploitasi potensi genetik tanaman semakin gencar setelah dicetuskannya revolusi hijau. Sejak itu, pemulia tanaman telah berhasil memperbaiki tanaman untuk sifat kualitatif maupun kuantitatif yang mempengaruhi penampilan agronomis maupun preferensi konsumen menggunakan pengamatan fenotipik yang dibantu dengan metode statistik yang tepat.

Beberapa masalah yang sering muncul untuk mendapatkan varietas unggul baru yang berdaya hasil dan berkualitas tinggi di antaranya adalah

- (i) Memerlukan waktu yang cukup lama;
- (ii) Kesulitan memilih dengan tepat gen-gen yang menjadi target seleksi untuk diekspresikan pada sifat-sifat morfologi atau agronomi karena penampilan fenotipe tanaman bukan hanya ditentukan oleh komposisi genetik, tetapi juga oleh lingkungan tumbuh tanaman;
- (iii) Rendahnya frekuensi individu yang diinginkan yang berada dalam populasi seleksi yang besar untuk mendapat hasil yang valid secara statistik;

(iv) Fenomena pautan gen antara sifat yang diinginkan dengan sifat tidak diinginkan sulit dipisahkan saat melakukan persilangan (Lamadji, 1999).

Dengan semakin berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi molekuler pada awal tahun 80an, telah ditemukan teknologi molekuler berbasis DNA. Markah molekuler merupakan alat yang sangat baik bagi pemulia dan ahli genetik untuk menganalisis genom tanaman. Sistem ini telah merevolusi bidang pemetaan genetik, antara lain dapat digunakan untuk menjawab pertanyaan yang berhubungan dengan keragaman genetik, klasifikasi dan filogeni yang berhubungan dengan pengelolaan plasma nutfah, dan alat bantu dalam pemuliaan dan seleksi melalui penandaan gen. Pada akhirnya dapat digunakan sebagai suatu cara untuk pengklonan gen yang difasilitasi oleh peta markah molekuler.

Saat ini perkembangan bioteknologi molekuler cukup pesat. Besarnya database *sequence* biologi seperti DNA, RNA dan rangkaian protein tentu memerlukan sistem penggalian data yang tepat dan terotomatisasi sehingga dapat mengurangi biaya penelitian. Pemisahan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat dilakukan melalui ekstraksi. Saat ini kita dapat menemukan berbagai macam metode ekstraksi DNA. Para peneliti selalu berusaha menyederhanakan tahapan yang digunakan atau mengurangi jumlah perlakuan. Tahapan atau perlakuan yang terlalu panjang dan terlalu kompleks sering meningkatkan resiko kegagalan, terutama bagi pemula. Tahapan atau perlakuan dalam ekstraksi DNA juga dipengaruhi asal sel/jaringan. Penggunaan nitrogen cair lebih memudahkan proses ekstraksi, namun ekstraksi dengan *buffer* CTAB ditambah *2β-mercaptoetanol* mampu mengurangi browning serta mempengaruhi kuantitas dan kualitas DNA yang diperoleh. Diharapkan dengan menggunakan nitrogen cair dan *buffer* CTAB dalam proses ekstraksi tanaman jagung diperoleh kualitas DNA yang bagus dengan konsentrasi DNA yang tinggi yaitu diatas 200 ng/μl dan kemurnian DNANYa berada diantara 1,7 – 2 OD (Moladno, 2002).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut yang di ekstraksi dengan menggunakan nitrogen cair.
2. Bagaimana kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut yang di ekstraksi dengan menggunakan *buffer* CTAB.
3. Bagaimana perbandingan kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut diekstraksi dengan nitrogen cair dan *buffer* CTAB.

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut yang di ekstraksi dengan menggunakan nitrogen cair.
2. Untuk mengetahui kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut yang di ekstraksi dengan menggunakan *buffer* CTAB.
3. Untuk mengetahui perbandingan kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut yang di ekstraksi dengan nitrogen cair dan *buffer* CTAB.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini untuk melihat pengaruh penggunaan Nitrogen Cair dan *buffer* CTAB terhadap kualitas dan kuantitas DNA, dan memperpanjang untaian DNA, kemampuan untuk dipotong oleh sembarang enzim melalui proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan tidak mengalami modifikasi kimiawi selama proses isolasi DNA.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik Jagung

Jagung merupakan tanaman sereal yang paling produktif di dunia, sesuai ditanam di wilayah bersuhu tinggi, dan pematangan tongkol ditentukan oleh akumulasi panas yang diperoleh tanaman. Berdasarkan bukti genetik, antropologi, dan arkeologi diketahui bahwa daerah asal tanaman jagung adalah Amerika Tengah (Meksiko bagian selatan), kemudian dibawa ke Amerika Selatan (Ekuador) sekitar 7.000 tahun yang lalu, dan mencapai daerah pegunungan di selatan Peru sekitar 4.000 tahun yang lalu (Anderson, 1945). Jagung mulai berkembang di Asia Tenggara pada pertengahan tahun 1500an dan pada awal tahun 1600an, yang berkembang menjadi tanaman yang banyak dibudidayakan di Indonesia, Filipina, dan Thailand. Menurut ahli biologi evolusi, jagung yang ada sekarang telah mengalami evolusi dari tanaman sereal primitif, yang bijinya terbuka dan jumlahnya sedikit, menjadi tanaman yang produktif, biji banyak pada tongkol tertutup, mempunyai nilai jual yang tinggi, dan banyak ditanam sebagai bahan pangan.

Jagung merupakan tanaman semusim determinat, dan satu siklus hidupnya diselesaikan dalam 80-150 hari. Paruh pertama dari siklus merupakan tahap pertumbuhan vegetatif dan paruh kedua untuk pertumbuhan generatif.

Klasifikasi tanaman jagung sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Sub divisio	: Angiospermae
Class	: Monocotyledoneae
O r d o	: Poales
Familia	: Poaceae
Genus	: Zea
Spesies	: Zea mays L.

Selain sebagai sumber karbohidrat, jagung juga merupakan sumber protein yang penting dalam menu masyarakat Indonesia. Kandungan gizi utama jagung adalah pati (72-73%), dengan nisbah amilosa dan amilopektin 25-30% : 70-75%, namun pada jagung pulut (waxy maize) 0-7% : 93-100%. Kadar gula sederhana jagung (glukosa, fruktosa, dan sukrosa) berkisar antara 1-3%. Protein jagung (8-11%) terdiri atas lima fraksi, yaitu: albumin, globulin, prolamin, glutelin, dan nitrogen nonprotein (Inglett, 1987) .

Jenis jagung dapat diklasifikasikan berdasarkan:

- (i) Sifat biji dan endosperma,
- (ii) Warna biji,
- (iii) Lingkungan tempat tumbuh,
- (iv) Umur panen, dan
- (v) Kegunaan.

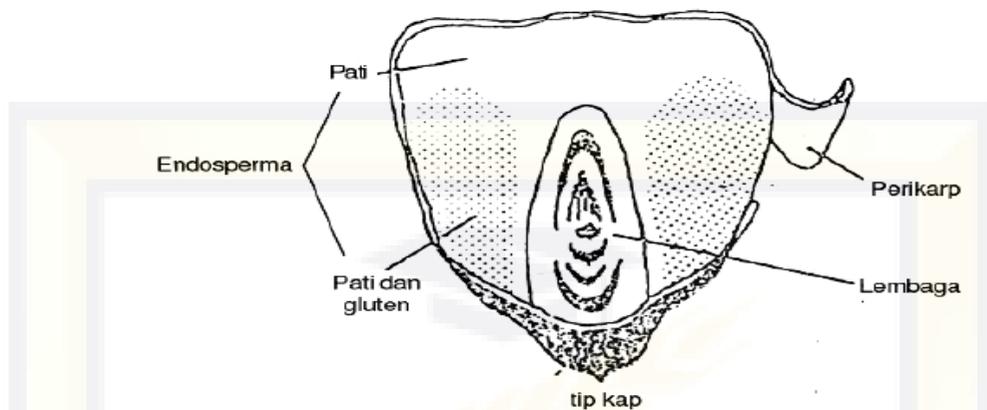
Ciri – ciri fisik jagung secara umum :

1. Jagung mempunyai akar serabut
2. Tanaman jagung mempunyai batang yang tidak bercabang, berbentuk silindris, dan terdiri atas sejumlah ruas dan buku ruas.
3. Bentuk tipe daun jagung ada dua , yaitu tegak dan menggantung
4. Jagung disebut juga tanaman berumah satu karena bunga jantan dan betinanya terdapat dalam satu tanaman
5. Tanaman jagung mempunyai satu atau dua tongkol, tergantung varietas.
6. Biji jagung disebut kariopsis, dinding ovari atau perikarp menyatu dengan kulit biji atau testa, membentuk dinding buah

Tabel 2.1 Komposisi kimia jagung berdasarkan bobot kering.

Komponen	Biji Utuh	Endosperma	Lembaga	Kulit ari	Tip cap
Protein (%)	3,7	8,0	18,4	3,7	9,1
Lemak (%)	1,0	0,8	33,2	1,0	3,8
Serat Kasar (%)	86,7	2,7	8,8	86,7	-
Abu (%)	0,8	0,3	10,5	0,8	1,6
Pati (%)	71,3	87,6	8,3	7,3	5,3
Gula (%)	0,34	0,62	10,8	0,34	1,6

Sumber : Inglett (1987)



Gambar 1. Biji jagung dan bagian-bagiannya

Sejalan dengan perkembangan pemuliaan tanaman jagung, jenis jagung dapat dibedakan berdasarkan komposisi genetiknya, yaitu jagung hibrida dan jagung bersari bebas. Jagung hibrida mempunyai komposisi genetik yang heterosigot homogenus, sedangkan jagung bersari bebas memiliki komposisi genetik heterosigot heterogenus. Kelompok genotipe dengan karakteristik yang spesifik, seragam, dan stabil disebut sebagai varietas yaitu kelompok genotipe dengan sifat-sifat tertentu yang dirakit oleh pemulia jagung, diperkirakan di seluruh dunia terdapat lebih dari 50.000 varietas jagung (Mejaya dkk, 2003).

