

**OPTIMALISASI TEKNIK ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA MENGGUNAKAN
METODE SETIL TRIMETIL AMONIUM BROMIDA (CTAB) PADA
TANAMAN MARKISA (*Passiflora* spp.) DATARAN RENDAH
KABUPATEN JENEPONTO**

**A. FARHANAH
G111 10 253**



**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2014**

**Optimalisasi Teknik Isolasi Dan Purifikasi Dna Menggunakan
Metode Setil Trimetil Amonium Bromida (CTAB) pada
Tanaman Markisa (*Passiflora spp.*) Dataran Rendah
Kabupaten Jeneponto**

SKRIPSI

Diajukan untuk menempuh Gelar Sarjana Pertanian pada
Program Studi Agroteknologi Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin

**A. FARHANAH
G111 10 253**



**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2014
OPTIMALISASI TEKNIK ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA
MENGUNAKAN METODE SETIL TRIMETIL AMONIUM BROMIDA**

**(CTAB) PADA TANAMAN MARKISA (*Passiflora spp.*) DATARAN
RENDAH
KABUPATEN JENEPONTO**

**A. FARHANAH
G111 10 253**

Makassar, Februari 2014
Menyetujui:

Pembimbing I

Pembimbing II

. Ir. Rinaldi Sjahril, M Agr, PhD
NIP. 19660925 199412 1 001

Abdul Mollah, S.P., M.Si
NIP. 19740615 200604 1 001

Mengetahui:
Ketua Jurusan Budidaya Pertanian

Prof. Dr. Ir. Elkawakib Syam'un, M.P.
NIP.19560318 198503 1 001

PENGESAHAN

**JUDUL : OPTIMALISASI TEKNIK ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA
MENGUNAKAN METODE SETIL TRIMETIL AMONIUM
BROMIDA (CTAB) PADA TANAMAN MARKISA (*Passiflora spp.*)
DATARAN RENDAH KABUPATEN JENEPONTO**

NAMA : A. FARHANAH

NIM : G111 10 253

Skripsi ini telah diterima dan dipertahankan pada Hari Senin, 10 Februari 2014 di hadapan Pembimbing/Penguji berdasarkan Surat Keputusan No.020/H.04.12.5.1/PP.27/2014, dengan susunan sebagai berikut :

Dr. Ir. Novaty Eny Dunga, MP (Ketua) _____

Nurfaidah, S.P., M.Si (Sekretaris) _____

Ir. Rinaldi Sjahril, M.Agr., Ph.D (Pembimbing) _____

Abdul Mollah, S.P., M.Si (Pembimbing) _____

Dr. Ir. Muh. Riadi, M.P (Anggota) _____

Dr. Ir. Muh. Danial Rahim, M.P (Anggota) _____

Cri Wahyuni Brahmi Yanti, SP., M.Si (Anggota) _____

RINGKASAN

A. FARHANAH. (G111 10 253), Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA menggunakan *Buffer CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide)* pada Tanaman Markisa (*Passiflora spp.*) Dataran Rendah Kabupaten Jeneponto (Dibimbing oleh **RINALDI SJAHRIL** dan **ABDUL MOLLAH**).

Penelitian ini dilaksanakan di dua tempat, yaitu untuk pengambilan sampel tanaman markisa dilakukan di Kabupaten Jeneponto dan untuk pengisolasian dan pengujian DNA dilakukan di Laboratorium Sumber Daya Hayati Tanaman dan Biosains Terapan, Program Studi Agroteknologi, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin. Penelitian ini berlangsung dari bulan September 2013 hingga Desember 2013. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan protokol metode CTAB dan metode purifikasi DNA yang tepat untuk menghasilkan kuantitas dan kualitas DNA yang baik yang berasal dari tanaman markisa dataran rendah. Penelitian dilaksanakan dalam enam protokol isolasi DNA dengan menggunakan metode CTAB, pengujian kualitas serta kuantitas DNA, pemurnian (purifikasi) DNA pada hasil isolasi terbaik, dan pengujian kualitas serta kuantitas pada hasil pemurnian. Berdasarkan uji kualitas dan kuantitas, protokol E merupakan protokol yang baik digunakan untuk mengisolasi DNA daun tanaman markisa dataran rendah Kabupaten Jeneponto. Berat sampel sebesar 0,200 g, suhu inkubasi hasil ekstraksi pada suhu 65°C selama 30 menit, dan kecepatan sentrifugasi sebesar 12.000 rpm selama 10 menit dapat menghasilkan DNA yang memiliki kemurnian yang cukup baik dan menampakkan pita DNA yang cukup tebal berkisar 1500 – 5000 bp setelah hasil isolasi DNA dielektroforesis. Sedangkan pemurnian pada hasil isolasi DNA protokol E menggunakan kloroform : isoamylalkohol, isopropanol, dan ethanol 70% menunjukkan kualitas dan kuantitas DNA yang cukup baik.

Kata kunci: Markisa, Dataran Rendah, CTAB, Isolasi DNA, Kualitas dan Kuantitas

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah, segala puji dan syukur kepada Allah SWT atas limpahan rahmat, petunjuk, hidayah dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Salam dan shalawat kepada junjungan Nabi Besar Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabatnya, tabi'in, tabi'ut tabiin dan orang-orang yang istiqomah hingga akhir zaman kelak, Insya Allah.

Penelitian ini didasari oleh kemampuan mengisolasi DNA tanaman sangat diperlukan karena sangat bermanfaat dalam kajian ilmu biologi molekuler dan ilmu lainnya. Hal ini berkaitan dengan pemanfaatan hasil analisis dari DNA tanaman yang dapat digunakan untuk berbagai macam hal, seperti mengetahui hubungan kekerabatan, evolusi dan lain sebagainya. Beberapa teknik dan protokol isolasi DNA telah dipublikasikan, tetapi seringkali tidak dapat diaplikasikan karena genus atau bahkan spesies tanaman bersifat sangat spesifik, termasuk pada tanaman markisa dataran rendah yang saya peroleh dari Kabupaten Jeneponto Sulawesi Selatan.

Kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak yang senantiasa membantu dalam mewujudkan tulisan ini, yaitu:

1. Kepada kedua orang tua penulis Ayahanda **Ir. Muh. Haris, M.Sc.**, dan Ibunda **A. Tenri Uji Amin, S.H.**, atas limpahan kasih sayang dan doa yang tanpa henti, demikian pula kepada keluarga besarku yang telah memberikan perhatian dan bantuan baik moril maupun materil.

2. Dosen pembimbing, Bapak **Ir. Rinaldi Sjahril, M.Agr., Ph.D** dan Bapak **Abdul Mollah, S.P., M.Si.**, atas bimbingan dan arahannya mulai dari rencana penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Dosen penguji, Bapak **Dr. Ir. Muh. Riadi, M.P.**, Bapak **Ir. M. Amin Ishak, M.Sc.**, Bapak **Dr. Ir. Muh. Danial Rahim, M.P.**, dan Ibu **Cri Wahyuni Brahmi Yanti, SP., M.Si** yang telah memberikan saran kepada saya untuk tersusunnya skripsi ini.
4. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Budidaya Pertanian pada khususnya dan dosen Fakultas Pertanian pada umumnya serta seluruh staf dan pegawai atas segala bantuan yang telah diberikan.
5. Bapak **Miseng** yang telah membantu saya untuk penyediaan bahan penelitian dan sahabat-sahabat Chitra Putri, Ana Hasra, Jabal Rahmat, Fadli Esa, Mias, Ayu Suci, Rahmah, Ruslan, dan Ryan, serta La Ode Muh. Wikra yang selalu memberikan semangat kepada penulis dalam merampungkan skripsi ini.
6. Rekan-rekan di laboratorium Sumber Daya Hayati Tanaman dan Biosains Terapan: Haeriyah, kakanda Amanda A. Patappari, Asia Arifin, Sri Agusmawati J, Hasriati Saleh, Nur Syamsi, Mr. Peter, dan A. Fifin K.
7. Teman-teman *Hybrid* 2010 dan Himagro, atas segala bantuan dan kebersamaannya dari awal hingga akhir studi, semoga jalinan persaudaraan tidak akan pernah terputuskan.
8. Teman-teman Agroteknologi 2010, atas segala bantuan dan dukungannya, serta semua pihak yang tak dapat saya sebutkan satu-persatu.

Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen-dosen dan teman-teman KKN SUIJI 2013 dan Bapak Prof. La Ode Asrul yang telah mengajarkan pengalaman-pengalaman yang luar biasa semasa kuliah.

Penulis menyadari segala kekurangan yang terdapat dalam tulisan ini. Penulis mengucapkan maaf atas segala kekurangan yang ada dalam tulisan ini. Semoga Allah SWT memberkahi tulisan ini dan memberikan manfaat bagi kita semua, amin.

Makassar, Februari 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Hipotesis	5
1.3. Tujuan dan Kegunaan	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Markisa (<i>Passiflora</i> spp.).....	6
2.2. Isolasi DNA Menggunakan CTAB	8
2.3. Purifikasi (Pemurnian) DNA	10
2.4. Konsentrasi dan Kemurnian DNA.....	12
2.5. Elektroforesis Gel Agarosa.....	13
BAB III. BAHAN DAN METODE	16
3.1. Tempat dan Waktu	16
3.2. Bahan dan Alat	16
3.3. Metode Percobaan	17
3.4. Pelaksanaan Penelitian	17
3.4.1. Pengambilan Sampel Tanaman	17
3.4.2. Isolasi DNA	17
3.4.3. Uji Kualitas dan Kuantitas Hasil Ekstraksi DNA Markisa	20
3.4.3. Pemurnian DNA Markisa.....	20
3.4.3. Uji Kualitas dan Kuantitas Hasil Pemurnian DNA Markisa	21
3.5. Parameter Pengamatan	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	23

4.1. Hasil	23
4.1.1. Hasil Pengujian Kemurnian DNA Hasil Isolasi DNA Tanaman Markisa	23
4.1.2. Hasil Uji Pita DNA Hasil Isolasi DNA Tanaman Markisa	25
4.1.3. Hasil Hasil Pengujian Kemurnian DNA pada Hasil Pemurnian Sampel	28
4.1.4. Hasil Uji Pita DNA Hasil Pemurnian Sampel	29
4.2. Pembahasan	30
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1. Kesimpulan	34
5.2. Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Tabel optimasi metode ekstraksi menggunakan larutan <i>buffer</i> CTAB pada DNA tanaman markisa dataran rendah Kabupaten Jenepono	19
2.	Hasil uji kualitas dan kuantitas isolasi DNA menggunakan nanospektrofotometri	23
3.	Hasil uji kuantitas DNA hasil pemurnian sampel hasil ekstraksi menggunakan metode E	28
Lampiran		
1.	Komposisi <i>Carlson Lysis Buffer</i>	38
2.	Komposisi <i>TE (Tris EDTA) Buffer</i>	39
3.	Komposisi <i>TBE (Tris Borate EDTA) 5x</i>	40
4.	Komposisi 1% Gel Agarosa	41

