



LAPORAN AKHIR PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

PENGEMBANGAN PROSEDUR EFISIEN UNTUK PENYIMPANAN SAMPEL DAN EKSTRAKSI DNA UBI KAYU

(Manihot esculenta Crantz)

BIDANG KEGIATAN: PKM-PENELITIAN

Diusulkan oleh:

| | | | | |
|---------|---|---------------------|-----------|------|
| Ketua | : | Mirza Ramadhana P. | A24110119 | 2011 |
| Anggota | : | Etik Sulistiyowati | A24110025 | 2011 |
| | | Nuri Kiptantiyawati | A24110041 | 2011 |
| | | Nawar lina Syarifah | A24110048 | 2011 |
| | | Pradita Maulia | G84100006 | 2010 |

Dibiayai oleh:

Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi

Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan

sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Program Kreativitas Mahasiswa

Nomor : 050/SP2H/KPM/Dit.Litabmas/V/2013, tanggal 13 Mei 2013

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2013**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Kegiatan : Pengembangan Prosedur Efisien untuk Penyimpanan Sampel dan Ekstraksi DNA Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz)
2. Bidang Kegiatan : PKM-P PKM-M PKM-KC
 PKM-K PKM-T
3. Ketua Pelaksana Kegiatan
 - a. Nama Lengkap : Mirza Ramadhana Putra
 - b. NIM : A24110119
 - c. Jurusan : Agronomi dan Hortikultura
 - d. Universitas/Institut/Politeknik : Institut Pertanian Bogor
 - e. Alamat Rumah dan No Tel./HP : Asrama Etos Putra-Bateng / 085781094225
 - f. Alamat email : mirzaramadhanaputra@yahoo.co.id
4. Anggota Pelaksana Kegiatan/Penulis: 4 orang
5. Dosen Pendamping
 - a. Nama Lengkap dan Gelar : Dr. Sintho Wahyuning Ardie, SP., MSi.
 - b. NIDN : 198207062005012001
 - c. Alamat Rumah dan No Tel./HP : Kebun Raya Residence, Blok F No. 23, Ciomas, Bogor 16610; 0251-8632147/ 085880176176
6. Biaya Kegiatan Total :
 - a. Dikti : Rp. 9,000,000,00,-
 - b. Sumber lain : -
7. Jangka Waktu Pelaksanaan : 4 (empat) bulan

Bogor, 22 Juli 2013

Menyetujui,
Ketua Departemen Agronomi dan
Hortikultura

Dr. Ir. Agus Purwito, MSc.Agr.
NIP. 19611101 198703 1 003

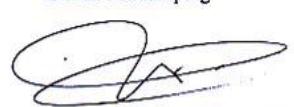
Ketua Pelaksana Kegiatan


Mirza Ramadhana Putra
A24110119

Wakil Rektor
Bidang Akademik dan Kemahasiswaan

Prof. Dr. Ir. Yenny Koesmaryono, MS
NIP. 19531228 198503 1 003

Dosen Pendamping


Dr. Sintho W. Ardie, SP,MSi
NIDN. 0006078202

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Ketahanan pangan dan ketersediaan energi terbarukan merupakan masalah nasional yang tengah mengemuka saat ini. Berkurangnya lahan sawah, menurunnya kualitas tanah, perubahan iklim dan faktor lainnya, seringkali menyebabkan usaha pemenuhan kebutuhan beras (usaha swasembada pangan) terhambat. Oleh karena itu diversifikasi pangan dengan memanfaatkan produk pangan lokal merupakan salah satu upaya untuk menanggulangi permasalahan di atas. Indonesia memiliki keanekaragaman hayati sangat besar sehingga memiliki potensi besar untuk memanfaatkan sumber daya pangan lokal sebagai bahan baku substitusi gandum. Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan salah satu jenis tanaman pangan yang dibudidayakan di Indonesia. Berdasarkan data [Badan Pusat Statistik \(2012\)](#), produktivitas ubi kayu nasional yang terus mengalami peningkatan sejak tahun 2007 hingga tahun 2010. Hal tersebut mencerminkan tingginya tingkat kebutuhan ubi kayu, baik sebagai bahan pangan (*food*), pakan (*feed*), maupun energy (*fuel*).