2.2. Isolasi DNA (*Deoxyribonucleic acid*)

DNA merupakan molekul utama kehidupan karena struktur DNA membawa informasi hereditas yang menentukan struktur protein. DNA adalah asam nukleat yang mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis seluruh bentuk kehidupan secara seluler. DNA terdapat pada nukleus, mitokondria, dan kloroplas. Perbedaan ketiganya adalah DNA nukleus berbentuk linier dan berasosiasi sangat erat dengan protein histon, sedangkan DNA mitokondria dan kloroplas berbentuk sirkular dan tidak berasosiasi dengan protein histon (Watson, D. James, 1988).

Selain itu DNA mitokondria dan kloroplas memiliki ciri khas, yaitu hanya mewariskan sifat-sifat yang berasal dari garis ibu. Sedangkan DNA

nukleus memiliki pola pewarisan sifat dari kedua orangtua. Dilihat dari organismenya, struktur DNA prokariot tidak memiliki protein histon dan berbentuk sirkular, sedangkan DNA eukariot berbentuk linier dan memiliki protein histon.

DNA memiliki struktur pilinan utas ganda yang anti paralel dengan komponen-komponennya, yaitu gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat dan pasangan basa. Pasangan basa pada DNA terdiri atas dua macam, yaitu basa purin dan pirimidin.

Sebuah sel memiliki DNA yang merupakan materi genetik dan bersifat hereditas pada seluruh sistem kehidupan. Genom adalah sel lengkap materi genetik DNA yang dimiliki suatu organisme dan terorganisasi menjadi kromosom. DNA dapat juga di isolasi, baik pada manusia maupun pada tumbuhan. Isolasi DNA genom dilakukan dengan merusak sel atau dinding sel terlebih dahulu, hal ini dapat dilakukan dengan beberapa teknik baik dengan menggunakan agensia hayati, bahan kimia, menggunakan enzim tertentu maupun secara fisik. Pemecahan sel dengan menggunakan enzim dapat dilakukan dengan menggunakan enzim lisozim yang dapat memecah dinding sel, senyawa lain yang biasa digunakan adalah *Cetyltrimethylammonium Bromide* (CTAB) dan nitrogen cair.

Isolasi DNA dari organisme eukariotik biasanya dilakukan melalui penghancuran sel (lisis), pemusnahan protein dan RNA, dan pemurnian DNA dengan memanfaatkan senyawa kimia seperti *Etilen Diamin Tetra Acetat* (EDTA) yang berfungsi merusak sel dengan cara mengikat ion magnesium, dan *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) yang merupakan sejenis detergen untuk merusak membran sel sehingga dapat menyebabkan lisis pada sel. Protein dapat dibersihkan menggunakan larutan fenol (mengikat protein dan sebahagian kecil RNA dan kloroform (membersihkan protein dan polisakarida dari larutan). Protein juga dapat dihilangkan dengan bantuan enzim proteinase, dan RNA dapat dihilangkan dengan RNase. Adapun ethanol serta NaCl

berfungsi memekatkan, memisahkan DNA dari larutan dan mengendapkan DNA.

Proses pemurnian dapat pula menggunakan Proteinase K dan RNase untuk membersihkan protein dan RNA. Tahap ini juga memanfaatkan NH_4Ac (Amonium Asetat) yang berfungsi untuk mengurangi terjadinya presipitasi protein dan sejumlah RNA yang masih tersisa dengan menggunakan larutan fenol, kloroform dan isoamilalkohol (25:24:1)

2.3. Nitrogen

Nitrogen dalam bahasa Yunani 'nitron' berarti soda asli. Pertama kali ditemukan oleh Daniel Rutherford pada tahun 1772 yang menyebutnya udara beracun atau udara tetap. Kemudian dikaji ulang oleh Carl Wilhelm Scheele, Henry Cavendish, dan Joseph Priestley sebagai udara terbakar. Kemudian istilah tersebut berkembang menjadi nama Nitrogen. Gas nitrogen cukup lemas sehingga dinamakan azote atau tak bernyawa. Senyawa nitrogen diketahui sejak zaman pertengahan Eropa.

Dinamakan zat lemas karena zat ini bersifat malas, tidak aktif bereaksi dengan unsur lainnya. Nitrogen mengisi 78,08 % atmosfer bumi dan terdapat dalam banyak jaringan hidup. Zat lemas membentuk banyak senyawa penting seperti asam amino, amoniak, asam nitrat dan sianida.

Sifat kimia dan fisika nitrogen :

- Nitrogen merupakan gas tidak berwarna, tidak berbau, tidak berasa, dan sebagian besar merupakan gas diatomik.
- Nitrogen memiliki lima elektron di kulit terluarnya, sehingga merupakan trivalen dalam sebagian besar senyawanya.
- Nitrogen menyumbang 78 persen atmosfer bumi dan merupakan konstituen dari semua jaringan hidup.

- Nitrogen merupakan elemen penting bagi kehidupan karena merupakan salah satu penyusun DNA, dan dengan demikian merupakan bagian dari kode genetik.
- Molekul nitrogen terjadi terutama di udara dalam air dan tanah, nitrogen ditemukan pada senyawa nitrat dan nitrit. Semua zat ini adalah bagian dari siklus nitrogen sehingga semua saling berhubungan. Manusia telah mengubah keseimbangan nitrat dan nitrit alami terutama karena penggunaan pupuk yang mengandung nitrat.

Karakteristik Nitrogen :

Simbol	: N
Nomor atom	: 7
Berat atom	: 14,007
Klasifikasi	: Gas dan bukan logam
Fase pada Suhu Kamar	: Gas
Berat jenis	: 1,251 g/L @ 0 °C
Titik leleh	: -210,00 °C, -346,00 °F
Titik didih	: -195,79 °C, -320,33 °F

Selain berada fase gas nitrogen juga bisa berada dalam fase cair yang disebut nitrogen cair. Liquid nitrogen atau nitrogen cair yang biasa ditulis dengan singkatan LN₂, merupakan nitrogen dalam fase cairnya, tentunya pada suhu yang relatif sangat rendah. Nitrogen pertama kali dicairkan di Jagiellonian university pada 15 april 1883 oleh fisikawan Zygmunt Wróblewski dan Karol Olszewski. Nitrogen cair diproduksi dengan destilasi fraksinasi dari udara cair (Syukri, S. 1999)

Nitrogen cair berpenampakan bersih tak berwarna seperti air biasa, dengan kerapatan 0,807 g/mL pada temperatur titik didihnya dengan konstanta dielektrik 1,4. Pada tekanan atmosfer, nitrogen cair mendidih pada temperatur 77 °K atau setara dengan -196 °C atau -321 °F. Nitrogen cair merupakan cairan cryogenic yang dapat menyebabkan pembekuan dengan cepat apabila kontak dengan jaringan tubuh makhluk hidup, atau yang lebih dikenal dengan frofbite.

Sebaiknya nitrogen cair ditempatkan pada kontainer khusus, yakni kontainer isolasi seperti botol vakum, dimana panas tidak dapat keluar masuk, maka nitrogen cair dapat disimpan dengan aman.

Jika nitrogen cair terkonversi menjadi gas, maka rasio perbandingan volumenya adalah sekitar 1:694. Selain sangat mudah terkonversi menjadi gas, ternyata nitrogen cair juga sangat mudah untuk dipadatkan. Cukup dengan menurunkan temperaturnya sedikit, pada 63°K atau -210 °C atau -346 °F nitrogen telah berubah ke fasa padatnya. Dengan demikian, ternyata fasa cair nitrogen hanya terjadi pada rentang temperatur yang sempit yakni -210 °C s/d – 196 °C, kurang lebih 14 derajat. Bandingkan dengan air yang fasa cairnya dari 0 – 100 °C, etanol -114,3 °C – 78,4 °C, oksigen -218,79 °C s/d -182,95 °C (Syukri 1999).

Nitrogen yang berasal dari udara merupakan komponen utama dalam pembuatan pupuk dan telah banyak membantu intensifikasi produksi bahan makanan diseluruh dunia. Pengembangan proses fiksasi (pengikatan) nitrogen telah berhasil memperjelas berbagai asas proses kimia dan proses tekanan tinggi serta telah menyumbang banyak perkembangan dibidang kimia. Kegunaan nitrogen dalam bidang pertanian dan perusahaan pada awalnya adalah dalam bentuk kalium nitrat, terutama dalam penghasilan serbuk peledak dan kemudian sebagai baja dan juga stok makanan ternak kimia.

Nitrogen merupakan unsur kunci dalam asam amino dan asam nukleat sehingga sangat penting bagi semua kehidupan. Protein disusun dari asam-asam amino, sementara asam nukleat menjadi salah satu komponen pembentuk DNA dan RNA. Dalam proses ekstraksi DNA tanaman penggunaan *Liquid Nitrogen* (LN) berfungsi untuk memudahkan penghancuran sampel dan mempermudah penggerusan serta menjaga agar DNA tidak mengalami kerusakan.

2.4 *Cetyltrimethylaminium Bromide* (CTAB)

Senyawa *CTAB* merupakan surfaktan kationik yang dapat terionisasi sepenuhnya dalam air (Wang 2011). Surfaktan Kationik merupakan surfaktan dengan bagian aktif pada permukaannya mengandung muatan positif (D Myers, 1999). *CTAB* adalah salah satu larutan penyangga yang digunakan dalam proses ekstraksi DNA tumbuhan. Zat ini merupakan surfaktan kationik. Sediaan yang dipakai biasanya larutan dalam campuran dengan garam NaCl, Tris-HCl, *Etilen Diamin Tetra Acetat* (EDTA) dan merkaptoetanol yang dilarutkan dalam air. Selain enzim lisozim, *CTAB* juga digunakan untuk memecahkan sel dan dinding sel dalam proses ekstraksi DNA tanaman. *CTAB* berfungsi sebagai pelarut lipid dari membran sel.

Pembuatan Buffer *CTAB* mencampurkan komponen-komponen yang terdapat pada tabel 3, dan cukupkan volume sampai 1 liter dengan H_2O *ultrapure*. Bagi ke dalam *aliquot-aliquot* dan sterilkan dengan *autoclave*. Sebelum digunakan, masukkan *aliquot* ke dalam tabung 50 ml bersih dan tambahkan 40 μ l β -*mercaptoethanol* per 20 ml larutan *buffer* dan panaskan *buffer* tersebut sampai 65⁰C (CIMMYT. 2004).