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Hasil ekstraksi DNA tanaman markisa menggunakan protokol A	25
2.	Hasil ekstraksi DNA tanaman markisa menggunakan protokol B.....	25
3.	Hasil ekstraksi DNA tanaman markisa menggunakan protokol C.....	26
4.	Hasil ekstraksi DNA tanaman markisa menggunakan protokol D....	27
5.	Hasil ekstraksi DNA tanaman markisa menggunakan protokol E.....	27
6.	Hasil ekstraksi DNA tanaman markisa menggunakan protokol F.....	28
7.	Hasil pemurnian dengan chloform-isoamylalcohol, isopropilalkohol, dan ethanol pada sampel ekstraksi protokol E.....	29

Lampiran

1.	Buah dari 9 sampel tanaman markisa dataran rendah Kabupaten Jeneponto	43
2.	Persiapan ekstraksi DNA daun markisa; (a). lumpang berisi pasir silika, dan (b) larutan <i>buffer</i> CTAB 2%.....	44
3.	Isolasi DNA markisa; (a) penambahan cloroform : isoamylalkohol, dan (b) pencampuran dengan cara dibolak-balik sebanyak 100 kali. .	44
4.	Hasil isolasi DNA markisa yang siap diuji kualitas dan kuantitasnya; (a) hasil isolasi DNA markisa, dan (b) <i>pellet</i> yang diperkirakan sebagai DNA	45
5.	Hasil isolasi DNA markisa dielektroforesis untuk melihat ada atau tidaknya pita DNA.	45
6.	Pengujian hasil isolasi dengan menggunakan alat nanospektrofotometri	46

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ketersediaan varietas unggul, baik mutu, produktivitas, maupun ketahanannya terhadap hama-penyakit dan cekaman lingkungan, serta yang sesuai dengan kebutuhan konsumen, menjadi syarat yang harus dipenuhi pada era industrialisasi pertanian dan liberalisasi perdagangan. Tanaman buah diharapkan menjadi pertumbuhan baru di sektor pertanian, maka upaya menghasilkan komoditas buah-buahan unggul bermutu tinggi dengan keunggulan kompetitif tinggi dan potensi hasil tinggi harus menjadi landasan kerja yang utama saat ini. Varietas yang unggul dapat dirakit jika tersedia sumberdaya genetik yang mempunyai karakter sesuai dengan yang dikehendaki (Karsinah *et al.*, 2007). Penelitian keragaman genetik tanaman buah merupakan salah satu kegiatan penting untuk mendukung pemuliaan tanaman. Perbedaan tanaman dapat dideteksi melalui beberapa penanda, antara lain dengan pola pita DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) (Lamadji, 1998), yang sering disebut sebagai penanda molekuler. Penanda molekuler berperan penting dalam konservasi dan pengelolaan sumber daya genetik tanaman (Karp *et al.* 1997).

Teknik molekuler bervariasi dalam cara pelaksanaan untuk mendapatkan data, baik tekniknya maupun tingkatan target data yang diinginkan sesuai kemudahan pelaksanaan, ketersediaan sumber daya manusia, fasilitas, dan dana (Karp *et al.* 1997). Kemampuan mengisolasi DNA tanaman sangat diperlukan karena sangat bermanfaat dalam kajian ilmu biologi molekuler dan ilmu lainnya.

Hal ini berkaitan dengan pemanfaatan hasil analisis dari DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) tanaman yang dapat digunakan untuk berbagai macam hal, seperti mengetahui hubungan kekerabatan, evolusi dan lain sebagainya.

Beberapa teknik dan prosedur telah dipublikasikan, tetapi seringkali tidak dapat diaplikasikan karena genus atau bahkan spesies tanaman bersifat sangat spesifik. Modifikasi metode standar ekstraksi DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) diperlukan pada ekstraksi DNA dari daun tanaman yang mengandung banyak polisakarida atau metabolit sekunder. Ekstraksi DNA daun tanaman *Grevillea* (Proteaceae) dengan memodifikasi metode Doyle dan Doyle (1990), telah berhasil memperoleh DNA dengan kualitas yang baik (Pharmawati, 2009). Metode isolasi DNA tanaman bitti (*Vitex cofassus*) dengan menggunakan metode Lengkong *et al.* (1998) dalam Masniawati (2000) berdasarkan penelitian Pratama (2009) memperlihatkan hasil ekstraksi DNA yang kurang optimal baik kualitas maupun kuantitas DNA yang dihasilkan sehingga mempengaruhi intensitas pita DNA hasil amplifikasi yang tidak jelas. Hal tersebut menunjukkan bahwa metode isolasi DNA yang telah dilakukan pada tanaman padi tidak dapat diaplikasikan secara maksimal pada tanaman lain khususnya jenis tanaman kehutanan.

Meskipun isolasi DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) dapat dilakukan dengan berbagai protokol, akan tetapi pada setiap jenis atau bagian tanaman dapat memberikan hasil yang berbeda, hal ini dikarenakan adanya senyawa polifenol dan polisakarida dalam konsentrasi tinggi yang dapat menghambat pemurnian DNA. Jika isolasi DNA dilakukan dengan sample buah, maka kadar air pada

masing-masing buah berbeda, dapat memberi hasil yang berbeda-beda pula. Semakin tinggi kadar air, maka sel yang terlarut di dalam ekstrak akan semakin sedikit, sehingga DNA yang terpresipitasi juga akan sedikit (Fatchiyah, 20011).

DNA berkualitas tinggi yang akan didapat dalam suatu ekstraksi merupakan satu kaidah dasar yang harus dipenuhi dalam studi molekuler, terutama dalam penandaan sidik jari DNA. *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol (JOSE dan USHA, 2000 *dalam* Ardiana, 2009). Ada tiga langkah utama dalam ekstraksi DNA, yaitu perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Surzycki, 2000 *dalam* Ardiana, 2009).

Larutan CTAB (*Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*) dapat melarutkan membran plasma dan akan membentuk kompleks dengan DNA. Salah satu keunggulan metode ini adalah tidak dibutuhkannya persiapan yang panjang untuk jaringan tanaman dan dapat digunakan untuk berbagai jenis jaringan termasuk daun, akar, biji, embrio, endosperma dan pollen serta kultur suspensi (Chawla, 2003).

Markisa merupakan tanaman buah-buahan yang tumbuh dan hampir ada di seluruh Indonesia. Negara Indonesia merupakan salah satu negara penghasil buah markisa di Asia. Markisa termasuk dalam famili *Passifloraceae* yang berasal dari Amerika Selatan. Jenis markisa yang dibudidayakan di Indonesia meliputi markisa asam dengan kulit berwarna ungu yang disebut siuh atau *purple passion fruit* (*P. edulis* f. *edulis* Sims), markisa asam dengan kulit buah

berwarna kuning disebut juga rola atau *yellow passion fruit* (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), markisa konyal atau markisa manis (*P. ligularis* Juss), dan erbis atau *giant granadilla* (*P. quadrangularis* L.). Markisa asam berkulit buah ungu hanya dapat tumbuh dan berkembang baik di daerah subtropis dan dataran tinggi tropis, sedangkan jenis kuning dapat beradaptasi di dataran rendah tropis (Winks *et al.*, 1998 dalam Rukmana, 2003). Sentra produksi buah markisa di Indonesia adalah Sumatera Utara (Karo dan Simalungun), dan Sulawesi Selatan (Gowa, Tanah Toraja, Sinjai, Enrekang, dan Polewali-Mamasa) (Barus dan Syukri, 2008). Bahkan saat ini markisa telah dikembangkan lagi di daerah dataran rendah, Kabupaten Jeneponto, Sulawesi Selatan. Larutan *buffer* CTAB merupakan larutan *buffer* yang mudah dibuat dan digunakan untuk mengisolasi DNA tanaman yang mempunyai polifenol dan polisakarida yang cukup banyak seperti pada tanaman markisa. Oleh karena itu, di dalam tulisan ini akan dibahas mengenai optimalisasi teknik isolasi dan purifikasi DNA menggunakan larutan *buffer* CTAB pada tanaman markisa dataran rendah di Kabupaten Jeneponto yang merupakan langkah awal yang akan digunakan sebagai referensi untuk penelitian-penelitian selanjutnya mengenai markisa dataran rendah di Kabupaten Jeneponto.

Berdasarkan penjelasan di atas, maka dilakukan penelitian mengenai optimalisasi teknik isolasi dan purifikasi DNA menggunakan *buffer* CTAB (*Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*) pada tanaman markisa dataran rendah Kabupaten Jeneponto. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan protokol metode CTAB yang tepat untuk menghasilkan kuantitas dan kualitas DNA yang baik pada tanaman markisa dataran rendah.

1.2 Hipotesis

Terdapat satu protokol isolasi menggunakan *buffer* CTAB (*Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*) yang menunjukkan kuantitas dan kualitas DNA yang baik pada sampel tanaman markisa dataran rendah Kabupaten Jeneponto.

1.3 Tujuan dan Kegunaan

Penelitian dilakukan untuk mendapatkan protokol metode CTAB (*Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*) dan metode purifikasi DNA yang tepat untuk menghasilkan kuantitas dan kualitas DNA yang baik yang berasal dari tanaman markisa dataran rendah.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi dan pengembang mengenai teknik isolasi dan uji kualitas serta kuantitas DNA tanaman markisa dataran rendah Kabupaten Jeneponto.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Markisa (*Passiflora* spp.)

Markisa (*passion fruit*) tergolong dalam filum *Spermatophyta*, kelas *Angiospermae*, sub kelas *Monocotyledone* dan famili *Passifloraceae*. Ada sekitar 400 jenis markisa yang telah diketahui, dan 50-60 jenis diantaranya dapat dimakan. Beberapa jenis markisa yang terkenal adalah *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora ligularis*, *Passiflora laurifolia*, dan *Passiflora molissima* (Nakasone dan Paull, 1999).

Ada dua bentuk markisa yaitu markisa ungu (*Passiflora edulis*) dan markisa kuning (*Passiflora flavicarva*). Buah markisa ungu berasal dari Brasil sedangkan buah markisa kuning diduga berasal dari Australia yang dimutasi dari Amerika tropis. Hal ini tidak diketahui saat markisa dan erbis diperkenalkan ke Philippina. Kedua jenis ini tumbuh dewasa di dataran rendah dan dataran tinggi tapi penyebarannya terbatas (Coronel, 1983).

Tanaman markisa merupakan salah satu jenis tanaman buah yang dalam pengembangannya dapat difungsikan sebagai sumber pertumbuhan baru dalam perekonomian nasional. Indonesia mempunyai potensi besar untuk mengembangkan agribisnis dan agroindustri markisa. Peluang besar dunia terhadap permintaan markisa segar dan olahan sangat terbuka luas, sehingga usaha tani tanaman markisa layak dikembangkan dan dijadikan sumber pendapatan petani dan devisa Negara. Sentra produksi buah markisa di Indonesia adalah Sumatera Utara (Karo dan Simalungun), dan Sulawesi Selatan (Gowa,

Tanah Toraja, Sinjai, Enrekang, dan Polewali-Mamasa). Di Sumatera Utara khususnya Tanah Karo luas pertanaman tanaman markisa ini semakin berkurang akibat petani lebih tertarik menanam tanaman jeruk (Barus dan Syukri, 2008).

