



**ISOLASI GEN PENGKODE PROTEIN ANTIOKSIDAN  
PADA BIJI TANAMAN MELINJO (*Gnetum gnemon*)**

*isolation of genes encoding antioxidant proteins  
in melinjo seeds (*Gnetum gnemon*)*

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan  
Program Sarjana (S1) pada Program Studi Agroteknologi  
Fakultas Pertanian Universitas Jember

**Oleh:**

**Arya Bagus Boedi Iswanto  
NIM. 081510501157**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
OKTOBER, 2012**

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Arya Bagus Boedi Iswanto

NIM : 081510501157

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul : *Isolasi Gen Pengkode Protein Antioksidan Pada Biji Tanaman Melinjo(Gnetum gnemon)* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 Oktober 2012

Yang menyatakan,

Arya Bagus Boedi Iswanto  
NIM. 081510501157

**SKRIPSI**

**ISOLASI GEN PENGKODE PROTEIN ANTIOKSIDAN PADA BIJI  
TANAMAN MELINJO (*Gnetum gnemon*)**

**Oleh :**

**ARYA BAGUS BOEDI ISWANTO  
NIM. 081510501157**

**Pembimbing**

<b>Dosen Pembimbing Utama</b>	<b>: Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D NIP. 197008101998031001</b>
<b>Dosen Pembimbing Anggota</b>	<b>: Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS. NIP. 196504261994031001</b>

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul *Isolasi Gen Pengkode Protein Antioksidan Pada Biji Tanaman Melinjo (Gnetum gnemon)* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian Universitas Jember pada :

Hari : Senin  
Tanggal : 22 Oktober 2012  
Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji  
Penguji I,

**Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D**  
**NIP. 197008101998031001**

Penguji II,

Penguji III,

**Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS.**  
**NIP. 196504261994031001**

**Prof. Dr. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS.**  
**NIP. 195901021988031002**

Mengesahkan  
Dekan,

**Dr. Ir. Jani Januar, MT.**  
**NIP. 195212171980032001**

**Isolasi Gen Pengkode Protein Antioksidan Pada Biji Tanman Melinjo (*Gnetum gnemon*).** ARYA BAGUS BOEDI ISWANTO. 081510501157. 2012, Program Studi Agroteknologi Minat Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

## **RINGKASAN**

Isolasi dan karakterisasi protein antioksidan pada biji melinjo *Gnetum gnemon* menunjukkan adanya dua fraksi protein antioksidan dengan berat molekul untuk fraksi protein utamanya sebesar 30 kilo Dalton dan fraksi protein keduanya memiliki berat molekul sebesar 12 kilo Dalton. Protein antioksidan berperan sebagai penangkal radikal bebas, pencegah terjadinya stres oksidatif, menghambat spesies oksigen reaktif (ROS) yang dapat mempengaruhi sistem metabolisme serta dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi gen pengkode protein antioksidan pada biji melinjo.

Metode RLM-RACE (*RNA Ligase Mediated Rapid Amplification Of cDNA Ends*) digunakan untuk mengisolasi fragmen cDNA Gg-AOP ujung 5' dan ujung 3'. Primer di desain berdasarkan urutan asam amino dari fraksi protein terisolasi. Pada ujung 5' desain primer yang digunakan adalah primer spesifik (AP1)R 5'-TGN CCR TAY TGN ACY TTY TGY TTN AC-3', (AP2)R 5' ATN GCN CAN GTN GCY TTN CCR TTN CC-3', sedangkan pada ujung 3' adalah (SP1)R 5'- GGN AAY GGN AAR GCN ACN GTN GCN AT-3', (SP2)R 5'-GTN AAR CAR AAR GTN CAR TAY GGN CA-3'. Hasil PCR di kloning ke dalam plasmid *pGEM-T Easy vector* dan ditransformasi ke dalam bakteri *E.coli* strain DH5 $\alpha$  dan ditumbuhkan pada media LB padat. Koloni bakteri berwarna putih ditumbuhkan pada media LB cair selama semalam dan dilakukan isolasi plasmid. Plasmid DNA target yang diperoleh kemudian dipotong menggunakan enzim restriksi *EcoRI* dan disekuensi untuk mengetahui urutan nukleotida dari fragmen cDNA Gg-AOP yang diperoleh.

Hasil isolasi RACE ujung 3' menghasilkan fragmen cDNA Gg-AOP sebesar 300 bp. Isolasi RACE ujung 5' menghasilkan fragmen cDNA Gg-AOP berukuran 178 bp. Homologi cDNA Gg-AOP ujung 5' dengan sekuen nukleotida protein antioksidan terisolasi menunjukkan nilai homologi sebesar 34,2%. Homologi cDNA Gg-AOP ujung 3' dengan sekuen nukleotida protein antioksidan terisolasi menunjukkan nilai homologi sebesar 31,4%. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan *full length* fragmen cDNA Gg-AOP.

**Kata Kunci** : cDNA, RLM-RACE, Protein Antioksidan (AOP), Melinjo.

**Isolation of Genes Encoding Antioxidant Proteins in Melinjo Seeds (*Gnetum gnemon*).** ARYA BAGUS BOEDI ISWANTO. 081510501157. 2012, Program Study Agrotechnology, Faculty of Agriculture, University of Jember.