Tabel 2.4 Komponen pembuatan Buffer *Cetyltrimethylaminium Bromide* (CTAB)

Larutan stok	Konsentrasi Stok	Konsentrasi Kerja	Volume Akhir (200 ml)	Volume Akhir (500 ml)
Tris (pH 7.5)	1.0 M	100 mM	20 ml	50 ml
NaCl	2.5 M	1.4 M	112 ml	280 ml
EDTA (pH 8.0)	0.5 M	20 mM	8 ml	20 ml
CTAB		2 %	4 g	10 g
dd H_2O			60 ml	

Sumber : CIMMYT (2004)

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi molekuler Balai Penelitian Tanaman Serealia Maros, Sulawesi Selatan, berlangsung di bulan November – Desember 2014.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah gunting, plastik, sprayer, timbangan analitik, kertas timbang, mortar, pestel, spatula, tube mikro steril 2 µl dan 1,5 µl, pipet mikro (1000 µl, 200 µl, 10 µl), tip steril (1000 µl, 200 µl, 10 µl), shaker, water bath inkubasi, centrifuge, Erlenmeyer flask 500 ml, microwave, spektrofotometer, perlengkapan alat elektroforesis horizontal, perlengkapan alat elektroforesis vertical, tray/nampan, UV Transilluminator, kamera, freezer, oven.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman jagung pulut, Es, nitrogen cair, buffer CTAB, *β-mercaptoethanol*, Cloroform : Isoamyl alkohol (24:1), Isopropanol dingin, Ethanol 70%, Buffer Tris-EDTA (TE), Agarose, TBE, loading dye sebagai pewarna DNA, Lambda DNA standar, Etidium bromide (EtBr) 10 mg/ml, aquadest, tissue.

3.3 Prosedur Kerja

Penelitian ini dilakukan dengan langkah sebagai berikut :

3.3.1 Isolasi DNA menggunakan *Buffer* CTAB

1. Sampel daun jagung pulut diambil 10 galur dan setiap galur dipotong dalam ukuran kecil, kemudian ditimbang sebanyak 0,4 per galur kemudian dimasukkan setiap galur ke dalam mortar yang berisi 1.700 μ l buffer CTAB kemudian digerus sampai berbentuk cairan atau bubur daun dan dimasukkan ke dalam 2 tube mikro 2 μ l masing-masing setengah volume. Masing-masing tube ditambahkan β -mercaptoethanol sebanyak 10 μ l.
2. Tube dimasukkan di waterbath untuk diinkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit. Bolak-balik tube dengan hati-hati setiap 15 menit. Tube kemudian di angkat dari waterbath dan di dinginkan pada suhu ruang dan selanjutnya tambahkan 700 μ l kloroform isoamilalkohol pada setiap tube
3. Homogenkan cairan dalam cube menggunakan shaker selama 15 menit dan sentrifugasi pada 12000 rpm selama 10 menit. Pindahkan secara hati-hati cairan bagian atas (supernatan) ke dalam tube 1,5 μ l yang kosong diatas Es batu. Tambahkan 700 μ l isopropanol dingin pada setiap tube, kemudian simpan dalam freezer -30°C selama maksimal 24 jam.
4. Setelah 24 jam putar tube secara perlahan sampai terbentuk untaian DNA yang berupa untaian lender benang berwarna putih. Kemudian Sentrifugasi pada 12000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan DNA pada dasar tube. Buang larutan dari endapan DNA dan cuci pelet DNA sebanyak 2 kali dengan 700 μ l ethanol 70% dengan waktu pencucian 10 menit sekali pencucian kemudian keringkan pellet DNA di oven dengan suhu 40°C celcius dengan membalik tube di atas kertas tissue bersih.

5. Setelah kering Menambahkan TE Buffer 100 μ l pada setiap tube. Kemudian Inkubasi dalam waterbath pada suhu 60 $^{\circ}$ C selama 60 menit. Angkat tube dari waterbath kemudian flik dan sentrifugasi pada 70 rpm selama 1 menit.

3.3.2 Isolasi DNA menggunakan nitrogen cair

1. Sampel daun jagung pulut diambil 10 galur dan setiap galur dipotong dalam ukuran kecil, kemudian ditimbang sebanyak 0,4 per galur kemudian dimasukkan setiap galur masukkan ke dalam mortar yang berisi nitrogen cair, kemudian digerus. Lanjutkan dengan penambahan nitrogen cair (bila perlu) sambil digerus sampai berbentuk tepung daun. Jangan biarkan sampel-sampel tersebut basah untuk mencegah aktifitas DNase dan degradasi DNA
2. Celupkan spatula steril dalam nitrogen cair dan gunakan spatula tersebut untuk memindahkan sampel gerusan ke dalam 2 tube mikro 2 ml masing-masing setengah volume.
3. Tambahkan 500 μ l (gunakan pipet mikro 1000 μ l) buffer CTAB yang mengandung 40 μ l β -mercaptoethanol per 20 ml larutan
4. Tube dimasukkan di waterbath untuk diinkubasi pada suhu 65 $^{\circ}$ C selama 60 menit. Bolak-balik tube dengan hati-hati setiap 15 menit. Tube kemudian di angkat dari waterbath dan di dinginkan pada suhu ruang dan selanjutnya tambahkan 700 μ l kloroform isoamilalkohol pada setiap tube
5. Homogenkan cairan dalam cube menggunakan shaker selama 15 menit dan sentrifugasi pada 12000 rpm selama 10 menit. Pindahkan secara hati-hati cairan bagian atas (supernatan) ke dalam tube 1,5 μ l yang kosong diatas Es batu. Tambahkan 700 μ l isopropanol dingin pada setiap tube, kemudian simpan dalam freezer -30 $^{\circ}$ C selama maksimal 24 jam.
6. Setelah 24 jam putar tube secara perlahan sampai terbentuk untaian DNA yang berupa untaian lender benang berwarna putih. Kemudian Sentrifugasi

pada 12000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan DNA pada dasar tube. Buang larutan dari endapan DNA dan cuci pelet DNA sebanyak 2 kali dengan 700 μ l ethanol 70% dengan waktu pencucian 10 menit sekali pencucian kemudian keringkan pellet DNA di oven dengan suhu 40°C celcius dengan membalik tube di atas kertas tissue bersih.

7. Setelah kering Menambahkan TE Buffer 100 μ l pada setiap tube. Kemudian Inkubasi dalam waterbath pada suhu 60 °C selama 60 menit. Angkat tube dari waterbath kemudian flik dan sentrifugasi pada 70 rpm selama 1 menit.

3.3.3 Uji kualitas dan kuantitas DNA di gel agarosa

1. DNA yang sudah di sentrifuge diambil 3 μ l per tube kemudian teteskan di alat spektrofotometer untuk mengecek konsentrasi DNA dan kemurnian DNA.
2. Menyiapkan gel agarosa 0,9 % sebanyak 300 ml larutan gel yang dibuat dari 2,7 g agarosa, 300 ml buffer TBE (Tris-borate-EDTA) kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dipanaskan dalam microwave sampai semua agarosa benar-benar larut. Biarkan larutan dingin, sebelum mengeras larutan dituangkan ke dalam cetakan tangki elektroforesis dan biarkan gel sampai terjadi polimerisasi (mengeras) dan angkat sisir dari cetakan dengan hati-hati maka terbentuk sumur gel.
3. Mencampurkan sebanyak 4 μ l *loading dye* dan 1 μ l DNA di atas parafilm. Agar konsentrasi DNA sampel dapat diestimasi, siapkan standar DNA dengan mencampurkan DNA lambda 50 ng/ μ l, 100 ng/ μ l, 200 ng/ μ l dan 300 ng/ μ l dengan *loading dye*.
4. Memasukkan standar DNA lambda pada tiga sumur pertama dan melanjutkan dengan setiap sampel pada masing-masing sumur gel berikutnya.

5. Dilakukan elektroforesis pada tegangan listrik 120 volt selama 2 jam atau sampai dye biru (*Bromophenol Blue*) telah berada pada posisi paling ujung dari gel.
6. DNA diberi pewarna dengan merendam gel dalam larutan *Ethidium Bromida* selama 10 menit, selanjutnya didestaining dengan merendam gel dalam air ultrapure selama 10 menit.
7. Meletakkan gel di atas UV Transiluminator dan visualisasi DNA dengan menggunakan kamera.
8. Membaca kualitas DNA yang tervisualisasi dari kamera dengan cara membandingkan standart DNA lambda dengan konsentrasi DNA yang tervisualisasi. DNA yang diestimasi lebih dari 10 ng/ μ l diencerkan dengan rumus $M_1V_1=M_2M_2$ dimana M_1 adalah konsentrasi DNA stok, V_1 adalah volume stok yang akan dilarutkan, M_2 adalah konsentrasi larutan kerja, dan V_2 adalah volume larutan kerja yang disiapkan.