Markisa kuning (*Passiflora edulis var flavicarpa*) memiliki ciri-ciri berbentuk bulat sampai bulat agak lonjong atau oval, buah muda berwarna hijau, buah tua (masak) berwarna kuning muda berbintik-bintik putih, kulit buah agak tebal dan keras, berdiameter 5-7 cm, dan rasa buah asam manis dengan sari buah berwarna kuning. Dari 100 g bagian buah yang dapat dimakan mengandung 69-80 g air, 2,3 g protein, 2,0 g lemak (hampir semuanya berada dalam biji), 16 g karbohidrat, 3,5 g serat, 10 mg Ca, 1,0 mg Fe, 20 SI vitamin A, sedikit sekali tiamin, 0,1 mg riboflavin, 1,5 mg nisin, dan 20-80 g vitamin C serta nilai energi sebanyak 385 kJ/100g). Kandungan fitokimianya antara lain passiflorine, harmin, Harman, harmol, harmalin, viteksin, isoviteksin, krisin, karoten, nisin, riboflavin, karotenoid 0,058%, flavonoid 1,000%, alkaloid 0,700%. Di Madeira, jus markisa diberikan sebagai stimulant pencernaan dan pengobatan untuk kanker lambung. Selain itu jus markisa juga dapat digunakan sebagai obat penenang (Sari *et al.*, 2013).

Markisa merupakan tanaman penting baik secara ekonomi maupun sosial, dan telah banyak dilakukan penelitian untuk mengembangkan varietas yang adaptif terhadap sistem tanam dan kondisi iklim yang berbeda. Oleh karena itu, kegiatan yang berkaitan dengan pengumpulan, konservasi, karakterisasi, dan penggunaan plasma nutfah *Passiflora* perlu dilakukan untuk memastikan bahwa tersedia variabilitas genetik yang dapat dieksploitasi untuk program pemuliaan. Pemanfaatan variabilitas genetik secara efisien dapat digunakan jika penilaian dan

pengukuran dilakukan dengan benar. Jadi, karakterisasi terhadap plasma nutfah harus disesuaikan berdasarkan ciri-ciri morfologi (Viana *et al.*, 2010; Crochemore *et al.*, 2003; Plotze *et al.*, 2005), karakter agronomi (Abreu *et al.*, 2009; Cerqueira- Silva *et al.*, 2008), dan keragaman molekuler (Bellon *et al.*, 2009;. Cerqueira- Silva *et al.*, 2009, 2010; Viana *et al.*, 2010) untuk memungkinkan kemajuan dalam deskripsi dari per-bedaan genetik antara aksesori (Nasution *et al.*, 2011)

2.2 Isolasi DNA Menggunakan CTAB

Isolasi DNA tanaman pada umumnya berhasil bila dilakukan pada tanaman yang masih segar, meskipun isolasi DNA dari tanaman dapat dilakukan pada semua bagian tanaman, embrio bahkan herbarium. Tanaman yang segar bila tidak langsung digunakan harus disimpan pada kondisi yang dingin (-20°C atau -80°C) dan lembab untuk menjaga kondisi sel tanaman agar DNA yang ada di dalamnya tidak rusak (Chawla, 2003).

Analisa DNA diawali dengan proses ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA secara umum memiliki tahapan-tahapan yang meliputi isolasi dari jaringan, pelisisan dinding dan membran sel, ekstraksi dalam larutan, purifikasi serta presipitasi atau pepadatan. Ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode, seperti: metode fenol-kloroform, metode membran dialisis, metode chilex, dan metode boom. Salah satu metode ekstraksi yang sering digunakan adalah metode fenolkloroform yang diperkenalkan oleh Sambrook dan Russell (Toha, 2001). Prinsip metode fenol-kloroform yaitu memisahkan protein dan DNA dari sebuah sel oleh fenol-kloroform, presipitasi DNA dengan

menggunakan alkohol, dan proses sentrifugasi. Pada kecepatan tertentu proses sentrifugasi akan memberikan sejumlah gaya sentrifugal, sehingga molekul ringan akan berada di atas sedangkan molekul berat akan berada di bagian bawah atau bagian dasar (Sambrook dan Russell, 2001). Hasil sentrifugasi akan menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah, yaitu supernatan pada bagian atas dan pelet pada bagian bawah (Campbell *et al.*, 2002). Pada tulisan Murray dan Thompson (1980), total DNA genomik juga diisolasi dari daun muda tanaman transgenik dan tanaman kontrol mengikuti metode *Cetyltrimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) (Sjahril, 2006).

Meskipun isolasi DNA dapat dilakukan dengan berbagai protokol, akan tetapi pada setiap jenis atau bagian tanaman dapat memberikan hasil yang berbeda, hal ini dikarenakan adanya senyawa polifenol dan polisakarida dalam konsentrasi tinggi yang dapat menghambat pemurnian DNA. Jika isolasi DNA dilakukan dengan sample buah, maka kadar air pada masing-masing buah berbeda, dapat memberi hasil yang berbeda-beda pula. Semakin tinggi kadar air, maka sel yang terlarut di dalam ekstrak akan semakin sedikit, sehingga DNA yang terpresipitasi juga akan sedikit (Fatchiyah, 2011).

Salah satu teknik yang digunakan untuk isolasi DNA tanaman ini adalah dengan menggunakan CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*). CTAB merupakan detergen yang berguna untuk melarutkan membran plasma sel dan akan membentuk kompleks dengan DNA. CTAB adalah detergen yang berkation yang akan membentuk kompleks presipitasi dengan DNA ketika konsentrasi NaCl di bawah 0,7 M. Presipitasi DNA dari *buffer* CTAB dengan adanya etanol atau isopropanol sering menghasilkan massa bergelatin yang komposisinya tidak

diketahui. DNA pada umumnya terlihat jelas dalam massa tersebut, tetapi sulit untuk memisahkannya, sehingga untuk menghindari terbentuknya massa ini digunakan presipitasi yang tidak menggunakan alkohol (Chawla, 2003).

Salah satu keunggulan metode CTAB adalah tidak dibutuhkannya persiapan yang panjang untuk jaringan tanaman dan dapat digunakan untuk berbagai jenis jaringan termasuk daun, akar, biji, embrio, endosperma dan pollen serta kultur suspensi. Metode ini juga dapat diaplikasikan dari ukuran sampel mulai milligram herbarium, jaringan yang telah menjadi fosil hingga beberapa gram jaringan yang baru (Chawla, 2003).

2.3 Purifikasi (Pemurnian) DNA

Purifikasi DNA dapat dilakukan dengan menggunakan ekstraksi phenol. Purifikasi ini juga bisa dilakukan dengan menambahkan larutan phenol : chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) dengan volume sama dengan volume sampel DNA. Pada lapisan phenol yang merupakan pelarut organik, akan terlarut lipid, polisakarida dan protein. Sampel DNA akan tertinggal pada lapisan aqueous. Chloroform juga merupakan larutan pelarut juga menstabilkan ikatan tidak stabil antara lapisan organik dan aquaeus. Isoamilalkohol juga sebagai larutan penstabil dan mencegah adanya busa (Karp *et al.* 1997).

Menurut Agitya (2008), hal yang harus diperhatikan adalah prinsip-prinsip pokok dalam purifikasi DNA, yaitu:

1. Penghancuran bagian tubuh/organ menjadi bagian yang kecil. Bahan seperti jaringan otot, organ binatang, bulu rambut dan sebagainya perlu dihancurkan secara fisik dengan menggunakan mortar atau bahan pengeras seperti gas

liquid nitrogen. Darah tidak memerlukan penghancuran secara fisik tetapi harus dipisahkan antara bagian yang ada DNA nya dengan yang tidak ada DNAny dengan cara sentrifugasi kecepatan rendah. Pada mamalia DNA berada pada sel darah putih sedangkan pada reptile dan aves DNA ada di sel darah merah dan darah putih.

2. Penghancuran dinding sel dan lapisan pembungkus DNA. Dinding sel dan bagian pembungkus DNA dapat dilisis secara kimiawi maupun enzimatik atau kombinasi keduanya. Cara yang dipilih tergantung sumber DNA nya. Zat kimia yang digunakan adalah detergen karena dapat menyebabkan protein membran terdenaturasi sehingga struktur membran akan rusak. Bahan kimia yang lain misalnya sucrose, triton-X, NaCl, CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) dan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*). Untuk sel bakteri, selain menggunakan detergen, juga dapat digunakan enzim lisozim untuk memecah dinding sel khususnya untuk mengisolasi DNA genom dari bakteri gram positif.
3. Sentifugasi untuk memisahkan DNA dengan debris sel. Setelah dinding sel dan lapisan pembungkus DNA hancur, perlu dipisahkan antara debris sel dengan DNA. Pemisahan dilakukan dengan sentrifugasi kecepatan rendah (6500 rpm) untuk DNA mitokondria atau sentrifugasi kecepatan tinggi (13000 rpm) untuk DNA total.
4. Ekstraksi untuk memisahkan DNA dari materi organik lain. Pemurnian DNA biasanya dengan menggunakan fenol-kloroform-isoamil alkohol atau ammonium asetat yang akan mengendapkan protein.

5. Koagulasi dan pengendapan (Presipitasi DNA). Presipitasi DNA bisa dengan menggunakan etanol absolut atau isopropanol. Keduanya bersifat polar sehingga dapat menarik molekul air dari DNA, sehingga DNA mengendap.
6. Pencucian, pengeringan dan pelarutan kembali. Setelah DNA murni dapat diendapkan, harus dicuci dengan etanol 70% kemudian diendapkan dengan cara sentrifugasi. Setelah pencucian endapan DNA dikeringkan untuk membebaskannya dari sisa-sisa etanol.

2.4 Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Analisis kuantitatif merupakan salah satu teknik analisis yang bertujuan untuk menentukan jumlah atau seberapa banyak suatu zat atau komponen zat (Harjadi, 1986). Analisis kuantifikasi DNA dapat dilakukan dengan bantuan alat, yaitu spektrofotometer. Spektrofotometer adalah alat yang dilengkapi dengan sumber cahaya (gelombang elektromagnetik), baik cahaya UV (*ultra-violet*) atau pun cahaya nampak (*visible*). Komponen utama dari alat ini adalah sumber cahaya, pengatur intensitas, monokromator, kuvet, detektor, penguat arus dan indikator atau layar . Sinar UV digunakan untuk mengukur bahan larutan yang terbaca dengan panjang gelombang di bawah 400 nm. Sinar *visible light* bisa digunakan untuk mengukur bahan dengan panjang gelombang 400-700 nm. Sumber cahaya dari alat tersebut memancarkan seberkas cahaya melalui dua buah lensa dan celah masuk ke suatu sisi difraksi yang akan menyebarkan cahaya menjadi berkas horizontal dengan semua warna spektrum. Cahaya yang mengenai suatu benda dalam larutan contoh akan dihamburkan, sedangkan cahaya yang lolos atau diteruskan akan melewati sampel akan mengaktifasi foto tabung dan

akan menampilkan persen transmittan. Biasanya absorban merupakan daya cahaya masuk dan daya cahaya yang diteruskan melewati larutan contoh (Day dan Underwood, 2002).