Keanekaragaman hayati ubi kayu di Indonesia cukup tinggi. Hal tersebut tergambar oleh sudah dilepasnya beberapa varietas ubi kayu nasional, varietas introduksi dari negara lain, dan genotipe-genotipe lokal yang masih perlu terus dieksplorasi. Keanekaragaman plasma nutfah merupakan syarat utama dalam upaya perakitan varietas ubi kayu baru dengan sifat-sifat unggul, seperti produktivitas tinggi, kandungan pati tinggi, kandungan asam sianida (HCN) rendah, kandungan nutrisi yang baik, serta toleran terhadap cekaman biotik dan abiotik. Dalam kegiatan pemuliaan, berbagai aksesi dan genotipe diidentifikasi untuk menentukan deskripsi untuk memperoleh deskripsi sifat kualitatif dan kuantitatif plasma nutfah tersebut ([Slotta et al., 2005](#)). Identifikasi plasma nutfah dapat dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi maupun menggunakan penanda molekuler, akan tetapi identifikasi menggunakan penanda molekuler dinilai lebih akurat. [Wong et al. \(1997\)](#) telah mengembangkan marka RAPD (*random amplified polymorphism*) untuk ubi kayu, dimana salah satu primernya berpotensi digunakan sebagai penanda karakter kandungan HCN. Evaluasi terhadap beberapa varietas ubi kayu terkait karakter ketahanan pada penyakit CMD (*cassava mosaic disease*) juga telah dilakukan menggunakan penanda SSR (*simple sequence repeats*) ([Bi et al., 2010](#)).

Berbagai penanda molekuler tersebut memerlukan DNA genom tanaman dengan kualitas yang baik dan jumlah yang cukup. Isolasi DNA dari populasi yang besar (jumlah tanaman yang banyak) pada kegiatan MAS (*marker assisted selection*) memerlukan metode isolasi DNA yang cepat dan sederhana. Di samping itu, seringkali genotipe lokal harus dikumpulkan dari daerah yang letaknya jauh dari laboratorium sehingga menunda proses isolasi DNA. Oleh karena itu pengembangan metode penyimpanan contoh dan isolasi DNA yang efisien sangatlah diperlukan.

1.2. Perumusan Masalah

Tingginya keragaman plasma nutfah ubi kayu di Indonesia memerlukan metode identifikasi keragaman yang akurat, misalnya menggunakan penanda

molekuler. Penelitian ini dirumuskan berdasarkan beberapa permasalahan yang sering ditemui dalam upaya isolasi DNA, yaitu terjadinya kerusakan dan kehilangan DNA pada tahap pengambilan sampel di lapangan, penyimpanan sampel sebelum DNA diisolasi, dan pada tahap isolasi DNA. Oleh karena itu diperlukan metode yang tepat dan efisien dalam persiapan dan isolasi DNA pada tanaman ubi kayu yang meliputi lama dan suhu penyimpanan sampel sebelum DNA diisolasi, dan metode isolasi DNA yang relatif mudah, murah dan cepat.

1.3. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui pengaruh cara penyimpanan sampel daun ubi kayu sebelum isolasi DNA terhadap kualitas dan kuantitas DNA.
2. Mengetahui pengaruh metode isolasi DNA daun ubi kayu terhadap kualitas dan kuantitas DNA.
3. Mengetahui interaksi pengaruh cara penyimpanan sampel daun ubi kayu dan metode isolasi DNA terhadap kualitas dan kuantitas DNA.

1.4. Luaran Yang Diharapkan

Luaran yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Dihasilkannya prosedur efisien untuk penyimpanan contoh dan isolasi DNA untuk tanaman ubi kayu;
2. Publikasi ilmiah dari hasil penelitian ini melalui berbagai forum, seperti seminar ilmiah dan jurnal ilmiah, pada tingkat nasional dan internasional.

1.5. Kegunaan Program

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang bermanfaat mengenai prosedur pengambilan sampel, penyimpanan sampel, dan isolasi DNA genom yang efisien pada tanaman ubi kayu. Metode tersebut dapat diaplikasikan oleh lembaga penelitian, perguruan tinggi, dan divisi riset dan pengembangan di perusahaan swasta untuk mendukung program pemuliaan tanaman ubi kayu melalui identifikasi dan karakterisasi keragaman ubi kayu menggunakan penanda molekuler. Dalam jangka panjang, varietas unggul ubi kayu yang dikembangkan dapat mendukung program ketahanan pangan dan menyediakan sumber energi terbarukan. **Bagi institusi** penelitian ini diharapkan dapat mendukung pelaksanaan Tridharma Perguruan Tinggi. Hasil penelitian diharapkan dapat memperkaya materi kuliah sehingga mendukung kegiatan belajar mengajar baik bagi mahasiswa maupun dosen; mampu menginisiasi topik-topik penelitian baru terkait kaenekaragaman plasma nutfah dan perbaikan tanaman ubi kayu dan tanaman anggota famili Euphorbiaceae lainnya yang memiliki karakter mirip dengan ubi kayu; dan dapat didiseminasi kepada masyarakat pengguna secara langsung seperti lembaga penelitian, perguruan tinggi lain, dan divisi penelitian dan pengembangan perusahaan swasta. **Bagi mahasiswa**, penelitian ini akan berguna sebagai proses belajar dalam membangun ide dan melakukan penelitian, memperoleh pengetahuan dan keterampilan dalam bidang biologi molekuler, meningkatkan *soft skills* seperti kerja sama dalam suatu tim, mampu menjaga kekompakan, kepercayaan, dan saling menghargai pendapat.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ubi Kayu