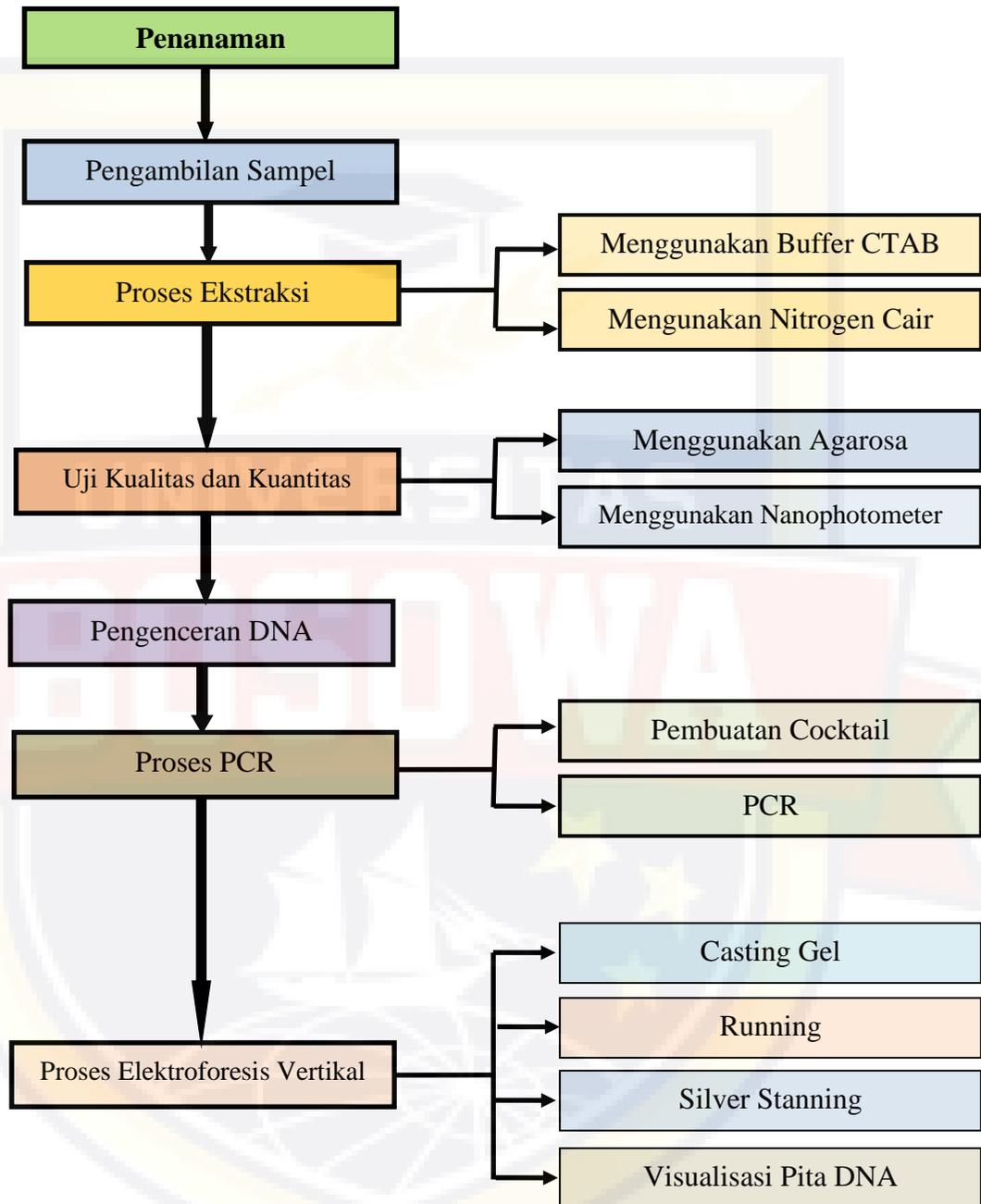
3.3.4 Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

1. Memasukkan larutan DNA yang diencerkan (setara 10 ng/ μ l) 1 μ l pada mikroplate yang diletakkan pada es.
2. Menambahkan larutan pereaksi yang lain dengan mengambil volume per reaksi dengan jumlah sampel (melebihkan 3-5 untuk kesalahan pemipetan), larutan pereaksi (PCR-*mix*) terdiri dari komponen-komponen air ultrapure/nanopure 2,25 μ l per reaksi, @Primer Mix (F dan R) 5 uM 0,5 μ l per reaksi, dan go taq green master 6,25 μ l per reaksi.
3. Mengambil 8,0 μ l PCR-*mix* kemudian memasukkan ke dalam mikroplate yang berisi DNA. Menambahkan 1 tetes mineral oil dan menutup mikroplate
4. Meletakkan mikroplate tersebut dalam mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan melakukan proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sesuai suhu primer yang digunakan. Setelah proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) selesai, siap dilakukan elektroforesis gel poliakrilamid.

3.3.5 Elektroforesis gel poliakrilamid

1. Menyiapkan larutan *Acrylamid* 8% sebanyak 500 μ l dari 100 μ l *Acrylamid* 40%, TBE (Tris-borate-EDTA) 50 μ l, dan Aquadest 350 μ l. Untuk elektroforesis dalam 2 page terdiri atas 2 plate digunakan larutan *Acrylamid* 8% sebanyak 100 μ l, TEMED 100 μ l, dan *Amonium persulfat* (APS) 1000 μ l kemudian larutan tersebut dimasukkan ke plate kaca kemudian masukkan sisir diantara dua plate, biarkan gel mengalami polimerisasi. Setelah gel mengalami polimerisasi, angkat sisir dari kedua plate dan plate dimasukkan kerangkaian alat elektroforesis vertikal yang berisi larutan TE 1X.
2. Masukkan sampel yang telah di *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sebanyak 4 μ l ke masing-masing sumur gel dan 2 μ l marker sebagai penanda pada sumur gel pertama dan terakhir. Diusahakan agar jumlah marker yang digunakan pada awal dan akhir sumur gel berbeda agar urutan sampel tidak bertukaran.
3. Melakukan proses elektroforesis pada tegangan 100 volt sampai warna pertama mencapai bagian paling bawah gel.
4. Gel hasil elektroforesis dicuci dengan aquadest, kemudian direndam ke dalam larutan silver selama 5-7 menit dan kemudian dibilas ke dalam aquadest \pm 2 detik, selanjutnya direndam ke dalam larutan NaOH (Formaldehid 3000 μ l/L) sambil digoyang secara perlahan sampai muncul pita-pita DNA. Melakukan visualisasi pita-pita DNA menggunakan kamera di atas *white table*.

Gambar 2. Diagram alir Metode Kerja



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil dan Pembahasan Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Jagung Pulut Menggunakan Alat Spektrofotometer

Hasil uji kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut dengan menggunakan spektrofotometer menunjukkan bahwa kemurnian DNA yang diekstraksi menggunakan nitrogen cair berkisar antara 1,328– 2,325 OD dan konsentrasi DNA nya berkisar antara 82,3 – 225 ng/μl, sedangkan yang diekstraksi menggunakan Buffer CTAB kemurnian DNA nya berkisar antara 1,094 - 1,238 OD dan konsentrasi DNA nya antara 214 – 239 ng/μl. Hal ini bisa dilihat pada tabel 4.1.1

Tabel 4.1.1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA Jagung Pulut

NO	Nama Aksesori	Ekstraksi dengan Nitrogen Cair		Ekstraksi dengan Buffer CTAB	
		Konsentrasi (ng/μl)	Purity (OD)	Konsentrasi (ng/μl)	Purity (OD)
1	Pulut A	225	1,413	237	1,215
2	Pulut B	223	1,429	239	1,236
3	Pulut C	157	1,967	223	1,238
4	Pulut D	82,3	1,893	227	1,094
5	Pulut E	130	2,325	231	1,171
6	Pulut F	151	1,328	229	1,148
7	Pulut G	206	1,619	232	1,167
8	Pulut H	132	2,046	232	1,160
9	Pulut I	194	1,783	214	1,230
10	Pulut J	172	1,819	232	1,198

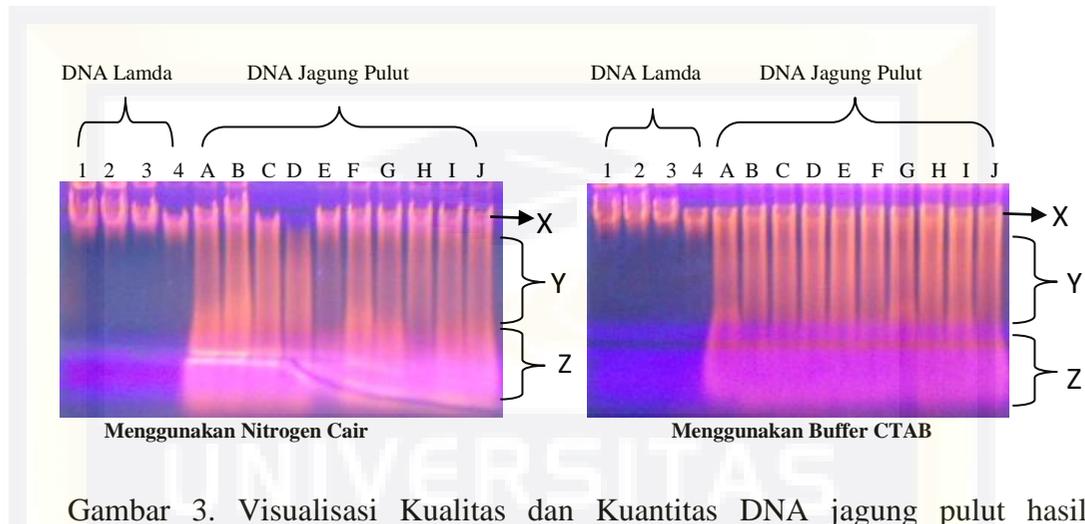
Sumber : Data Primer setelah diolah 2015

Menurut Moladno (2002) jika kemurnian DNA yang berkorelasi dengan kualitas DNA didapatkan berkisar antara 1,70 – 2,00 OD, maka DNA dikatakan murni sebaliknya jika nilai yang didapatkan lebih kecil dari 1,70 OD dan diatas 2,00 OD maka DNA tersebut terkontaminasi dengan protein dan kotoran - kotoran lainnya.

Berdasarkan hasil pengamatan yang diperoleh diketahui bahwa konsentrasi jagung pulut yang diekstraksi menggunakan nitrogen cair bervariasi antara sampel satu dengan sampel yang lain yaitu berkisar antara 82,3 – 225 ng/μl. Hal ini disebabkan oleh penguasaan teknik dalam proses penyiapan DNA mulai dari pengambilan sampel, isolasi DNA sampai pada tahap pengujian kualitas dan kuantitas yang masih terbatas. Kemurnian DNA yang diperoleh berkisar antara 1,328– 2,325 OD. Dari semua sampel hanya ada tiga sampel yang memiliki kemurnian antara 1,70 – 2,00 OD yaitu sampel jagung Pulut G, jagung Pulut I, dan jagung Pulut J (Tabel 4.1.1), sedangkan sampel yang lainnya memiliki kemurnian di bawah 1,7 OD dan diatas 2,00 OD. Hal ini menunjukkan bahwa hanya ada tiga sampel yang memiliki DNA murni sedangkan yang lainnya masih terkontaminasi dengan protein dan kotoran lainnya.

Ekstraksi menggunakan buffer CTAB terlihat konsentrasi total DNA yang tinggi diatas 200 ng/μl tapi dari semua sample yang diuji belum ditemukan DNA yang murni karena Kemurnian DNA nya masih dibawah 1,7 ng/μl masih terkontaminasi dengan protein dan kotoran sehingga perlu penambahan RNase untuk menghilangkan protein dan pemurnian kembali dengan penambahan NaOase. Konsentrasi DNA yang masih tinggi harus dilakukan pengenceran setara 10 ng/μl karena konsentrasi DNA yang digunakan untuk proses PCR harus setara dengan 10 ng/μl (Lampiran 1). Konsentrasi DNA yang terlalu tinggi atau diatas 10 ng/μl sangat sulit untuk dideteksi oleh primer (pendeteksi gen).