Jumlah DNA dicerminkan berat molekul bukan oleh volume. Untuk mengetahui jumlah DNA, maka DNA hasil isolasi harus dianalisis dengan spektrofotometer UV dengan panjang gelombang 256 nm (260 nm). Kualitas DNA yang berhubungan dengan kemurnian terhadap kontaminan protein dapat dilihat dari perbandingan absorbansi suspensi DNA pada panjang gelombang 260 nm terhadap 280 nm. Rasio OD260/OD280 antara 1,8-2,0 mencerminkan DNA yang relatif murni dan terbebas dari kontaminan protein. Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dapat dikonversikan menjadi konsentrasi, yaitu nilai 1 pada OD260 = 50 ug DNA utas ganda tiap ml (Suharsono dan Widyastuti, 2006).

2.5 Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan dan memurnikan fragmen-fragmen DNA ataupun RNA. Prinsip elektroforesis adalah memisahkan molekul berdasarkan muatannya. DNA yang bermuatan negatif karena adanya phosphate akan bergerak ke arah kutub positif selama elektroforesis. Fragmen DNA mempunyai muatan negatif yang sama untuk tiap-tiap ukuran panjang, sehingga pergerakan DNA ini akan memiliki kecepatan yang sama untuk mencapai kutub positif (Clark dan Christopher, 2008).

Pergerakan yang sama antar molekul DNA ini tidak akan dapat digunakan untuk memisahkan DNA berdasarkan ukurannya. Hal inilah yang menyebabkan digunakannya gel untuk memperlambat pergerakan DNA. Gel ini merupakan

polymer sehingga akan membentuk semacam jaring-jaring untuk memerangkap DNA. DNA dengan ukuran yang lebih besar akan lebih sulit melewati lubang atau pori dari gel, sehingga DNA dengan sendirinya akan terpisah berdasarkan besarnya ukuran karena kemampuan dari DNA yang berbeda-beda dalam melewati pori dalam gel (Clark dan Christopher, 2008).

Analisa molekuler secara modern adalah pemaparan bahan genetik menggunakan alat yang dikenal sebagai elektroforesis dan ini membutuhkan kemampuan listrik dan pendingin yang memadai. Selain itu faktor bahan kimia yang dibutuhkan dan alat-alat yang dipakai beragam. Prinsip dasar elektroforesis adalah setiap genom tumbuhan (enzim/protein dan DNA) mempunyai berat yang berbeda-beda sehingga kecepatan Bergeraknya pada media gel juga berbeda-beda dan hal ini hanya dapat dilihat melalui pewarnaan (*trouble shooting*). Alat elektroforesis untuk enzim/protein biasa dibuat sendiri dengan *fiberglass*. Sistem elektroforesis adalah penggunaan arus listrik dari arusnegatif ke arus positif melalui media gel untuk menggerakkan bahan genetik (*running*) (Sudarmono, 2006).

Fatchiyah (2006) mengemukakan beberapa faktor yang mempengaruhi Elektroforesis *migration rate* selama DNA bergerak menembus gel agarose, sebagai berikut:

1. Ukuran molekul DNA

Molekul yang lebih besar akan bergerak lebih lambat, misal DNA linier lebih cepat dibanding DNA sirkuler. Jarak migrasi molekul DNA pada gel adalah laju terbalik proporsional \log_{-10} dari jumlah pasangan basa.

2. Konsentrasi gel agarose

Fragmen DNA yang bervariasi ukuran molekulnya akan berberak sesuai dengan konsentrasi dari gel agarose yang digunakan. Rumusnya adalah: $\log\mu = \log\mu_0 - Kr_T$ dimana μ_0 adalah *free electrophoresis mobility*, Kr adalah *retardation coefficient*, dan T adalah gel konsentrasi serta μ adalah *electrophoretic mobility* DNA.

Pada elektroforesis tersebut terdapat bermacam-macam kontaminasi, diantaranya smear (semburan) yang diakibatkan karena adanya kontaminasi protein dan DNA terdegradasi, berapi-api yang disebabkan karena adanya kontaminasi polisakarida, dan pita tebal dibawah bagian bawah gel agarose yang disebabkan karena adanya kontaminasi RNA (Asris, 2010).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini berlangsung pada bulan September 2013 hingga Desember 2013. Pengambilan sampel dilakukan di Kecamatan Kelara Kelurahan Tolo Selatan Kabupaten Jeneponto. Sedangkan isolasi dan pengujian DNA dilakukan di laboratorium Sumber Daya Hayati Tanaman dan Biosains Terapan Program Studi Agroteknologi Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin Makassar.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini adalah *mortar* dan *pestle*, gunting, timbangan analitik, *vortex Vibrofix VF1 Electronic*, sentrifugator *Tomy MX-307*, pipet tetes mikro *socorex*, *waterbath Hoefler RCB20-Plus*, lemari pendingin, *nanospectrophotometer Implen P360*, elektroforesis dengan *power supply Bio-rad*, *autoclave*, *microwave*, dan *Gel document Uvitec Cambridg*.

Bahan yang akan digunakan adalah sampel-sampel daun tanaman sehat markisa dataran rendah Jeneponto, *Polivinil Pirolidon (PVP)*, es cacah, EDTA, 2% CTAB, dH₂O steril, *β-merkapttoethanol*, *chloroform:isoamylalkohol (CI) (24:1)*, *isopropanol*, *TE buffer*, 5x TBE (*Tris Borate EDTA*), *ethanol 70%*, *loading dye*, *gen ruler 1 kb*, *parafilm*, *tubes*, dan *tips*.

3.3 Metode Percobaan

Penelitian ini dilakukan menggunakan beberapa protokol isolasi DNA dengan menggunakan larutan CTAB, pengujian kualitas serta kuantitas DNA, pemurnian (purifikasi) DNA pada hasil isolasi terbaik, dan pengujian kualitas serta kuantitas pada hasil pemurnian.

3.4 Pelaksanaan

3.4.1 Pengambilan Sampel Tanaman

Sampel tanaman markisa sehat diambil dari Kabupaten Jeneponto. Pengambilan sampel dilakukan dengan melihat fisiologi tanaman markisa yang berbeda-beda khususnya pada warna buah markisa yang memiliki 9 variasi (Gambar Lampiran 1).

Bahan tanaman yang diambil adalah daun muda segar tanaman markisa. Setelah pengambilan sampel tanaman, sampel tanaman yang disimpan dalam kotak yang berisi cacahan es. Kemudian sampel-sampel tersebut dibawa ke laboratorium untuk diisolasi. Sampel tanaman yang belum digunakan disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C . Lama penyimpanan berkisar hingga 6 minggu.

3.4.2 Isolasi DNA Markisa

DNA genomik akan diisolasi dari jaringan daun tanaman markisa berdasarkan metode Doyle & Doyle (1990) dalam Jaya, 2005. Dalam metode Doyle & Doyle (1990), isolasi DNA tanaman menggunakan larutan CTAB dengan campuran *Carlson lysis buffer* sebanyak 4 mL, *Polivinil Piroolidon* (PVP) 0,08 gram, dan β -merkapttoethanol sebanyak 8 μL . Campuran tersebut

divortex, lalu dipanaskan selama 30 menit pada suhu 65°C. Di bawah ini merupakan tahap isolasi DNA yang dilakukan dengan menggunakan larutan *buffer* CTAB.

1. Masing-masing sampel tanaman ditimbang terlebih dahulu. Berat masing-masing sampel tanaman yang digunakan sesuai dengan protokol (Tabel 1).
2. Masing-masing sampel tadi digerus kemudian masing-masing ditambahkan larutan CTAB sebanyak 750 µL, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam *tube* yang steril lalu dibolak-balik secara perlahan agar menjadi homogen.
3. masing-masing *tube* yang diisi tadi diinkubasi dalam *waterbath*. Suhu dan lama inkubasi sesuai dengan protokol yang digunakan (Tabel 1) (setiap 10 menit semua *tube* dibolak-balik secara perlahan)
4. Semua *tube* tadi disentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan dan waktu sentrifugasi sesuai dengan protokol (Tabel 1).
5. Masing-masing *supernatant* dipindahkan ke dalam masing-masing *tube* baru yang steril lalu masing-masing *supernatant* ditambahkan *chloform-isoamylalkohol* (24:1) sebanyak volume *supernatant*. Kemudian dibolak-balik secara perlahan hingga 100 kali.
6. Sampel disentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan dengan kecepatan dan waktu sentrifugasi sesuai dengan protokol (Tabel 1).
7. Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan kembali ke *tube* baru. Kemudian ditambahkan dengan *isopropilalkohol* sebanyak volume *supernatant*.
8. Sampel disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan dan waktu sentrifugasi sesuai dengan protokol (Tabel 1).

9. Cairan hasil sentrifugasi sentrifugasi (*supernatant*) dibuang perlahan, sedangkan masing-masing *pellet* ditambahkan dengan Etanol 70% dingin sebanyak 200 μ L lalu dicampur dengan cara mengetuk-ngetuk *tube* berulang-ulang.
10. Sampel disentrifugasi pada suhu 4°C selama 5 menit dengan kecepatan sentrifugasi sesuai dengan protokol (Tabel 1).
11. Cairan hasil sentrifugasi (*supernatant*) dibuang perlahan, sedangkan masing-masing *pellet* ditambahkan dengan etanol 70% dingin sebanyak 200 μ L.
12. Sampel disentrifugasi pada suhu 4°C selama 2 menit dengan kecepatan sentrifugasi sesuai dengan protokol (Tabel 1).
13. *Pellet* dikeringkan selama 1-2 jam dengan cara membalikkan *tube*.
14. *Pellet* ditambahkan dengan larutan TE *buffer* sebanyak 50 μ L.
15. Hasil isolasi siap diuji. Namun apabila belum digunakan, *tube* tersebut di simpan dalam *freezer* -20°C.

Tabel 1. Tabel optimasi isolasi DNA menggunakan larutan *buffer* CTAB pada tanaman markisa dataran rendah Kabupaten Jeneponto

Pro-tokol	Berat Sampel (gram)		Suhu inkubasi (°C)		Lama inkubasi (menit)			Kecepatan sentrifugasi (x100 rpm)		Lama sentrifugasi (menit)	
	0,15	0,2	65	75	20	30	45	100	120	10	15
A	√	-	√	-	-	√	-	-	√	√	-
B	√	-	√	-	-	√	-	-	√	-	√
C	√	-	√	-	-	-	√	√	-	√	-
D	√	-	-	√	√	-	-	√	-	√	-
E	-	√	√	-	-	√	-	-	√	√	-
F	-	√	√	-	-	-	√	√	-	√	-

3.4.3 Uji Kualitas dan Kuantitas hasil ekstraksi DNA Markisa

Pengujian kuantitas DNA dilakukan dengan menggunakan nanospektrophotometer. Nilai rasio serapan λ 260/230 lebih besar 1 murni dan nilai 1,8 - 2,0 pada rasio serapan λ 260/280 dianggap murni.

