



**IDENTIFIKASI GEN PENGKODE PROTEIN ANTIOKSIDAN
PADA DAUN TANAMAN MELINJO (*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:

**Arif Chandra Irawan
NIM. 081510501185**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2013**

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Arif Chandra Irawan

NIM : 081510501185

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul : ***Identifikasi Gen Pengkode Protein Antioksidan Pada Daun 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, 2 Mei 2013

Yang menyatakan,

Arif Chandra Irawan
NIM. 081510501185

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI GEN PENGKODE PROTEIN ANTIOKSIDAN PADA
DAUN TANAMAN MELINJO (*Gnetum gnemon*)**

Oleh :

**ARIF CHANDRA IRAWAN
NIM. 081510501185**

Pembimbing

**Dosen Pembimbing Utama : Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D
NIP. 197008101998031001**

**Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP
NIP. 196504251990022002**

PENGESAHAN

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

Hari : Kamis

Tanggal : 2 Mei 2013

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. Parawita Dewanti, MP.
NIP. 196504251990022002

Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph.D.
NIP. 196504261994031001

Mengesahkan
Dekan,

Dr. Ir. Jani Januar, MT.
NIP. 195901021988031002

Identifikasi Gen Pengkode Protein Antioksidan Pada Daun Tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon*). ARIF CHANDRA IRAWAN. 081510501185. 2013, 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 mengidentifikasi gen pengkode protein antioksidan pada daun melinjo.

Metode PCR (*Polymerase chain Reaction*) digunakan untuk mengisolasi fragmen cDNA Gg-AOP pada daun melinjo. Primer di desain berdasarkan urutan asam amino dari fraksi protein biji melinjo terisolasi. Desain primer yang digunakan adalah primer spesifik pada posisi *start codon* Gg-AMP2F R : 5'-CTTAGTTTAGGTGCTCATCAGGATG-3' dan *Oligo dT anchor Primer*. Hasil PCR di kloning ke dalam plasmid *pGEM-T Easy vector* dan ditransformasi ke dalam bakteri *E.coli* strain DH5 α 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 PCR menghasilkan 2 fragmen cDNA Gg-AOP yaitu fragmen cDNA Gg-AOP I sebesar 300 bp dan fragmen cDNA Gg-AOP II sebesar 170 bp. Homologi cDNA Gg-AOP I dengan sekuen nukleotida gen pengkode protein antioksidan terisolasi pada biji melinjo menunjukkan nilai homologi sebesar 47,0%. Homologi fragmen cDNA Gg-AOP II dengan sekuen nukleotida fragmen cDNA Gg-AOP pada biji melinjo menunjukkan nilai homologi sebesar 40,4%. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan *full length* fragmen cDNA Gg-AOP.

Kata Kunci : cDNA, PCR, Protein Antioksidan (AOP), Melinjo.

Identification of Genes Encoding Antioxidant Protein in Melinjo Leaves (*Gnetum gnemon*). ARIF CHANDRA IRAWAN. 081510501185. 2013, Program Study Agrotechnology, Faculty of Agriculture, University of Jember.

SUMMARY

Isolation and characterization of an antioxidant protein in Melinjo seeds (*Gnetum gnemon*) indicate the presence of two protein fractions with molecular weight for the main protein fractions of 30 kilo Dalton and the second protein fraction has a molecular weight of 12 kilo Dalton. Antioxidant protein functions as free radical scavenger, preventer of the occurrence of oxidative stress, and inhibitor of reactive oxygen species (ROS) that can affect the metabolic system and can cause the damage of the cell structure and function. This research was intended to identify the antioxidant protein coding genes in the melinjo leaves.

PCR (Polymerase Chain Reaction) was used to isolate cDNA Gg-AOP fragments on melinjo leaves. Primer was designed based on the amino acid sequence of the protein fractions of the isolated melinjo seeds. Primary designs used were specific primers at position of start codon AMP2F Gg-R: 5'-CTTAGTTTAGGTGCTCATCAGGATG-3 'and Oligo dT anchor Prime. The PCR results were cloned into pGEM-T Easy vector plasmid and transformed into E.coli strain DH5 α bacterium and grown on solid LB medium. White bacterial colonies were grown on liquid LB medium all night long and conducted plasmid isolation. The obtained target DNA plasmid was then cut using EcoRI restriction enzymes and sequenced to determine the nucleotide sequence of the obtained cDNA Gg-AOP fragment.

The results of PCR isolation generated 2 cDNA Gg-AOP fragments, that is, cDNA Gg-AOP I fragment by 300 bp and cDNA Gg-AOP fragment II by 170 bp. The homology of cDNA Gg-AOP I with nucleotide sequences of the isolated antioxidant protein encoding genes on melinjo seeds showed homological value of 47.0%. Homological fragment of cDNA Gg-AOP II with nucleotide sequence of cDNA Gg-AOP fragments on melinjo seeds indicated homological value of 40.4%. It is necessary to conduct further research to gain the full length of cDNA Gg-AOP fragments.

Keywords: cDNA, PCR, Antioxidant Protein (AOP), Melinjo.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul *Identifikasi Gen Pengkode Protein Antioksidan Pada Daun 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. Parawita Dewanti, MP, selaku Dosen Pembimbing Anggota I, dan Ir. Didik Pudji Restanto, MS.,Ph.D selaku Dosen Pembimbing II yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini.
2. Orang tua dan saudara-saudaraku yang telah memberikan kasih sayang, semangat, dan doa hingga terselesaikannya skripsi ini.
3. Dr. Ir. Sigit Suparjono, MS yang selalu memberi masukan serta dorongan semangat.
4. Ir. Hari Purnomo, M.Si.,Ph.D.,DIC yang selalu memberi masukan serta dorongan semangat.
5. Falah Gemilang, Arya Bagus, Adrian Siregar, Nisya Wulaningrum, Ahmad, Amin, Anang dan Ludvi, 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. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi perkembangan ilmu pertanian.

Jember, Mei 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tanaman Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i>)	4
2.2 Pengaruh Stress Oksidasi	6
2.3 Zat Antioksidan.....	7
2.4 Isolasi Gen	7
2.5 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	8
2.6 <i>Complementary DNA</i> (cDNA)	10
2.7 Kloning cDNA	11
BAB 3. BAHAN DAN METODE	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	14
3.2 Bahan dan Alat	14
3.3 Metode Penelitian	15
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1 Hasil dan Pembahasan	19
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	33
5.1 Kesimpulan	33
5.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
4.1	Hasil elektroforesis cDNA Daun Melinjo	20
4.2	Hasil elektroforesis cDNA Daun Melinjo.....	21
4.3	Peta Lingkaran Plasmid <i>pGEM-T Easy</i>	22
4.4	Hasil seleksi bakteri transforman pada media LB <i>plate</i>	24
4.5	Hasil elektroforesis isolasi plasmid dengan menggunakan Enzim restriksi <i>EcoRI</i> pada gel agarose 1%	25
4.6	Hasil sekuensi Fragmen cDNA Gg-AOP I	26
4.7	Hasil sekuensi Fragmen cDNA Gg-AOP II	27
4.8	Hasil homologi cDNA Gg-AOP I dengan Biji	27
4.9	Hasil homologi cDNA Gg-AOP II dengan Biji	28
4.10	Hasil homologi cDNA Gg-AOP II dengan Gg-AOP II ...	29

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Foto Penelitian	35

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