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) termasuk ke dalam famili Euphorbiaceae dan genus *Manihot*. *Manihot esculenta* Crantz merupakan spesies yang paling banyak dibudidayakan dalam genus *Manihot* ([Mkumbira, 2002](#)). Ubi

kayu merupakan tanaman monoecious. Perbanyakan ubi kayu dilakukan dengan menggunakan setek batang. Perbanyakan dengan biji sulit dilakukan karena tanaman ini hanya akan berbunga pada ketinggian 800 m dpl, sedangkan pada ketinggian 300 m dpl ubi kayu tidak dapat berbunga, namun hanya dapat menghasilkan umbi (Kusmiyati, 2010). Pembentukan benih pada ubi kayu membutuhkan waktu yang lama. Setelah penyerbukan terjadi, *ovary* akan membentuk buah muda dan membutuhkan waktu 3-5 bulan untuk masak (Kawano *et al.*, 1978). Walaupun membutuhkan waktu yang lebih lama, bibit yang dihasilkan dari biji akan beragam secara genetik (Ekanayake *et al.*, 1997). Karakter morfologi (bentuk dan ukuran) daun, tinggi tanaman, warna batang, warna kulit atau daging umbi, waktu panen, hasil, dan kandungan *cyanogenic glucoside* pada umbi dapat digunakan untuk membedakan antar klon ubi kayu (Norman *et al.*, 1995).

Selain mengandung karbohidrat, ubi kayu juga mengandung vitamin A (terutama dalam daunnya), kalsium (Ca), dan besi (Fe), tetapi penggunaan ubi kayu sebagai bahan pangan kurang menarik dibandingkan sumber karbohidrat lainnya. Hal ini disebabkan karena kandungan HCN yang ada di daun dan umbinya, serta miskin protein (Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian, 2005). Daun dan jaringan parenkim umbi mengandung HCN dengan kisaran 10-370 mg/kg umbi (Norman *et al.*, 1995). Menurut Sudarmonowati (2012) dibandingkan bahan pangan sumber karbohidrat lain, rasio protein/energi umbi ubi kayu sangat rendah yaitu 7.4 mg/kalori dibandingkan dengan jenis lainnya seperti gandum, padi, jagung dan sorgum. Oleh karena itu, perbaikan sifat ubi kayu yang mempunyai kandungan nutrisi tinggi (β -karoten, vitamin atau protein) dan HCN rendah sangat diperlukan untuk pemenuhan kebutuhan pangan. Di Indonesia varietas yang umum dibudidayakan adalah genotipe lokal, varietas unggul nasional, dan varietas introduksi. Varietas unggul ubi kayu yang telah banyak dibudidayakan oleh masyarakat antara lain, Adira 1, Adira 2, Adira 4, Malang 1, Malang 2, Malang 4, dan Malang 6 (Purwono dan Purnamawati, 2007).

2.2. Isolasi DNA

Isolasi DNA genom merupakan tahap pertama untuk semua kegiatan biologi molekuler berbasis DNA. DNA dapat diisolasi dari sampel segar tanaman, sampel tanaman yang diawetkan atau sampel kering beku, tetapi untuk mendapatkan DNA yang berkualitas baik maka sampel segar tanaman lebih direkomendasikan (Semagn *et al.*, 2006). Penelitian Bhattacharjee *et al.* (2009) menunjukkan bahwa penyimpanan sampel daun ubi kayu dalam -20 °C lebih dari 1 minggu sebelum isolasi DNA dapat menurunkan kuantitas dan kualitas DNA. Kuantitas dan kualitas DNA genom yang diisolasi dari jaringan tanaman juga dipengaruhi oleh kandungan polisakarida, metabolit sekunder, tanin, dan polifenol (Shepherd *et al.*, 2002; Zidani *et al.*, 2005). Pemilihan metode yang tepat dapat mengatasi hambatan-hambatan tersebut diatas. Beberapa metode yang umum yang umum digunakan pada metode isolasi DNA adalah metode CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) dan SDS (*sodium dodecyl sulphate*) (Ribeiro *et al.*, 2007). Modifikasi metode CTAB dengan penambahan 4% PVP dan 2% PEG dapat digunakan untuk mengurangi atau menghilangkan polisakarida, polifenol, dan protein yang dapat mengganggu amplifikasi PCR (Sharma *et al.*, 2008). Isolasi DNA dari daun tanaman penghasil umbi (*tropical tuber crops*), termasuk