4.2 Hasil dan Pembahasan Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Jagung Pulut di Gel Agarosa dari Proses Elektroforesis Horizontal



Gambar 3. Visualisasi Kualitas dan Kuantitas DNA jagung pulut hasil elektroforesis horizontal (1= λ 300 ng/ μ l, 2= λ 200 ng/ μ l, 3= λ 100 ng/ μ l, dan 4= λ 50 ng/ μ l , X=DNA, Y=Kotoran, Z=RNA)

Tabel 4.2.1 Konsentrasi DNA jagung pulut yang di lihat dari pendaran cahaya di gel agarose

NO	Nama Aksesori	Ekstraksi dengan Nitrogen Cair	Ekstraksi dengan Buffer CTAB
		Konsentrasi (ng/ μ l)	Konsentrasi (ng/ μ l)
1	Pulut A	100	100
2	Pulut B	200	100
3	Pulut C	75	100
4	Pulut D	50	100
5	Pulut E	100	100
6	Pulut F	150	100
7	Pulut G	150	100
8	Pulut H	150	100
9	Pulut I	150	100
10	Pulut J	150	100

Sumber : Data primer setelah diolah 2015

Hasil pengujian proses elektroforesis horizontal pada Gambar 3 diatas, sampel jagung pulut yang diekstraksi dengan nitrogen cair menunjukkan adanya perbedaan warna pendaran cahaya masing-masing sampel yang menunjukkan bahwa konsentrasi dan kemurnian DNA bervariasi, konsentrasi DNA berkisar antara 50 - 200 ng/ μ l saat dibandingkan dengan standar lambda DNA (Tabel 4.2.1).

Sedangkan yang menggunakan Buffer CTAB menunjukkan keseragaman konsentrasi dan kemurnian DNA, memperlihatkan rata-rata konsentrasi pita DNA berkisar 100 ng/ μ l. Pada kedua gambar masih menunjukkan adanya kotoran dan RNA pada sampel sehingga perlu dilakukan penambahan RNase agar DNA tersebut benar-benar murni.

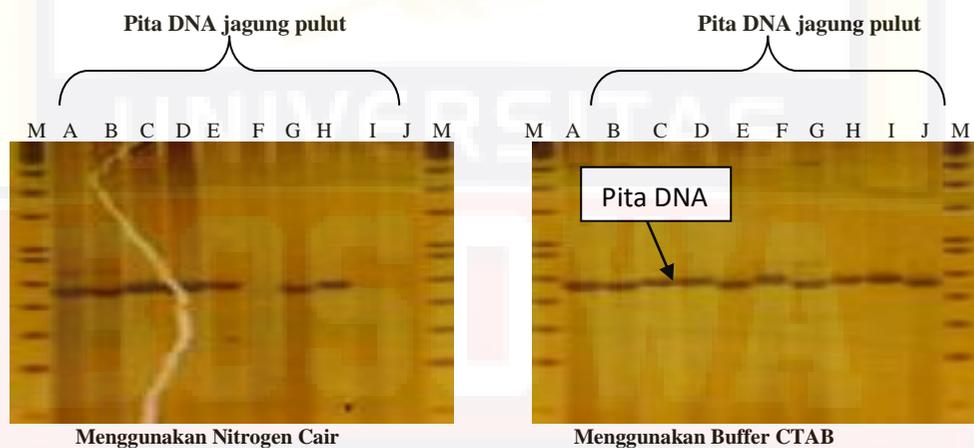
Pada gambar 3 diatas dapat diketahui perbedaan pendaran cahaya antara DNA murni dengan DNA yang terkontaminasi dengan kotoran. Pada gambar 3 yang menggunakan nitrogen cair dapat dilihat konsentrasi DNA yang bervariasi yaitu berkisar antara 50 – 200 ng/ μ l hal ini ditunjukkan dari perbedaan pendaran cahaya dari satu sampel ke sample yang lain. Hanya satu sample yang tampak bersih yaitu sample Jagung Pulut D, sedangkan yang lainnya terdapat pendaran cahaya memanjang yang menandakan adanya kotoran dan RNA pada DNA.

Sedangkan yang menggunakan Buffer CTAB menunjukkan keseragaman konsentrasi DNA yaitu rata-rata 100 ng/ μ l terlihat dari meratanya bentuk pendaran cahaya dan juga memanjang yang menandakan semua sample masih belum murni dan masih terkontaminasi dengan kotoran, protein serta masih tebalnya RNA nya. Jika konsentrasi DNA lebih dari 10 ng/ μ l, maka harus diencerkan karena standart dalam proses PCR konsentrasi DNA harus setara dengan 10 ng/ μ l. Untuk itu perlu dilakukan pengenceran agar konsentrasinya setara dengan 10 ng/ μ l (Lampiran 2).

Beberapa hal yang bisa menyebabkan terjadinya kontaminasi protein adalah proses pengambilan dan penyimpanan sampel yang kurang baik, kesalahan teknik pengambilan supernatan sehingga terkontaminasi oleh lisis buffer serta proses digesti DNA yang mungkin tidak sempurna karena selama

inkubasi, sample tersebut tidak digoyang (*shaking*) sehingga pada saat penambahan fenol, sebagian protein tidak ikut terikat dan tetap berikatan dengan DNA dalam sampel (Saili,T. 2010).

4.3 Hasil dan Pembahasan Amplifikasi dari Uji Kualitas dan Kuantitas DNA Jagung Pulut di Gel polyakrilamid melalui proses Elektroforesis Vertikal



Gambar 4. Visualisasi Pita DNA jagung pulut hasil elektroforesis Vertikal primer nc 133 (M = Marker Penanda Jarak pita)

Hasil Amplifikasi pengujian kualitas dan kuantitas DNA dari proses elektroforesis vertikal pada gambar di atas menunjukkan munculnya pita DNA tunggal di setiap sample pada sumur gel polyakrilamid. Pada sampel DNA yang menggunakan nitrogen cair terlihat tidak munculnya Pita DNA pada sample Jagung Pulut G, Jagung Pulut I dan Jagung Pulut J di gel polyakrilamid.

Sedangkan sampel DNA yang menggunakan buffer CTAB muncul semua. Letak pita DNA jagung pulut tersebut berada diantara pita i dan j atau berada diantara 107-140 bp (Lampiran 3)

Untuk marka SSRs dibutuhkan konsentrasi DNA yang rendah sehingga harus dilakukan pengenceran. Pengenceran dilakukan setara dengan 10 ng/ μ l (Lampiran 1). Pengenceran harus dilakukan jika konsentrasi stok DNA tinggi agar pada tahap PCR primer dapat menempel pada pita DNA sehingga dapat teramplifikasi (DuaLembang 2012). Salah satu visualisasi hasil amplifikasi PCR menggunakan primer nc133 (Gambar 4). Pada Gambar 4 terlihat muncul nya pita tunggal di setiap sample yang menandakan pita tersebut tidak terkontaminasi dengan tanaman jagung yang lain. Pada Gambar 4 diatas sampel yang menggunakan nitrogen cair terlihat pita DNA pada sample Jagung Pulut G, Jagung Pulut I dan Jagung Pulut J tidak muncul di gel polyakrilamid. Hal ini disebabkan primer tidak mampu mendeteksi gen pada DNA tersebut karena tingginya konsentrasi DNA, sedangkan sampel yang menggunakan buffer CTAB, pita DNA terlihat muncul semua pada setiap sumur gel polyakrilamid. Munculnya pita tunggal pada tiap sampel menandakan tidak terkontaminasinya tanaman jagung pulut tersebut dengan jagung lain.

V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa dari hasil ekstraksi DNA jagung pulut yang menggunakan nitrogen cair diperoleh konsentrasi DNA berkisar antara 82,3 – 225 ng/μl dengan tingkat kemurnian yang masih rendah karena masih mengandung protein dan kotoran. Ada 3 sampel jagung pulut yang benar-benar murni yaitu sampel jagung Pulut G, jagung Pulut I, dan jagung Pulut J. Sedangkan hasil ekstraksi DNA jagung pulut yang menggunakan buffer CTAB diperoleh konsentrasi DNA antara 214 – 239 ng/μl tingkat kemurnian DNA lebih rendah karena hampir semua sample masih mengandung protein dan kotoran. Dilihat dari konsentrasi dan kemurnian DNA nya, jagung pulut C adalah jenis jagung yang paling baik karena sesuai dengan standart DNA yang baik yaitu konsentrasi DNA nya tinggi yaitu 157 ng/μl dan kemurniannya 1,967 OD.

Dari hasil ekstraksi DNA jagung pulut yang menggunakan nitrogen cair maupun buffer CTAB dapat disimpulkan penggunaan buffer CTAB lebih baik karena terlihat dari amplifikasi di gel polyakrilamid kualitas DNA yang dihasilkan menunjukkan munculnya pita DNA di setiap sumur gel polyakrilamid.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan lanjutan uji penggunaan primer-primer yang lain sehingga diketahui bagaimana jarak genetik dan kekerabatan dari tanaman jagung pulut.
2. Perlu dilakukan uji ekstraksi DNA jagung menggunakan batang tanaman, akar dan buah.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, E. 1945. *What is Zea mays? A report of progress*. Chron.
- Anonim, 2005. *Prospek dan Arah Pengembangan Komoditas Jagung*. Balai Penelitian Tanaman Serealia. Pusat Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Pangan. Badan Penelitian Dan Pengembangan Pertanian.
- Christian Hardi, 2010. *Analisa DNA pada Tanaman*. Departemen perindustrian dan Perdagangan, Makassar
- CIMMYT. 2004. *Protokol untuk Karakterisasi Jagung secara Genotipik menggunakan Marka SSR serta analisis Data*. Metro Manila, Philippines.
- Dualembang, Erlina. Yunus Musa, dan Muh. Azrai. (2012). *Karakterisasi Genetik Koleksi Plasma NutfahSorgum (Sorghum bicolor l. moench) Berbasis Marka SSR (Simple Sequence Repeats)*.
- George M.L.C. dan E.S. Regalado. 2004. *Buku Panduan Laboratorium: Lokakarya Teknik Dasar Molekuler untuk Pemuliaan Tanaman*. Balai Penelitian dan Pengembangan Penelitian. Bogor.
- Guzhov, Y. 1989. *Genetics and plant breeding for agriculture*. Mir Publisher. Moscow.
- Inglett, G. E. 1987. *Kernel, Structure, Composition and Quality*. Ed. Corn : Culture. Processing and Products. Avi Publising Company, Westport.
- Lamadji, M.J., L. Hakim, dan Rustidja. 1999. *Akselerasi pertanian tangguh melalui pemuliaan nonkonvensional*. Prosiding Simposium V Pemuliaan Tanaman. PERIPI Komda Jawa Timur.
- Mejaya, M. Azrai dan R. N. Iriany, 2003. *Pembentukan Varietas Unggul Jagung Bersari Bebas*. Balai Penelitian Serealia, Maros Ujung Pandang.
- Moladno,2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda dan USESE Foundation, Bogor.