Pengujian kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan alat elektroforesis dan *gel document*. Pertama, membuat gel agarosa 1% yang terbuat dari agarose sebanyak 0,60 gram dengan TBE 1x sebanyak 50 mL, kemudian dipanaskan hingga mendidih. Kemudian larutan didiamkan hingga menjadi hangat. Setelah itu, larutan gel di tuang kedalam cetakan gel elektroforesis lalu ditambahkan TBE sebanyak 3 μ L kemudian diaduk rata. Kemudian meletakkan pencetak sumur gel pada larutan gel. Tunggu hingga larutan gel mengeras. Cetakan sumur gel dilepas perlahan, kemudian gel dimasukkan ke dalam alat elektroforesis. Masing-masing sampel 5 μ L dicampur dengan 2 μ L *loading dye*. Kemudian campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur gel untuk dielektroforesis. Alat elektroforesis dihubungkan dengan listrik dengan voltase 100 V selama \pm 30 menit. setelah itu, gel yang telah dielektroforesis dimasukkan ke dalam *gel document* untuk melihat ada dan tidaknya pita DNA tanaman markisa.

3.4.4 Pemurnian DNA Markisa

Pemurnian dilakukan pada sampel hasil isolasi yang menunjukkan kualitas dan kuantitas DNA yang baik. Berikut merupakan tahapan pemurnian yang dilakukan.

1. Hasil isolasi DNA ditambahkan *chloform-isoamylalkohol* (24:1) sebanyak 50 μL , kemudian dibolak-balik secara perlahan hingga 100 kali agar menjadi homogen.
2. Sampel disentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan 12.000 rpm dengan dalam waktu 10 menit.
3. *Supernatant* hasil sentrifugasi dipindahkan kembali ke *tube* baru. Kemudian ditambahkan dengan *isopropilalkohol* sebanyak volume *supernatant*.
4. Sampel disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit.
5. Cairan hasil sentrifugasi dibuang perlahan, sedangkan masing-masing *pellet* ditambahkan dengan Etanol 70% dingin sebanyak 50 μL .
6. Sampel disentrifugasi (*supernatant*) pada suhu 4°C dengan kecepatan 12.000 selama 2 menit.
7. *Pellet* dikeringkan selama 1-2 jam dengan cara membalikkan *tube*
8. *Pellet* ditambahkan dengan larutan TE *buffer* sebanyak 25 μL .
9. Bahan siap digunakan untuk dielektroforesis.

3.4.5 Uji Kualitas dan Kuantitas hasil pemurnian DNA Markisa

Pengujian kualitas dan kuantitas hasil pemurnian DNA markisa dilakukan sama halnya dengan pengujian kualitas dan kuantitas hasil ekstraksi DNA markisa.

3.5 Parameter Pengamatan

Adapun komponen yang akan diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Profil DNA

Ada atau tidaknya pita DNA sampel yang muncul setelah dielektroforesis.

2. Kualitas dan kuantitas DNA

Diukur dengan menggunakan *nanospektrophotometer*.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Hasil Pengujian Kemurnian DNA Hasil Isolasi DNA Tanaman Markisa

Tabel 2. Hasil uji isolasi DNA menggunakan nanospektrofotometri

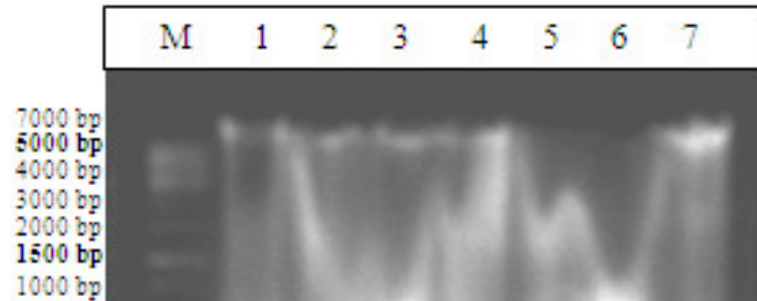
Protokol	Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rasio Serapan		Tingkat Kemurnian DNA	
			(A260/280)	(A260/230)	Murni	Tidak Murni
A	V1	213	1,333	1,397	-	√
	V2	986	2,267	1,759	-	√
	V3	1715	1,967	1,381	√	-
	V4	2903	1,233	1,031	-	√
	V5	3143	1,616	1,022	-	√
	V6	790	1,739	1,313	-	√
	V7	3087	1,668	1,264	-	√
	V8	3106	1,178	0,979	-	√
	V9	3473	0,939	0,937	-	√
B	V1	1923	1,423	0,312	-	√
	V2	2506	1,321	1,133	-	√
	V3	1392	0,981	1,225	-	√
	V4	1324	1,498	2,130	-	√
	V5	1763	2,198	1,428	-	√
	V6	1988	1,219	0,913	-	√
	V7	2897	1,823	0,235	√	-
	V8	938	2,321	3,213	-	√
	V9	2931	1,398	0,875	-	√
C	V1	26,9	1,421	0,872	-	√
	V2	23,9	1,714	1,132	-	√
	V3	21,9	1,630	0,914	-	√
	V4	31,9	1,524	0,815	-	√
	V5	27,9	1,697	1,013	-	√
	V6	186	1,842	1,272	√	-
	V7	126	1,383	0,886	-	√
	V8	42,8	1,536	0,987	-	√
	V9	40,8	1,547	1,316	-	√

Protokol	Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rasio Serapan		Tingkat Kemurnian DNA	
			(A260/280)	(A260/230)	Murni	Tidak Murni
D	V1	30,9	1,353	0,731	-	√
	V2	21,4	1,242	0,983	-	√
	V3	20,8	1,721	0,235	-	√
	V4	15,2	1,134	0,692	-	√
	V5	18,4	0,971	0,715	-	√
	V6	20,6	1,675	0,892	-	√
	V7	90,2	1,542	0,119	-	√
	V8	108	1,172	0,891	-	√
	V9	50,3	0,914	0,429	-	√
E	V1	1874	1,651	1,136	-	√
	V2	2761	1,568	1,293	-	√
	V3	1466	1,868	1,370	√	-
	V4	761	2,625	3,247	-	√
	V5	2447	1,859	1,663	√	-
	V6	1546	0,688	0,913	-	√
	V7	2572	1,902	1,517	√	-
	V8	493	2,00	4,857	√	-
	V9	2225	1,379	0,962	-	√
F	V1	31,2	1,521	0,178	-	√
	V2	15,9	1,209	0,213	-	√
	V3	22,4	1,607	0,218	-	√
	V4	16,9	1,619	0,169	-	√
	V5	50,3	1,870	0,212	√	-
	V6	24,4	1,256	0,246	-	√
	V7	138	1,194	0,397	-	√
	V8	174	1,358	0,365	-	√
	V9	101	1,556	0,256	-	√

Keterangan: nilai rasio serapan A260/A280 $< 1,8$ dan $> 2,0$ dianggap tidak murni. Sedangkan $1,8 \leq$ nilai rasion serapan A260/A280 $\leq 2,0$ dianggap murni.

Tabel 2 menunjukkan bahwa sampel pada protokol E lebih banyak menunjukkan tingkat kemurnian DNA yang tinggi pada rasio serapan A260/A280. Sehingga dapat dikatakan bahwa protokol E dapat mengisolasi DNA markisa dataran rendah dengan baik dibandingkan dengan protokol A, B, C, D, dan F.

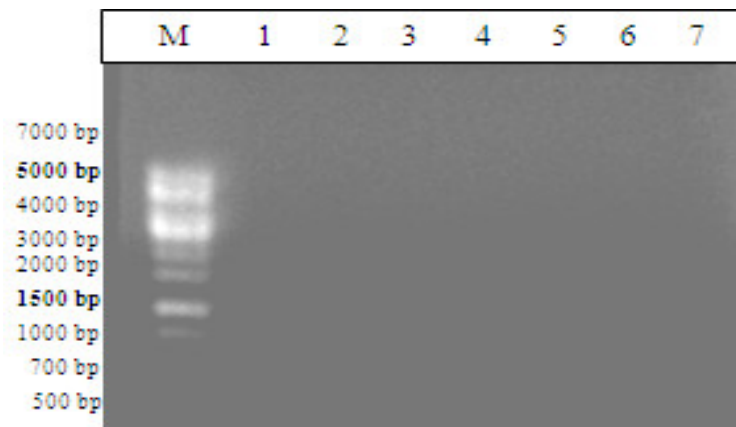
4.1.2 Hasil Uji Pita DNA Hasil Isolasi DNA Tanaman Markisa



Gambar 1. Hasil isolasi protokol A DNA tanaman markisa menggunakan 1% agarose.

Keterangan: M ; *marker*; nomor 1: sampel V1; 2: sampel V2; 3: sampel V3; 4: sampel V4; 5: sampel V5; 6: sampel V6; dan 7: sampel V7.

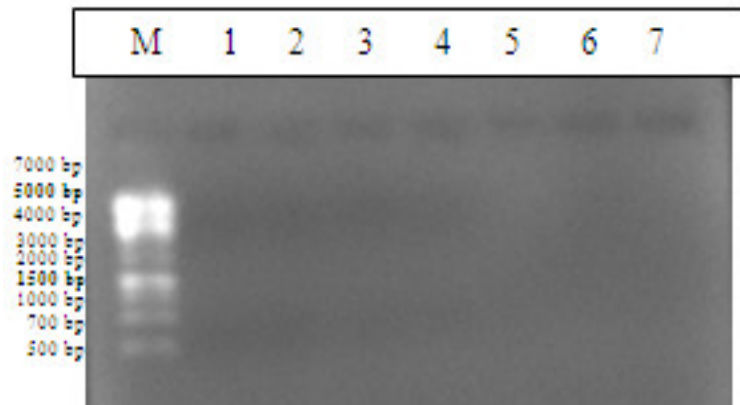
Gambar 1 menunjukkan munculnya pita DNA hasil ekstraksi menggunakan protokol A setelah dielektroforesis pada gel agarosa 1%. Namun pita DNA yang muncul masih sangat tipis.



Gambar 2. Hasil isolasi protokol B DNA tanaman markisa menggunakan 1% agarose.

Keterangan: M ; *marker*; nomor 1: sampel V1; 2: sampel V2; 3: sampel V3; 4: sampel V4; 5: sampel V5; 6: sampel V6; dan 7: sampel V7.