ubi kayu, tergolong rumit karena adanya senyawa fenolik, tingginya kandungan polisakarida, dan endonuklease pada jaringan daunnya ([Sharma et al., 2008](#)).

III. METODE PELAKSANAAN

Ekstraksi DNA Ubi Kayu

Sampel dalam penelitian ini diambil dengan menggunakan gunting yang telah dibilas alkohol 70%. Sampel daun (0,20 g) untuk perlakuan K1 langsung diisolasi DNA-nya sesuai dengan perlakuan metode isolasi DNA. Sampel daun untuk perlakuan K2 dan K3 dibungkus dalam alumunium foil dan disimpan dalam lemari pendingin bersuhu 4°C (K2) atau lemari pendingin bersuhu -20°C (K3) sebelum diisolasi DNA-nya 1 minggu setelah sampel diambil.

Metode standar isolasi DNA (M1 dan M2) akan dilakukan sebagai berikut: sampel digerus menggunakan *mortar* dan *pestle* dalam 800 μ L bufer lisis CTAB (M1) atau SDS (M2). Sampel kemudian dipindahkan ke dalam 1.5 mL microtube menggunakan pipet dan diinkubasi di dalam *water bath* bersuhu 65°C selama 30 menit. Sampel selanjutnya diinkubasikan di suhu ruang selama 10 menit. Sebanyak 700 μ L CIA ditambahkan ke dalam sampel dan dibolak-balik secara perlahan agar tercampur merata. Sampel kemudian disentrifugasi dalam kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Fase atas (*supernatant*) yang terbentuk (\pm 400-500 μ L) dipindahkan ke microtube baru, *supernatant* disamakan volumenya (500 μ L) dengan menambahkan aqua bidestilata. Setelah volumenya sama, *supernatant* ditambahkan etanol 100% 2x lipat yaitu volumenya 1000 μ L. Tahap selanjutnya supernatant yang sudah dicampur etanol 100% disimpan dikulkas untuk proses presipitasi secara serempak pada semua sampel.

Metode cepat isolasi DNA (M3 dan M4) akan dilakukan sebagai berikut: sampel dimasukkan ke dalam 1.5 mL microtube dan dihancurkan menggunakan pastle blue dalam sedikit (50 μ L) bufer CTAB (M3) atau SDS (M4). Saat jaringan sudah cukup hancur, bufer ditambah hingga volume akhir 400 μ L. Sampel diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit dan kemudian disentrifugasi dalam kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Supernatant kemudian dipindahkan ke microtube baru *supernatant* disamakan volumenya (500 μ L) dengan menambahkan aqua bidestilata. Setelah volumenya sama, *supernatant* ditambahkan etanol 100% 2x lipat yaitu volumenya 1000 μ L. Tahap selanjutnya supernatant yang sudah dicampur etanol 100% disimpan dikulkas untuk proses presipitasi secara serempak pada semua sampel.

Metode cepat isolasi DNA dengan pemanasan (M5 dan M6) akan dilakukan sebagai berikut: sampel dimasukkan ke dalam 1.5 mL microtube dan dihancurkan menggunakan pastle blue dalam sedikit (50 μ L) bufer CTAB (M3) atau SDS (M4). Saat jaringan sudah cukup hancur, bufer ditambah hingga volume akhir 400 μ L. Sampel diinkubasikan pada *water bath* bersuhu 65°C selama 10 menit dan kemudian disentrifugasi dalam kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Supernatant kemudian dipindahkan ke microtube baru *supernatant* disamakan volumenya (500 μ L) dengan menambahkan aqua bidestilata. Setelah volumenya sama, *supernatant* ditambahkan etanol 100% 2x lipat yaitu volumenya 1000 μ L. Tahap selanjutnya supernatant yang sudah dicampur etanol 100% disimpan dikulkas untuk proses presipitasi secara serempak pada semua sampel. Konsentrasi DNA dinyatakan dalam satuan μ g