- D. Myers, 1999. *Surfaces, Interfaces, and Colloids, Principles and Applications*, Second Edition, John Wiley & Sons
- Pabendon, M.B., M. Azrai, F. Kasim, dan Made J. Mejaya, 2011. *Prospek Penggunaan Markah Molekuler Dalam Program Pemuliaan Jagung*. Balai Penelitian Tanaman Serealia
- R. Neni Iriany, M. Yasin H.G., dan Andi Takdir M. *Asal, Sejarah, Evolusi, dan Taksonomi Tanaman Jagung*. Balai Penelitian Tanaman Serealia, Maros
- Saili, T. 2010. *Pengaruh pengering bekuan Terhadap Morfologi Spermatozoa Domba*. <http://takdirsaili.wordpress.com>
- Singh, R.k. and B.D. Chaudary, 1979. *Biometrical Methods in Quantitative Genetic Analysis. Revised Edition*. Kalyani Publisher, New Delhi.
- Soemartono, Nasrullah dan Hari Hartiko, 1992. *Genetika Kuantitatif dan Bioteknologi Tanaman*. PAU Bioteknologi, UGM, Yogyakarta. 371 h.
- Suarni dan S. Widowati, 2005. *Struktur, Komposisi, dan Nutrisi Jagung*. Balai Penelitian Tanaman Serealia, Maros
- Syukri, S. 1999. *Kimia Dasar I*. Bandung : ITB.
- Syukri.1999. *Kimia Dasar Jilid 2*.Bandung: UI Press.
- Watson, D. James, 1988, *DNA recombination*. Erlangga. Jakarta
- Warisno. 1998. *Jagung Hibrida*. Kanisius. Yogyakarta.
- Winarno, F.G., 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Wang, J. Wang, L. Zheng, T. Jiang, G. Cheng, and S. Wang, 2011 *App. Surf. Sci.*

LAMPIRAN 1

Pengenceran DNA Jagung Pulut dari Uji Kualitas dan kuantitas DNA di alat spektrofotometer

$$M1.V1 = M2.V2$$

M1 = Konsentrasi DNA yang tertera di alat nano spektrofotometer (ng/μl)

M2 = Konsentrasi DNA setelah diencerkan setara 10 ng/μl

V1 = Volume Nanopure yang akan ditambahkan (μl)

V2 = Volume DNA yang akan diencerkan (μl)

Maka dari Hasil uji Kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut di alat spektrofotometer diencerkan menjadi setara 10 ng/μl.

Pulut A

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$(225 \text{ ng/}\mu\text{l}).(V1) = (10 \text{ ng/}\mu\text{l}).(100 \mu\text{l})$$

$$V1 = \frac{1000}{225}$$

V1 = 4.4 μl (Volume DNA jagung yang diencerkan)

Volume ddH₂O yang ditambahkan sebanyak = 100μl - 4.4 μl

$$\text{Volume ddH}_2\text{O} = 95,6 \mu\text{l}$$

Pengenceran DNA hasil uji kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut di alat spektrofotometer dengan menggunakan **nitrogen cair**

NO	Nama Aksesi	Ekstraksi dengan Nitrogen Cair		
		Konsentrasi (ng/μl)	Volume DNA yang dilarutkan (μl)	Volume ddH ₂ O (μl)
1	Pulut A	225	4.4	95.6
2	Pulut B	223	4.5	95.5
3	Pulut C	157	6.3	93.7
4	Pulut D	82.3	12.1	87.9
5	Pulut E	130	10	90
6	Pulut F	151	7.6	92.4
7	Pulut G	206	7.5	92.5
8	Pulut H	132	7.6	92.4
9	Pulut I	194	5.1	94.9
10	Pulut J	172	5.8	94.2

Pengenceran DNA hasil uji kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut di alat spektrofotometer dengan menggunakan **Buffer CTAB**

NO	Nama Akses	Ekstraksi dengan Buffer CTAB		
		Konsentrasi (ng/μl)	Volume DNA yang dilarutkan (μl)	Volume ddH ₂ O (μl)
1	Pulut A	237	4.2	95.8
2	Pulut B	239	4.2	95.8
3	Pulut C	223	4.5	95.5
4	Pulut D	227	4.4	95.6
5	Pulut E	231	4.3	95.7
6	Pulut F	229	4.4	95.6
7	Pulut G	232	4.3	95.7
8	Pulut H	232	4.3	95.7
9	Pulut I	214	4.7	95.3
10	Pulut J	232	4.3	95.7

LAMPIRAN 2

Pengenceran DNA Jagung Pulut hasil uji kualitas dan kuantitas DNA di gel agarosa

$$M1.V1 = M2.V2$$

M1 = Konsentrasi DNA yang terlihat di gel agarosa (ng/μl)

M2 = Konsentrasi DNA setelah diencerkan setara 10 ng/μl

V1 = Volume Nanopure yang akan ditambahkan (μl)

V2 = Volume DNA yang akan diencerkan (μl)

Maka dari Hasil uji Kualitas dan kuantitas DNA jagung pulut di gel agarosa diencerkan menjadi setara 10 ng/μl.

Pulut A

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$(100 \text{ ng/}\mu\text{l}).(V1) = (10 \text{ ng/}\mu\text{l}).(100 \mu\text{l})$$

$$V1 = \frac{1000}{100}$$

V1 = 10 μl (Volume DNA jagung yang diencerkan)

Volume ddH₂O yang ditambahkan sebanyak = 100μl - 10 μl

$$\text{Volume ddH}_2\text{O} = 90 \mu\text{l}$$

Pengenceran DNA hasil uji di gel agarose dengan menggunakan nitrogen cair

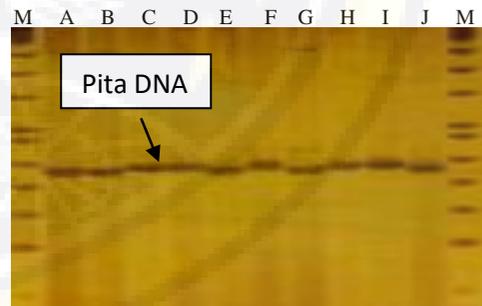
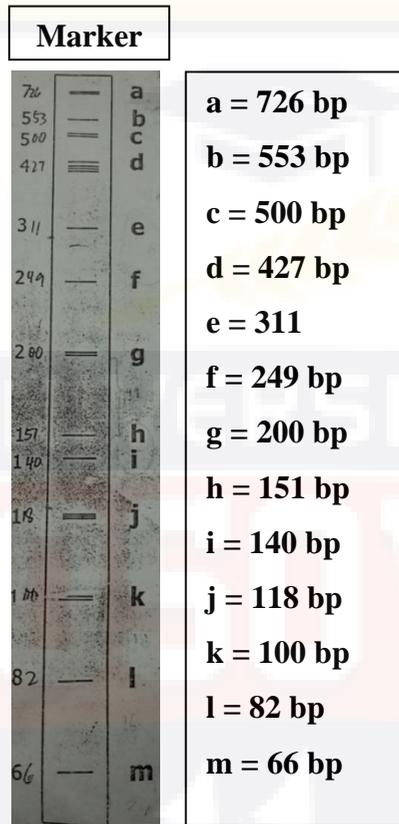
NO	Nama Aksesi	Ekstraksi dengan Nitrogen Cair		
		Konsentrasi (ng/μl)	Volume DNA yang dilarutkan (μl)	Volume ddH ₂ O (μl)
1	Pulut A	100	10	90
2	Pulut B	200	5	95
3	Pulut C	75	13.3	86.7
4	Pulut D	50	20	80
5	Pulut E	100	10	90
6	Pulut F	150	6.7	93.3
7	Pulut G	150	6.7	93.3
8	Pulut H	150	6.7	93.3
9	Pulut I	150	6.7	93.3
10	Pulut J	150	6.7	93.3

Pengenceran DNA hasil uji di gel agarose dengan menggunakan buffer CTAB

NO	Nama Aksesori	Ekstraksi dengan Buffer CTAB		
		Konsentrasi (ng/ μ l)	Volume DNA yang dilarutkan (μ l)	Volume ddH ₂ O (μ l)
1	Pulut A	100	10	90
2	Pulut B	100	10	90
3	Pulut C	100	10	90
4	Pulut D	100	10	90
5	Pulut E	100	10	90
6	Pulut F	100	10	90
7	Pulut G	100	10	90
8	Pulut H	100	10	90
9	Pulut I	100	10	90
10	Pulut J	100	10	90

LAMPIRAN 3

Base pair Marker Φ X174 DNA/Hinfi Dephosphorylated Markers



Letak pita DNA jagung pulut berada diantara pita i dan j atau berada diantara 118-140 bp. Dilihat dari letak pita DNA jagung pulut dan Base pair Marker Φ X174

LAMPIRAN 4

Larutan-larutan Kerja

Tris (pH 8.0) 1M

Larutkan 121.1 g Tris base dalam 800 ml H₂O *ultrapure*. Atur pH sesuai dengan yang diinginkan dengan penambahan HCl. Biarkan larutan tersebut dingin sampai suhu ruang sebelum pengaturan akhir pH. Cukupkan volume dari larutan sampai 1 liter dengan H₂O. Bagi menjadi aliquot-aliquot dan sterilkan dengan *autoclave*.