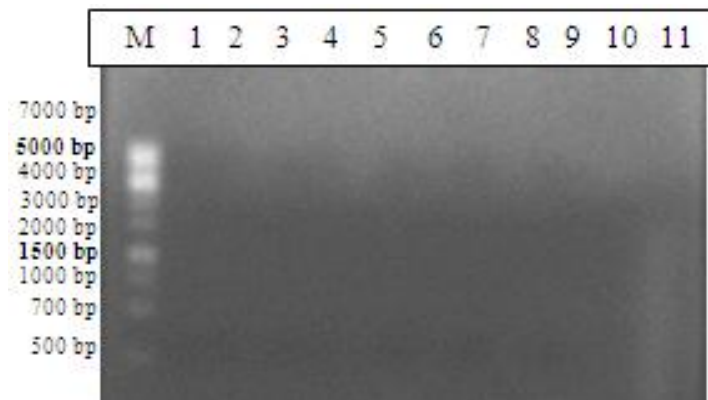
Gambar 2 menunjukkan tidak munculnya pita DNA hasil ekstraksi menggunakan protokol B setelah dielektroforesis pada gel agarosa 1%. Hal ini berarti protokol B merupakan protokol yang belum sesuai untuk mengisolasi DNA tanaman markisa dataran rendah.



Gambar 3. Hasil isolasi protokol C DNA tanaman markisa menggunakan 1% agarose.

Keterangan: M ; *marker*; nomor 1: sampel V1; 2: sampel V2; 3: sampel V3; 4: sampel V4; 5: sampel V5; 6: sampel V6; dan 7: sampel V7.

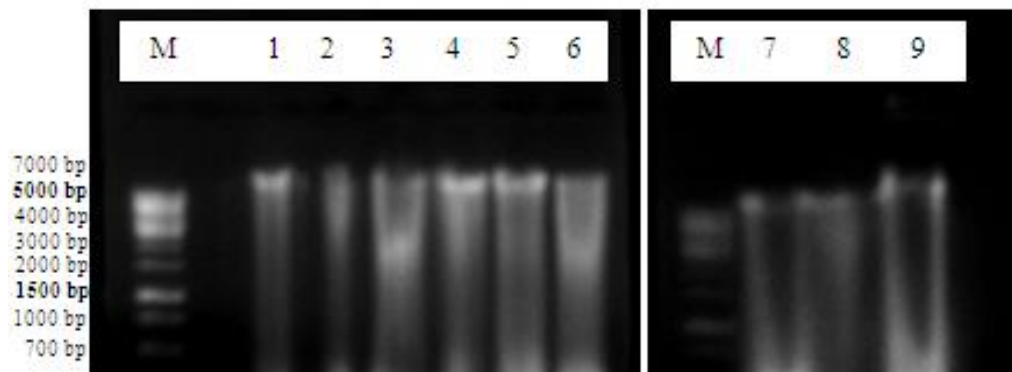
. Gambar 3 juga menunjukkan tidak munculnya pita DNA hasil ekstraksi menggunakan protokol C setelah dielektroforesis pada gel agarosa 1%. Hal ini berarti protokol C juga merupakan protokol yang belum sesuai untuk mengisolasi DNA tanaman markisa dataran rendah.



Gambar 4. Hasil isolasi protokol D DNA tanaman markisa menggunakan 1% agarose.

Keterangan: M ; *marker*; nomor 1: sampel V1; 2: sampel V2; 3: sampel V3; 4: sampel V4; 5: sampel V5; 6: sampel V6; dan 7: sampel V7; 8: sampel V8; 9: sampel V9; 10 dan 11: kosong.

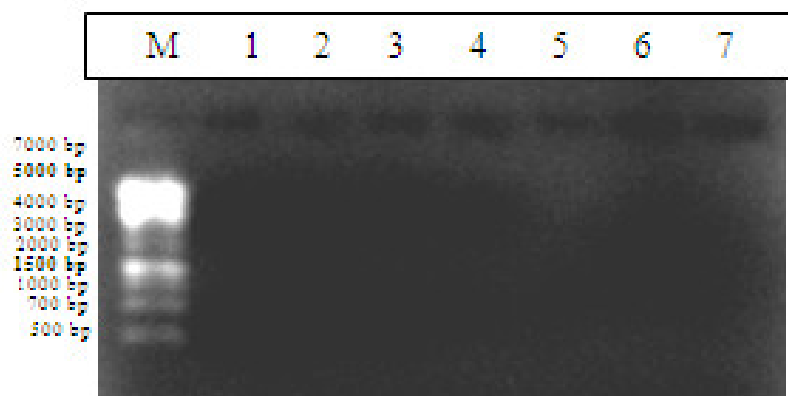
Gambar 4 juga menunjukkan tidak munculnya pita DNA hasil ekstraksi menggunakan protokol D setelah dielektroforesis pada gel agarosa 1%. Hal ini berarti protokol D juga merupakan protokol yang belum sesuai untuk mengisolasi DNA tanaman markisa dataran rendah.



Gambar 5. Hasil isolasi protokol E DNA tanaman markisa menggunakan 1% agarose.

Keterangan: M ; *marker*; nomor 1: sampel V1; 2: sampel V2; 3: sampel V3; 4: sampel V4; 5: sampel V5; 6: sampel V6; dan 7: sampel V7; 8: sampel V8; 9: sampel V9

Gambar 5 menunjukkan munculnya pita DNA hasil ekstraksi menggunakan protokol E setelah dielektroforesis pada gel agarosa 1%. Pita DNA yang muncul cukup jelas, namun masih bayangan (*smear*) yang terlihat.



Gambar 6. Hasil isolasi protokol F DNA tanaman markisa menggunakan 1% agarose.

Keterangan: M ; *marker*; nomor 1: sampel V1; 2: sampel V2; 3: sampel V3; 4: sampel V4; 5: sampel V5; 6: sampel V6; dan 7: sampel V7.

Gambar 6 menunjukkan tidak munculnya pita DNA hasil ekstraksi menggunakan protokol F setelah dielektroforesis pada gel agarosa 1%. Hal ini berarti protokol F merupakan protokol yang tidak sesuai untuk mengisolasi DNA tanaman markisa dataran rendah.

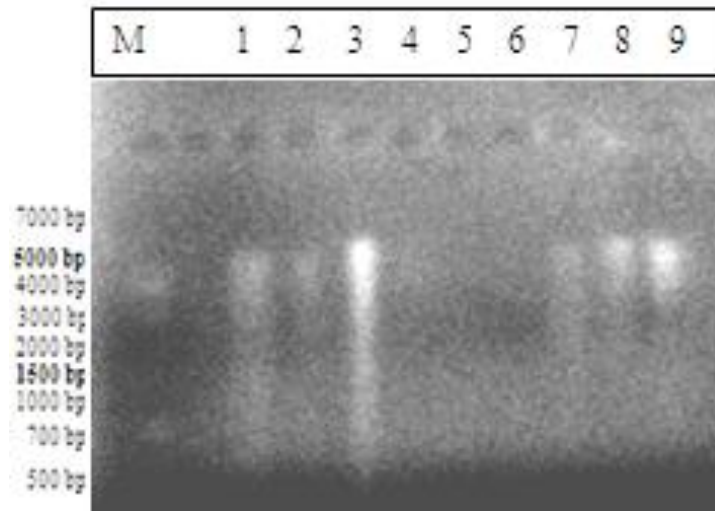
4.1.3 Hasil Uji Kemurnian pada Hasil Pemurnian Sampel

Tabel 3. Hasil uji kuantitas DNA hasil pemurnian sampel hasil ekstraksi menggunakan protokol E

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rasio Serapan		Tingkat Kemurnian DNA	
		(A260/280)	(A260/230)	Murni	Tidak Murni
V1	146	1,861	1,000	√	-
V2	108	1,955	0,912	√	-
V3	191	1,868	1,079	√	-
V4	19,4	1,773	0,312	-	√
V5	11,0	2,444	0,152	-	√
V6	14,9	2,143	0,216	-	√
V7	72,2	1,812	0,711	√	-
V8	60,3	1,952	0,852	√	-
V9	35,4	1,868	0,597	√	-

Keterangan: nilai rasio serapan $A_{260}/A_{280} < 1,8$ dan $> 2,0$ dianggap tidak murni. Sedangkan $1,8 \leq \text{nilai rasio serapan } A_{260}/A_{280} \leq 2,0$ dianggap murni.

4.1.4 Hasil Uji Pita DNA pada Hasil Pemurnian Sampel



Gambar 7. Hasil pemurnian DNA menggunakan chloform-isoamylalkohol, isopropilalkohol, dan ethanol pada sampel ekstraksi protokol E

Keterangan: M ; *marker*; nomor 1: sampel V1; 2: sampel V2; 3: sampel V3; 4: sampel V4; 5: sampel V5; 6: sampel V6; dan 7: sampel V7; 8: sampel V8; dan 9: sampel V9

Gambar 7 menunjukkan hasil pengujian yang cukup baik untuk pemurnian dengan chloform-isoamylalkohol, isopropilalkohol, dan ethanol. Namun masih terdapat bayangan (*smear*) pada pita DNA.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Hasil Uji Kuantitas DNA Hasil Ekstraksi Tanaman Markisa

Berdasarkan hasil uji kuantitas dan kualitas DNA hasil ekstraksi tanaman markisa dataran rendah, Pada protokol A hasil isolasi menunjukkan pita DNA yang tipis namun *smear* (Gambar 1) dan masih menunjukkan rendahnya tingkat kemurnian DNA yang dihasilkan (Tabel 2). Hal ini terjadi diperkirakan karena

berat sampel daun yang tidak cukup untuk menghasilkan DNA yang cukup sehingga pada saat dielektroforesis, pita DNA sangat tipis bahkan tsulit untuk diukur dan diikuti oleh bayangan (*smear*) yang diperkirakan adalah RNA.

Hasil isolasi DNA pada protokol B tidak menunjukkan DNA yang murni pada 8 sampel (Tabel 2) dan tidak memperlihatkan pita DNA setelah dielektroforesis (Gambar 2). Hal ini diperkirakan karena lama sentrifugasi 15 menit tidak efektif dalam memisahkan DNA dari protein dan RNA. Sentrifugasi yang lama dapat menghambat berkumpulnya DNA yang murni dari protein dan RNA.

Berdasarkan hasil uji kuantitas dan kualitas DNA hasil ekstraksi tanaman markisa dataran rendah pada tabel 2 dan gambar 3, protokol C merupakan protokol yang kurang dapat menghasilkan kuantitas dan kualitas DNA yang baik karena dari sembilan sampel yang diuji dengan protokol C hanya sampel ke-6 yang memiliki kemurnian yang baik, yaitu 1,842 pada rasio serapan A260/A280. Sedangkan untuk nilai rasio serapan A260/A230, tidak terdapat sampel yang menunjukkan angka diatas 1,600. Sedangkan konsentrasi yang dimiliki setiap sampel berkisar 21,9 - 186 $\mu\text{g/mL}$. Rasio serapan A260/A280 dari 8 sampel menunjukkan angka yang rendah ($<1,8$) (tabel 2) dan tidak munculnya pita DNA setelah dielektroforesis (Gambar 3) menunjukkan bahwa kualitas dan kuantitas DNA markisa menggunakan protokol C tergolong rendah. Nilai rasio serapan A260/A280 $< 1,8$ menunjukkan bahwa konsentrasi protein tinggi pada hasil isolasi DNA sehingga kemurnian hasil isolasi menjadi rendah dan tidak terlihat

pita setelah dilakukannya elektroforesis. Seperti dijelaskan dalam Sambrook *et al.* (1989) bahwa DNA dikatakan murni apabila mempunyai angka A260/A280 dalam kisaran 1,8 - 2,0.