## SUMMARY

Isolation and characterization antioxidant protein in melinjo seeds (*Gnetum gnemon*) showed that there were two fractions of antioxidant protein. The first fraction was 30 kilo Dalton and the second fraction was 12 kilo Dalton. The role of antioxidant protein is a free radical blocker, oxidative stress preventer, pursuing Reactive Oxygen Species (ROS). ROS could influences the metabolism system and causes cell function and structure damage. This research aimed to isolate and identify gene encoding antioxidant protein in melinjo seeds.

The method of RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification Of cDNA Ends) was used to isolate cDNA Gg-AOP fragment terminal 5' and cDNA Gg-AOP fragment terminal 3'. Primer was designed based on the amino acid sequence from the isolated of 12 kilo Dalton protein fraction. (AP1)R 5'- TGN CCR TAY TGN ACY TTY TGY TTN AC-3' and (AP2)R 5' ATN GCN CAN GTN GCY TTN CCR TTN CC-3', was used to find out the cDNA Gg-AOP fragment terminal 5'. (SP1)R 5'- GGN AAY GGN AAR GCN ACN GTN GCN AT-3' and (SP2)R 5'- GTN AAR CAR AAR GTN CAR TAY GGN CA-3' was used to find out cDNA Gg-AOP fragment terminal 3'. The RACE terminal 3' and terminal 5' was each cloned to pGEM-T Easy vector and transform to E.coli strain DH5 $\alpha$  on LB plate. The selected of white colony was grown on LB liquid overnight then the plasmid was isolated. The plasmid of DNA target was cut with EcoRI retriCTION enzyme then was sequenced to find out the nucleotide sequence of cDNA Gg-AOP fragment.

The size of cDNA Gg-AOP fragment terminal 3' was 300 bp and the cDNA Gg-AOP fragment terminal 5' was 178 bp. Homology cDNA Gg-AOP terminal 5' with isolated nucleotide antioxidant protein sequence showed homology value of 34.2%. Homology cDNA Gg-AOP terminal 3' with isolated

nucleotide antioxidant protein sequence showed homology value of 31.4%. It is needed to conduct a further research to gain full length cDNA Gg-AOP.

**Key words :** cDNA, RLM-RACE, Antioxidant Protein (AOP), Melinjo.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul *Isolasi Gen Pengkode Protein Antioksidan Pada Biji Tanaman Melinjo(Gnetum gnemon)*. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D, selaku Dosen Pembimbing Utama, Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS selaku Dosen Pembimbing Anggota I, dan Prof. Dr. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS selaku Dosen Pembimbing II yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini.
2. Orang tua dan saudara-saudaraku yang dengan penuh pengertian, kasih sayang dan semangat selalu mendoakan agar terselesaikannya skripsi ini.
3. Seluruh anggota Laboratorium Analisis Tanaman yang telah memberikan kesempatan penulis menimba ilmu serta memberikan dukungan terhadap terselesaikannya skripsi ini.
4. Dr. Ir. Sigit Suparjono, MS yang selalu memberi masukan serta dorongan semangat.
5. Oktavia, Candra, Anang, Adrian, Nisya, Amin, Fendi dan Dodik sebagai rekan kerjaku yang telah membantu selama penelitian dan selalu memberi dorongan semangat.
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember,      Oktober 2012

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iv
RINGKASAN .....	v
KATA PENGANTAR .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Tanaman Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> ) .....	4
2.2 Antioksidan .....	5
2.3 RLM-RACE ( <i>RNA Ligase Mediated Rapid Amplification     Of cDNA Ends</i> ) .....	6
2.3.1 RLM-RACE Kit Ujung 5' .....	8
2.3.2 RLM-RACE Kit Ujung 3' .....	8
2.4 PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	9
2.5 <i>Complementary DNA (cDNA)</i> .....	11
2.6 Kloning cDNA .....	12
<b>BAB 3. BAHAN DAN METODE .....</b>	<b>15</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	15
3.2 Bahan dan Alat .....	15
3.3 Metode Penelitian .....	15
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>21</b>

4.1 Hasil dan Pembahasan .....	21
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>30</b>
5.1 Kesimpulan .....	30
5.2 Saran .....	30
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	
<b>LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	<i>Overview of the RLM-RACE Procedure</i> .....	8
2.2	Posisi <i>primer</i> untuk 5' dan 3' RACE .....	9
4.1	Hasil elektroforesis cDNA ujung 5' .....	22
4.2	Hasil elektroforesis cDNA ujung 3' .....	24
4.3	Peta Lingkaran Plasmid <i>pGEM-T Easy</i> .....	25
4.4	Hasil seleksi bakteri transforman pada media <i>LB plate</i>	26
4.5	Hasil elektroforesis isolasi plasmid dengan menggunakan Enzim restriksi <i>EcoRI</i> pada gel agarose 1% .....	27
4.6	Hasil sekuensi RACE ujung 5' .....	28
4.7	Hasil sekuensi RACE ujung 3' .....	28
4.8	Hasil homologi cDNA ujung 5' .....	29
4.9	Hasil homologi cDNA ujung 3' .....	29

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
<b>1. Foto Penelitian .....</b>	<b>34</b>

## SINGKATAN

AmpR	= Amphisilin Resistance
CIP	= Calf Intestine alkaline Phosphatase
Gg-AOP	= <i>Gnetum gnemon</i> Antioxidant Protein
EDTA	= Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	= Ethidium Bromide
LB	= Luria Bertani
TAP	= Tobacco Acid Pyrophosphatase
TE	= Tris EDTA