NaCl 5M

Larutkan 292.2 g NaCl dalam 800 ml H₂O *ultrapure*. Cukupkan volume sampai 1 liter dengan H₂O. Bagi ke dalam aliquot-aliquot dan sterilkan dengan *autoclave*.

EDTA (pH 8.0) 0.5M

Tambahkan 186.1 g disodium ethylenediaminetetraacetate.2H₂O (BM 372.2) pada 800 ml H₂O *ultrapure*. Aduk dengan cepat menggunakan pengaduk magnetik. Atur pH menjadi 8.0 dengan NaOH (\approx 20 g NaOH pelet). Cukupkan volume sampai 1 liter dengan H₂O. Bagi ke dalam aliquot-aliquot dan sterilkan dengan *autoclave*.

Sodium acetate (pH 5.2) 3.0 M

Larutkan 408.1 g sodium asetat. 3H₂O dalam 800 ml H₂O *ultrapure*. Atur pH sampai 5.2 dengan *glacial acetic acid*. Cukupkan volume sampai 1 liter dengan H₂O. Bagi ke dalam aliquot-aliquot dan sterilkan dengan *autoclave*.

Chloroform-Isoamyl alcohol (24:1 v/v)

Campurkan 960 ml chloroform dan 40 ml Isoamyl alcohol. Simpan pada suhu ruang.

Ethanol 70%

Dalam botol bersih, campurkan 350 ml ethanol absolut dan 150 ml air *ultrapure*. Simpan pada -20°C .

TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) 1 x

Campurkan 1.0 ml Tris 1M (pH 8.0) dan 200 µl EDTA 0.5 M, dan cukupkan volume menjadi 100 ml dengan air *ultrapure*. Sterilkan dengan otoklaf.

RNase 10 mg/ml

Timbang 100 mg Rnase dan larutkan dalam sodium acetate 0.01 M (pH 5.2). Panaskan 100°C selama 15 menit dan dinginkan sampai suhu ruang. Cukupkan volume dengan penambahan 0.1 volume Tris-Cl 1 M (pH 7.4). Bagi menjadi *aliquot-aliquot* dan simpan pada -20°C.

TBE 5 x

Larutkan 54 g Tris base dalam 800 ml H₂O *ultrapure* dengan pengadukan. Tambahkan 27.5 g boric acid dan aduk untuk melarutkan. Tambahkan 20 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0) dan cukupkan volume menjadi 1 liter terbendengan H₂O. Simpan larutan ini dalam botol gelas pada suhu ruang.

Gel Loading Buffer 6x

Untuk menyiapkan 100 ml, larutkan 0,25 g bromophenol blue (“fast blue”) dan 0,25 g xylene cyanol FF (“slow blue”) dalam 100 ml dalam 30% gliserol dalam air. Simpan pada 4°C.

Ethidium bromida (Et Br) 10 mg/ml

Tambahkan 1 g ethidium bromida ke dalam 100 ml H₂O *ultrapure*. Aduk dengan pengaduk magnetik selama beberapa jam agar pewarna tersebut terlarut. Bungkus botol larutan tersebut dengan *aluminium foil* atau pindahkan larutan tersebut ke dalam botol gelap dan simpan pada suhu ruang.

Perhatian: Ethidium bromida adalah senyawa sangat mutagen dan sedikit beracun. Selalu gunakan sarung tangan bila bekerja dengan larutan yang mengandung pewarna ini, dan masker seharusnya selalu dikenakan bila membawa larutan tersebut.

Larutan staining EtBr

Larutkan 100 ml dari 1 EtBr 0 mg/ml dalam 1 liter H₂O *ultrapure*. Masukkan larutan tersebut dalam sebuah tray dengan tutup untuk melindungi dari cahaya.

Setelah digunakan, larutan sebaiknya didekontaminasi dengan mencampur 100 mg bubuk arang aktif untuk tiap 100 ml larutan. Simpan larutan tersebut selama satu jam pada suhu ruang, goyang perlahan. Saringlah larutan dengan saring Whatman No. 1, dan buang filtrat. Bungkus saringan dan arang aktif dalam kantong plastik dan buang dalam tempat sampah yang khusus untuk senyawa berbahaya. *Ethidium bromida* didekomposisi pada 262°C dan akan menjadi tidak berbahaya setelah ditangani menggunakan kondisi standar.

Larutan Stop Sekuensing

Formamide dideionisasi dengan mencampurkan 45 ml formamide dengan 5 g resin dalam 50 ml tabung *Corning* selama 30 menit. Saring dua kali melalui kertas Whatman No. 1. Untuk menyiapkan 100 ml stop solution, campur komponen sebagai berikut. Bagi menjadi *aliquot-aliquot* dan simpan pada 4°C.

STOK	Konsentrasi Akhir	Jumlah
5N NaOH	10 mM	0.2 ml
99% Formamide	95%	96 ml
Bromophenol blue	0.05%	50 mg
Xylene Cyanol	0.05%	50 mg
Ultrapure H ₂ O		3.8 ml

Perhatian : Formamide berbahaya apabila tertelan, terhirup atau terserap melalui kulit, mungkin menyebabkan iritasi pada kulit, mata dan saluran pernafasan, mempengaruhi dan dapat mempengaruhi sistem reproduksi. Gunakan pakaian pelindung, sarung tangan dan masker bila menangani larutan yang mengandung senyawa ini. Persiapkan larutan di dalam fume hood.

Acrylamide/Bis-Acrylamide (19:1) 40%

Masukkan pengaduk magnetik dalam gelas beaker 500 ml, tuangkan 500 ml H₂O dan tandai batas 500 ml. Ambil pengaduk magnetik dan keringkan gelas beaker tersebut. Masukkan 190 g Akrylamid dan 10 g Bis-Acrylamid ke dalam gelas beaker dan tambahkan air *ultrapure* kira-kira 400 ml. Aduk hingga larut sempurna, kemudian cukupkan larutan hingga 500ml. Saring larutan dengan kertas saring ukuran 0.45 µm. Simpan larutan tersebut dalam botol gelap pada suhu 4°C.

Perhatian : Akrilamid merupakan senyawa berbahaya bila dihirup atau diserap melalui kulit, juga mempengaruhi sistem saraf pusat dan perifer dan sistem reproduksi, menyebabkan iritasi kulit, mata dan saluran pernafasan, dan dapat menyebabkan kanker. Gunakan selalu pakaian pelindung, sarung tangan, dan *goggles* ketika menangani senyawa ini. Persiapkan larutan ini di dalam fume hood.

Solusi Denaturasi Akrilamid 4.5%

Timbang 210 g urea dalam 500 ml gelas beaker, masukkan pengaduk magnetik dan tambahkan H₂O *ultrapure* sampai 325 ml. Aduk untuk melarutkan. Tambahkan 100 ml TBE 1 x dan 56.8 ml larutan stok akrilamid 40%. Cukupkan volume sampai 500 ml. Saring larutan tersebut dengan filter 0,45 mm. Simpan larutan pada botol gelap pada 4°C.

Ammonium persulfate (APS) 10%

Larutkan 1.0 g APS dalam 10 ml H₂O *ultrapure*. Simpan larutan pada 4°C.

Perhatian : APS adalah pengoksidasi kuat, kontak dengan material lain mungkin dapat menyebabkan kebakaran. Berbahaya jika tertelan dan dihirup, juga dapat menyebabkan ke kulit dan mata terbakar, dapat menyebabkan alergi kulit atau reaksi pernafasan. Gunakan selalu pakaian pelindung, sarung tangan dan masker ketika menangani senyawa tersebut.

Larutan Bind Silane

Dalam penampang yang bersih, campurkan 0.5 ml asam acetat glasial, 95 ml ethanol absolut dan 4,5 ml H₂O *ultrapure*. Masukkan dalam botol yang rapat dan simpan pada suhu ruang.

Perhatian : Asam asetat adalah senyawa korosif. Cairan dan asapnya dapat menyebabkan luka bakar yang hebat pada semua jaringan tubuh. Dapat berakibat fatal jika tertelan dan berbahaya jika terhirup. Bila terhirup dapat menyebabkan kerusakan paru-paru dan gigi. Merupakan senyawa yang mudah terbakar dan berasap. Penanganan selalu di dalam fume hood.

Sodium thiosulfat 1%

Larutkan 100 mg sodium thiosulfat dalam 10 ml H₂O *ultrapure*. Simpan pada suhu ruang.

Perhatian : Sodium thiosulfat adalah pengoksidasi kuat. Kontak dengan material lain dapat menyebabkan api. Berbahaya jika tertelan atau terhisap. Dapat menyebabkan iritasi pada kulit, mata, dan saluran pernapasan. Gunakan selalu pakaian pelindung, sarung tangan, pelindung mata dan masker ketika menangani senyawa tersebut.

Pembuatan Cocktail PCR untuk 1x reaksi

No.	Larutan stok	Volume (µL)
1	Enzim	6,25
2	Primer	0,5
3	DNA	1
4	Nanopure (ddH ₂ O)	2,25
Volume total		10

Siklus reaksi proses PCR

Tahap	Reaksi	Kondisi
1	<i>Initial denaturation</i>	94°C selama 2 menit
2	<i>Denaturation</i>	94°C selama 30 detik
3	<i>Annealing</i>	56°C selama 1 menit
4	<i>Extension</i>	72°C selama 1 menit
5	<i>Cycling</i>	Kembali ke step 2, 29 kali
6	<i>Final Extension</i>	72°C selama 5 menit
7	<i>Soak</i>	4°C, α

Silver Staining

Elektroforesis menggunakan teknik pewarnaan perak (*silvertstaining*) mengikuti protokol George *et al.* (2004), Bahan-bahan yang diperlukan untuk pembuatan PAGE 8% dan silverstaining disajikan dalam tabel berikut:

Bahan untuk pembuatan 8% *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE)

No	Larutan Stok	Volume (mL)
1	Acrylamide	100
2	10x Tris-borate-EDTA (TBE)	50
3	ddH ₂ O	350
Total Volume		500

Bahan kimia yang digunakan pada proses elektroforesis vertical di gel polyakrilamid

No	Bahan	Volume
1	8% PAGE (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)	50 mL
3	N,N,N',N'-tetrametil-etiled-diamin (TEMED)	50 μ L
4	Ammonium persulfat (APS)	500 μ L

LAMPIRAN 5

DAFTAR SIMBOL DAN ISTILAH

$^{\circ}\text{F}$: derajat Fahrenheit
$^{\circ}\text{K}$: derajat Kelvin
λ	: Lamda DNA
μl	: mikroliter
bp	: basepair
g/ml	: gram per milliliter
mg/ml	: milligram per milliliter
mM	: millimolar
ng/ μl	: nanogram per mikroliter
OD	: Optical density
Rpm	: Revolutions Per Minute
β -mercaptoethanol	: beta mercaptoethanol
APS	: Ammonium persulfate
CTAB	: Cetyltrimethylaminium Bromide
dd H ₂ O	: double-distilled water
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Acetat
EtBr	: Etidium bromide
HCl	: Asam Hidroklorida
LN	: Liquid Nitrogen
NaCl	: Natrium Clorida
NH ₄ Ac	: Amonium Asetat
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SDS	: Sodium Dodesli Sulfat
TBE	: Tris-borate-EDTA
TE	: Tris-EDTA

Albumin : protein utama yang terdapat dalam darah manusia. Mengatur tekanan osmotik dalam darah

Amilosa : daya pengembangan

Amilopektin : sifat sensoris terutama tekstur dan rasa

Asam nukleat : senyawa yang mengandung basa nitrogen (struktur siklik aromatik yang memiliki atom nitrogen) sebagai bagian dari struktur asam nukleat

Browning : proses kecoklatan

Endosperma : bagian dari biji tumbuhan berbunga (Anthophyta) yang merupakan hasil dari pembuahan berganda selain embrio.