Pada protokol C, suhu inkubasi yang tinggi dalam waktu yang cukup lama diperkirakan dapat merusak DNA tanaman markisa tersebut. Selain itu, kecepatan setrifugasi yang rendah mengakibatkan DNA yang diperoleh sangat sedikit dan memperoleh protein yang cukup banyak setelah dilakukannya ekstraksi, sehingga hasil uji kemurnian DNANYa tergolong rendah, dapat dikatakan 88,89% sampel pada protokol C menunjukkan angka rasio serapan di bawah angka 1,8 (Tabel 2). Hal ini sesuai dengan pendapat Santella (2006), rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 (A260/A280) berada di atas kisaran nilai DNA murni menunjukkan terdapat kontaminasi RNA, sedangkan rasio di bawah 1,8 menunjukkan masih terdapat kontaminasi protein.

Pada protokol D, hasil uji isolasi DNA menunjukkan nilai rasio serapan A260/A280 yang rendah (dibawah angka 1,8) dan rasio serapan A260/A230 di bawah angka 1,6 (Tabel 2) serta tidak munculnya pita DNA setelah dielektroforesis (Gambar 4). Berdasarkan hasil uji ini, sampel diperkirakan diinkubasi pada suhu yang cukup tinggi dan waktu yang inkubasi yang digunakan cukup cepat, sehingga larutan *buffer* CTAB tidak bekerja dengan baik pada sampel. Hal ini sesuai dengan pendapat Walker dan Rapley (2008), penggunaan *β-mercaptoethanol* pada *buffer* CTAB dengan pemanasan juga dapat mendenaturasi protein yang mengkontaminasi DNA. Oleh karena itu, suhu 75°C diperkirakan tidak dapat memaksimalkan kerja *buffer* CTAB untuk mendenaturasi protein. Kecepatan sentrifugasi yang rendah juga diperkirakan tidak dapat

memperoleh DNA yang terpisah dari protein dan RNA. Hal ini seperti yang dikatakan oleh Yuwono (2009) bahwa teknik sentrifugasi keseimbangan gradient densitas dapat digunakan untuk memisahkan molekul protein, DNA, dan RNA yang densitasnya dalam larutan CsCl berturut-turut adalah 1,3 ; 1,6-1,7 ; dan 1,75-1,8 g/ml. DNA mempunyai kerapatan yang sama dengan larutan sesium klorid (CsCl), yakni sekitar $1,7 \text{ g/cm}^3$. Jika larutan ini disentrifugasi dengan kecepatan yang sangat tinggi, maka garam CsCl yang pekat akan bermigrasi ke dasar tabung dengan membentuk gradien kerapatan.

Pada protokol E, berat sampel daun ditingkatkan menjadi 0,200 gram, dan hasil uji menunjukkan bahwa pita DNA mulai terlihat menebal berkisar 1500 – 5000 bp (Gambar 5) dan terdapat empat sampel menunjukkan angka rasio serapan A260/A280 berkisar antara 1,8 – 2,0 (Tabel 2) yang merupakan rasio yang dapat dikatakan bahwa DNA yang dikandung memiliki tingkat kemurnian yang cukup baik. Seperti dijelaskan dalam Sambrook *et al.* (1989) bahwa DNA dikatakan murni apabila mempunyai angka A260/A280 dalam kisaran 1,8 - 2,0. Hasil uji 7 sampel pada protokol E juga memiliki nilai rasio serapan $A_{260}/A_{230} \geq 1$ menunjukkan bahwa hasil isolasi murni dari polisakarida. Menurut Moller *et al.* (1992), rasio serapan $A_{260}/A_{280} \geq 1,80$ menunjukkan bahwa DNA murni dari protein sedangkan rasio $A_{260}/A_{230} \geq 1,00$ menunjukkan bahwa DNA murni dari polisakarida.

Pada protokol F, hasil isolasi DNA menunjukkan hal yang sama dengan sampel pada protokol C. Terdapat hanya satu dari sembilan sampel yang diuji pada protokol F yang menunjukkan nilai murni pada rasio serapan A260/A280 (Tabel 2). Namun tidak terdapat satupun sampel yang menunjukkan pita DNA

setelah dilakukannya elektroforesis walaupun berat sampel daun ditingkatkan menjadi 0,200 gram (Gambar 6). Hal ini menunjukkan bahwa protokol B, C, D dan F tidak tepat digunakan untuk mengisolasi DNA markisa dataran rendah Kabupaten Jeneponto.

Hasil isolasi DNA pada protokol E telah dicoba untuk dimurnikan dengan menggunakan chloform-isoamylalkohol, isopropilalkohol, dan ethanol 70% dingin kembali. Hasil pemurnian yang diperoleh kualitas DNA yang cukup baik (Tabel 3) walaupun pita DNA masih terlihat sedikit *smear* (Gambar 7). Hal ini diperkirakan karena kontaminasi polisakarida, protein, dan/atau RNA pada sampel masih ada. Penambahan bahan lainnya untuk memurnikan DNA hasil isolasi pada protokol E diperlukan untuk menghilangkan kontaminasi yang ada. Hal ini sesuai pendapat Birren *et al.* (1997), ekstrak DNA yang didapat seringkali juga terkontaminasi oleh RNA sehingga RNA dapat dipisahkan dari DNA ekstrak dengan cara pemberian RNase. Karp *et al.* (1997) juga mengemukakan bahwa purifikasi ini juga bisa dilakukan dengan menambahkan larutan phenol: chloroform: isoamyalkohol (25:24:1). Pada lapisan phenol yang merupakan pelarut organik, akan terlarut lipid, polisakarida dan protein.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

1.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil uji sampel pada beberapa protokol yang telah diperoleh dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan bahwa: protokol E merupakan protokol yang baik digunakan untuk mengisolasi DNA daun tanaman markisa dataran rendah Kabupaten Jeneponto. Isolasi DNA menggunakan protokol E dapat menghasilkan DNA yang memiliki kemurnian yang cukup baik dan tampak pita DNA yang cukup tebal berkisar 1500 – 5000 bp. Dan pemurnian kembali menggunakan *kloroform-isoamylalkohol*, *isopropanol*, dan *ethanol* 70% menunjukkan kualitas dan kuantitas DNA yang cukup baik.

5.2 Saran

Bagi peneliti yang ingin melakukan isolasi DNA tanaman markisa dataran rendah Kabupaten Jeneponto dapat menggunakan protokol E sebagai protokol isolasi DNA untuk mendapatkan kualitas dan kuantitas DNA yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiana, Dwi Wahyuni. 2009. *Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Pepaya dan Jeruk dengan Menggunakan Modifikasi Buffer CTAB*. Buletin Teknik Pertanian Vol. 14 No. 1.
- Agitya. 2008. *DNA Genom*. Bioinside. Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret
- Asris. 2010. *Isolasi DNA*. <http://asris07.student.ipb.ac.id/2010/06/19/isolasi-dna/>. Diakses tanggal 10 Januari 2014
- Barus, A., Syukri. 2008. *Agroteknologi Tanaman Buah-Buahan*. USU Press. Medan.
- Birren, B., E.D. Green., S. Klapholz., R.M. Myers., dan J. Roskams. 1997. *Genome Analysis. A Laboratory manual. Volume 1*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, dan L.G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Terjemahan dari *Biology*; oleh Lestari, R. dkk. Erlangga, Jakarta.
- Chawla, H. S. 2003. *Plant Biotechnology : A Practical Approach*. Science Publishers, Inc. Plymouth
- Clark, W., dan K. Christopher. 2008. *An Introduction to DNA : Spechtrphotometry, Degradation, and the "Frangekel" Eksperimen*. <http://www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/vol-22/5-clark.pdf>. Tanggal akses 9 April 2013.
- Coronel, R.E. 1983. *Promising Fruits of the Philippines*. Coll. Agric., Univ. Philippines, Los Baños, Coll. Agric., Laguna, the Philippines.
- Day R.A., dan L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*. Penerjemah: Hilarius Wibi H, terjemahan dari: *Quantitative Analysis Sixth Edition*. Jakarta: Erlangga.
- Fatchiyah, 2011. *Modul Pelatihan Analisis Fingerprinting DNA Tanaman Dengan Metode RAPD*. Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, Malang.
- Harjadi, W. 1986. *Ilmu Kimia Analitik Dasar*. Jakarta: Gramedia.

- Jaya, Abdul Mollah S. 2005. *Identifikasi dan Kloning Fragmen Gen Proteinase Inhibitor (PIN) pada Beberapa Tanaman Kakao (Theobroma cacao L.) Harapan Tahan Penggerek Buah Kakao (Conopomorpha cramerella Snellen) di Sulawesi Selatan*. Tesis Magister Sains. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Jehuda, Vandus. 2012. *Ekstraksi DNA Dari Sperma Pada Kondom Dan Kain Yang Tersimpan Sampai Dua Belas Hari*. Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Udayana, Denpasar, Bali.
- Karp, A., S. Kresovich, K.V. Bhat, W.G. Ayad, dan T. Hodgkin. 1997. *Molecular Tool in Plant Genetic Resources Conservation: A guide to the technologies*. IPGRI Technical Bulletin no. 2.
- Karsinah, Silalahi F.H., Manshur A. 2007. *Eksplorasi dan Karakteristik Plasma Nutfah Tanaman Markisa*. Badan Puslitbang Pertanian. Sumatera Utara.
- Lamadji S. 1998. *Pemberdayaan sifat morfologi untuk analisis kekerabatan plasma nutfah tebu*. Bull. P3GI.
- Masniawati, A. 2000. *Keragaman genetik kelapa dalam mapanget-32 (dmt-32) hasil penyerbukan sendiri berdasarkan penandamolekuler random amplified polymorphic DNA (RAPD)*. Tesis Pascasarjana. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Moller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H. dan H. Geiger. (1992). *A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues*. Nucleic Acids Res 20.
- Nakasone, H. Y., Paull, R. E. 1999. *Tropical fruits*. New York: CAB International, 1999. 445 p. (Crop production science in horticulture series).
- Nasution, Muhammad Arif., Nur, Giding Bakri & Razak, Zulkifli. 2011. *Keragaman Genetik Beberapa Aksesori Markisa Berdasarkan Penanda Inter simple Sequence Repeat (ISSR)*. Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas 45 Makassar
- Pharmawati, M. 2009. *Marka Molekuler Berbasis DNA untuk Penentuan Hubungan Kekerabatan Tumbuhan*. Penerbit Universitas Udayana. Denpasar.
- Rukmana, R. 2003. *Usaha Tani Markisa*. Kanisius. Yogyakarta.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. USA: Cold Spring Harbor Lab Press.