Eksplorasi potensi genetik : mendapatkan kultivar atau varietas budidaya baru yang berkualitas tinggi pada kondisi lingkungan tertentu.

Fenotipik : karakteristik (baik struktural, biokimiawi, fisiologis, dan perilaku) yang dapat diamati dari suatu organisme.

filogeni : kajian mengenai hubungan di antara kelompok-kelompok organisme

Genom : dalam genetika dan biologi molekular modern, adalah keseluruhan informasi genetik yang dimiliki suatu sel atau organisme,

Genotipe : keadaan genetik dari suatu individu atau sekumpulan individu populasi.

Globulin : protein yang dapat tidak larut dalam air, tetapi larut dalam larutan garam

Glutelin : protein sederhana, berasal dari tumbuhan, tidak dapat larut dalam air, alkohol, ataupun dalam larutan garam tetapi larut dalam larutan encer asam ataupun basa.

Heterozigot : terjadi ketika individu memiliki alel-alel yang berbeda pada suatu lokus untuk setiap kromosomnya

Hereditas : pewarisan watak dari induk ke keturunannya baik secara biologis melalui gen (DNA) atau secara sosial melalui pewarisan gelar, atau status sosial.

Histon : protein yang ditemukan pada inti sel eukariota yang terbungkus DNA, yang kemudian bersama DNA menyusun struktur nukleosom.

Homozigot : terjadi ketika individu memiliki kromosom dengan alel yang sama atau identik untuk disetiap lokus gen-gennya.

Kloroplas : plastid yang mengandung klorofil.

Markah molekuler : teknik yang digunakan untuk mengukur dan menganalisa genom yang terdapat pada tanaman.

Mitokondria : sendiri berfungsi dalam respirasi sel yaitu menghasilkan energi.

Nisbah ; kelarutan air

Nukleus (Inti sel) : organel yang ditemukan pada sel eukariotik.

Pengklonan gen : suatu upaya tindakan untuk memproduksi atau menggandakan sejumlah individu yang hasilnya secara genetic sama persis (identik) berasal dari induk yang sama, mempunyai susunan (jumlah dan **gen**) yang sama

Pautan gen : Pindah Silang pada Pewarisan Sifat

PCR (Polymerase Chain Reaction) : Reaksi berantai polymerase dan merupakan suatu teknik atau metode perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme.

Prolamin : protein yang tidak larut dalam air tetapi larut dalam etanol 70-80%.

Proteinase K.: Fungsinya untuk memotong-motong atau memutus ikatan peptida dari protein-protein sel bakteri

Purin dan pirimidin : basa nitrogen yang membentuk dua jenis dasar nukleotida dalam DNA dan RNA.

RNA (ribonucleic acid) : molekul polimer yang terlibat dalam berbagai peran biologis dalam mengkode, dekode, regulasi, dan ekspresi gen.

Rnase (ribonuklease) : Sekelompok enzim yang mengkatalisasi pembelahan nukleotida dalam RNA dan menguraikannya menjadi komponen yang lebih kecil.

Sequencing : metode yang digunakan untuk menentukan urutan basa nukleotida pada molekul DNA

SSR (simple sequence repeat) : Bentuk pengulangan sekuen DNA sederhana yang berulang-ulang menjadikan markamikrosatelit sering disebut simple sequence repeat



LAMPIRAN 4

Gambar Proses Isolasi DNA Tanaman Jagung Pulut



Pengambilan Sampel Daun Tanaman Jagung Pulut



Menggunting Sampel Daun Tanaman menjadi lebih kecil



Menimbang sampel daun



Daun Jagung yang sudah di gerus



Penggerusan daun Jagung Pulut menggunakan buffer CTAB



Penggerusan Daun Jagung Pulut menggunakan Nitrogen



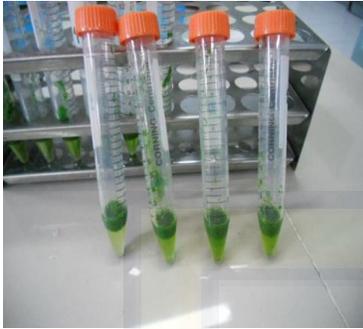
Penambahan 10 μ l Merchптоethanol



Menginkubasi di dalam waterbath



Penambahan Chisam



Setelah ditambahkan Chisam



Shaker



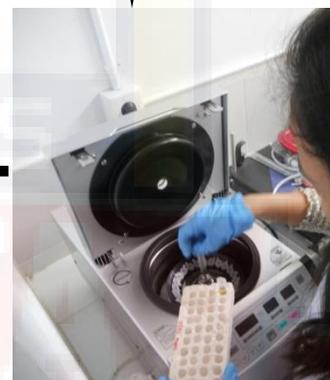
Pemindahan daun jagung yang sudah dishaker ke tube



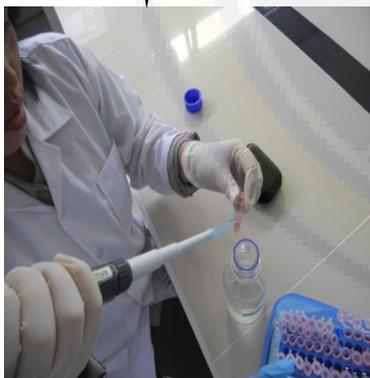
Penyedotan Supernatan dan memindahkan ke tube yang kosong



Setelah disentrifugasi



Sentrifugasi daun yang sudah di shaker



Penambahan Isopropanol dingin



Setelah ditambah Isopropanol



Diputar sampai terbentuk untaian DNA



Terbentuk Untaian DNA



Isopropanol Dibuang



Terbentuk Pelet DNA



Penambahan TE Buffer



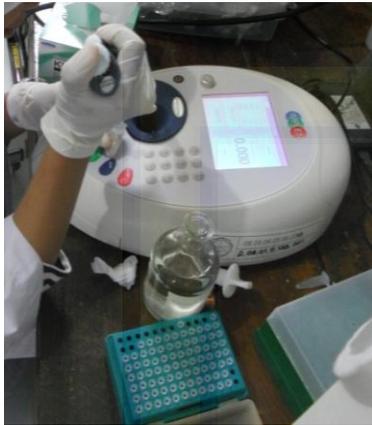
Mengeringkan pellet DNA
dalam oven



Pelet DNA dicuci ethanol
70% 2 kali

LAMPIRAN 5

Gambar Uji kualitas dan kuantitas DNA Jagung Pulut



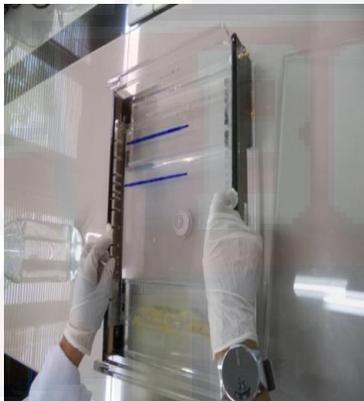
Uji kualitas dan kuantitas di spektrofotometer



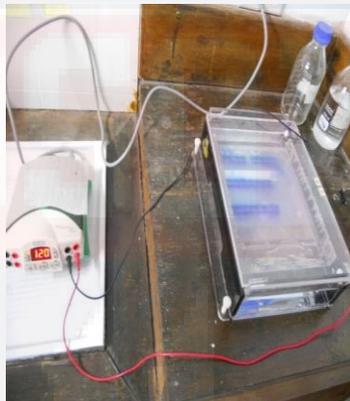
Hasil uji di spektrofotometer



Pembuatan Gel Agarosa



Elektroforesis horizontal



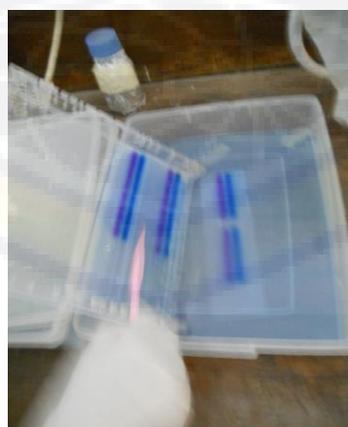
Elektroforesis dialiri listrik



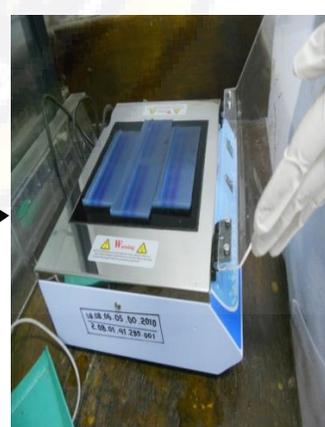
Running di gel Agarosa



Merendam di dalam etidium bromide



Merendam di dalam akuades



Meletakkan diatas UV Transilluminator



Visualisasi dengan kamera



Pengenceran DNA



Pembuatan Cocktail DNA



Casting plate



Casting Gel polykrilamid



PCR



Running di gel Akrilamid