- Sambrook, J., Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United State Of America.
- Santella, R.M. 2006. *Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole Genome Amplification*. Cancer Epidemiology Biomarkers.
- Sari, Yuni Nurisva Maya., Syukur, Sumaryati dan Jamsari. 2013. *Isolasi, Karakteristik, dan Identifikasi DNA Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berfungsi Sebagai Aantimikroba dari Fermentasi Markisa Kuning (Passiflora edulis var. flavicarpa)*. Jurusan Kimi FMIPA Universitas Andalas.
- Sjahril, Rinaldi. 2006. *Production of Disease Resistant Phalaenopsis Through Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation*. Graduate School Science and Technology. Chiba University. Japan.
- Sudarmono. 2006. *Pendekatan Konservasi Tumbuhan dengan Teknik Molekuler Elektrofosis*. Pusat K Konservasi Tumbuhan Ex situ - Kebun Raya Bogor - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).
- Suharsono., Widyastuti, Utut. 2006. *Pelatihan Singkat Teknik Dasar Pengklonan Gen*. Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi – Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat IPB dengan DIKTI – DIKNAS, Bogor.
- Toha, Abdul Hamid A. 2001. *Biokimia Metabolisme Biomolekul*. Bandung: Alfa Beta.
- Walker, John M., dan Rapley, Ralph. 2008. *Molecular Biomethods*. Human Press XX.
- Yuwono, Triwibowo. 2006. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.

LAMPIRAN

Tabel lampiran 1. Komposisi *Carlson Lysis Buffer* (untuk 100 mL)

	Jumlah
Tris-HCl (pH 9,5)	1,21 g
ddH ₂ O	70 mL
20 mM EDTA (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)	0,76 g
1,4 M NaCl	8,18 g
2% CTAB	2 g
1% PEG (<i>Polyethylen Glicol</i>) 8000 atau 6000	1 g

Tabel lampiran 2. Komposisi TE (*Tris EDTA*)

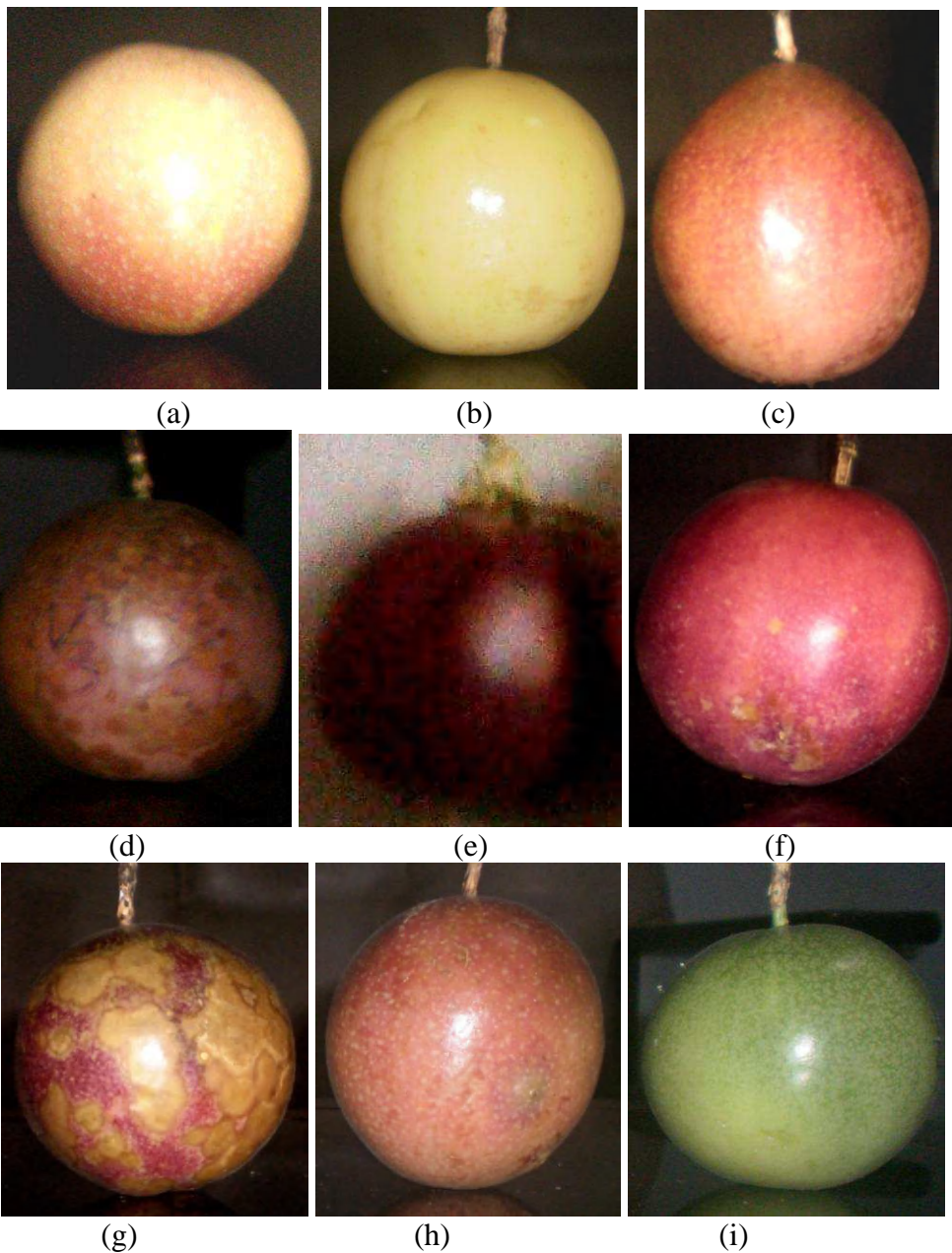
	Jumlah
ddH ₂ O	50 mL
10 mM Tris-HCl pH 8	1 mL
0,5 M EDTA pH 8	0,2 mL

Tabel lampiran 3. Komposisi TBE (Tris Borate EDTA) 5x

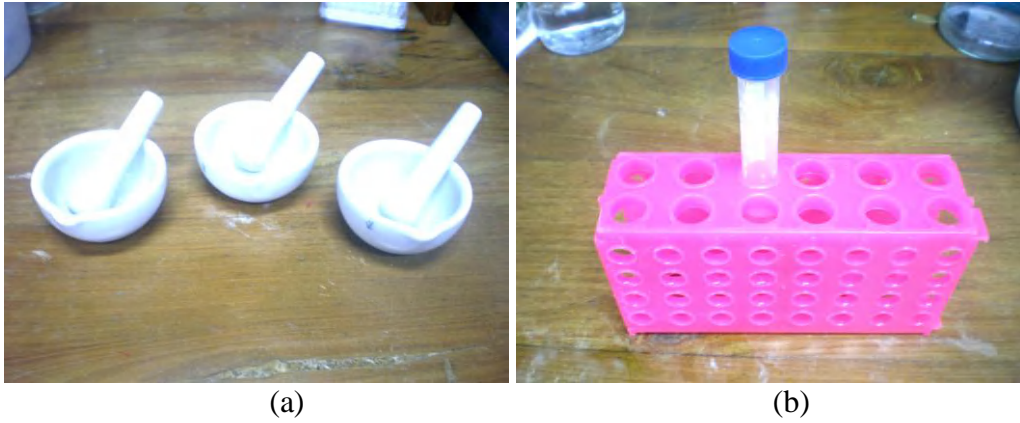
	Jumlah
Tris Base	54 g
Boric Acid	27,5 g
0,5 M EDTA pH 8	20 mL
ddH ₂ O	
Total	1000 mL

Tabel lampiran 4. Komposisi 1% Gel Agarose

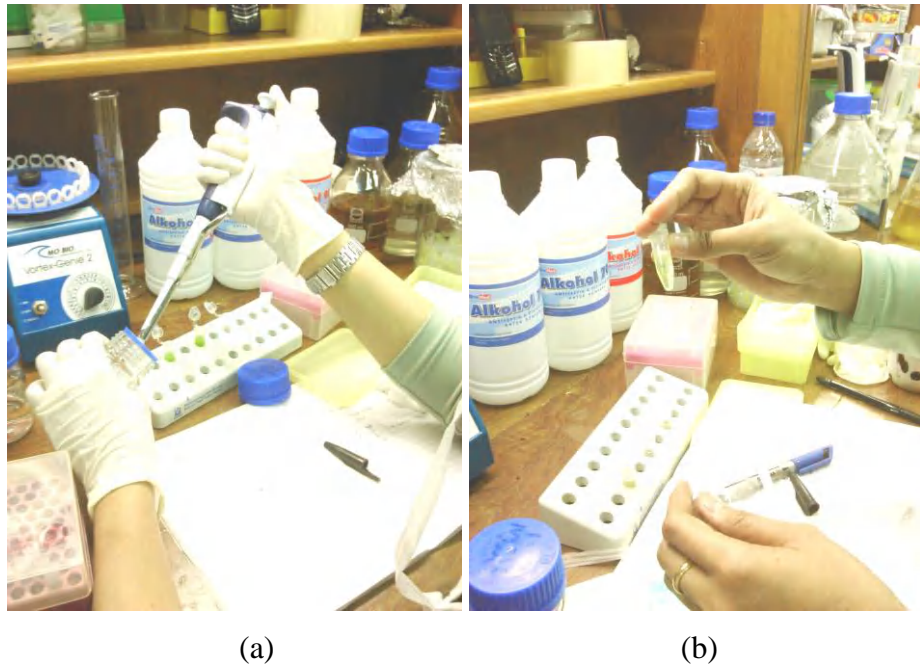
	Jumlah
Agarose	0,58 g
TBE 1x	50 mL
Ethidium Bromide	3 μ L



Gambar Lampiran 1. Sembilan variasi buah dari sampel tanaman markisa dataran rendah Kabupaten Jeneponto; (a) buah V1, (b) buah V2, (c) buah V3, (d) buah V4, (e) buah V5, (f) buah V6, (g) buah V7, (h) buah V8, dan (i) buah V9.



Gambar Lampiran 2. Persiapan ekstraksi DNA daun markisa; (a). alat untuk pengekstraksian DNA, dan (b) larutan *buffer* CTAB 2%.



Gambar Lampiran 3. Isolasi DNA markisa; (a) penambahan cloroform : isoamylalkohol, dan (b) pencampuran dengan cara dibolak-balik sebanyak 100 kali.



(a)



(b)

Gambar Lampiran 4. Hasil isolasi DNA markisa yang siap diuji kualitas dan kuantitasnya; (a) hasil isolasi DNA markisa, dan (b) *pellet* yang diperkirakan sebagai kumpulan DNA



Gambar Lampiran 5. Hasil isolasi DNA markisa dielektroforesis untuk melihat ada atau tidaknya pita DNA menggunakan alat elektroforesis *Bio-rad*.



Gambar Lampiran 6. Alat nanospektrofotometri *Implen P360* untuk menguji kemurnian DNA