DNA/ g bobot basah daun karena bobot daun yang digunakan dalam isolasi DNA dan volume air yang digunakan untuk melarutkan DNA setelah presipitasi (*ethanol precipitation*) bervariasi. Bobot basah daun ubi kayu yang digunakan dalam isolasi DNA menggunakan metode CTAB atau SDS standar adalah 0.2 g, sedangkan pada metode isolasi cepat maupun isolasi cepat-dipanaskan menggunakan buffer CTAB dan SDS rata-rata bobot basah daun yang digunakan jauh lebih kecil, yaitu 0.01 g.

Peubah yang akan diamati dalam penelitian ini adalah kualitas dan kuantitas DNA. Efisiensi metode isolasi DNA akan dinilai berdasarkan DNA yang dihasilkan (kuantitas dan kualitasnya), kemudahan pelaksanaan, waktu yang dibutuhkan untuk mengisolasi DNA, dan biaya per sampel. Penentuan kualitas DNA akan dilakukan dengan menghitung rasio absorbansi pada A_{260} dengan A_{280} (ratio $A_{260}:A_{280}$) dan dengan melihat pita DNA melalui elektroforesis. Nilai maksimal rasio $A_{260}:A_{280}$ adalah 2. Semakin rendah nilai rasio tersebut, semakin rendah kualitas DNA akibat kontaminasi protein. Dalam metode elektroforesis, pita DNA genom normal akan tampak sebagai pendar tak putus pada gel agarose setelah proses elektroforesis. Elektroforesis akan dilakukan menggunakan gel agarose 1.5% dalam *chamber electrophoresis* berisi 1x bufer TAE. Pendar DNA akan divisualisasi menggunakan *gel-doc DNA visualizer* setelah diwarnai menggunakan *ethidium bromida* (EtBr). Penentuan kuantitas DNA akan dilakukan dengan menghitung absorbansi pada A_{260} menggunakan spektrofotometer. Untuk menghitung konsentrasinya, DNA dilarutkan hingga menjadi 100x pengenceran menggunakan air. Sampel yang telah diencerkan ke dalam kuvet dan ditentukan konsentrasinya dengan persamaan:

$$\text{Konsentrasi DNA (\mu g/mL)} = 50 \text{ \mu g/mL} \times \text{Absorbansi pada } A_{260} \times \text{Faktor pengenceran}$$

Konfirmasi kualitas DNA menggunakan PCR dan primer universal

Polymerase chain reaction (PCR) dilakukan untuk mengetahui apakah DNA yang diisolasi dapat digunakan dalam reaksi lanjutan berbasis PCR. DNA yang telah diisolasi diamplifikasi menggunakan primer RAPD universal, yaitu E19 (GTGACCAGCC). Tiap reaksi PCR memiliki volume 20 μL , yang terdiri atas 10 μL PCR master-mix, 5 μL template DNA (60 ng DNA/ 20 μL), dan 5 mL primer (50 pmol/ 20 μL). PCR master mix terdiri atas 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 9.1), tritonTMx-100 0.01 %, 0.08 M dNTP, 1.5 mM MgCl₂, dan 2-3 unit DNA polymerase. PCR akan dilakukan dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit diikuti 45 siklus: 94°C selama 5 detik, 35°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Reaksi PCR diakhiri dengan ekstensi pada suhu 72°C selama 10 menit dan 4°C. PCR dilakukan selama 45 siklus. Hasil PCR dielektroforesis pada gel agarose (1%) dalam buffer TAE dan divisualisasi menggunakan gel visualizer.

IV. PELAKSANAAN PROGRAM

Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini akan dilaksanakan di *Molecular Cloning Laboratory*, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor dan Balai Besar Biologi Genetika Molekular selama lima (5) bulan.

Tahapan Pelaksanaan

Penelitian ini akan dilakukan selama lima (5) bulan dengan jadwal sebagai berikut (Tabel 1).

Tabel 1. Jadwal Pelaksanaan Penelitian

| Kegiatan | Bulan ke | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------|---|---|---|-------|---|---|---|-----|---|---|---|------|---|---|---|------|---|---|---|
| | MARET | | | | APRIL | | | | MEI | | | | JUNI | | | | JULI | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Konsultasi dengan dosen pembimbing | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Perizinan penggunaan laboratorium | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Persiapan alat dan bahan | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pelaksanaan penelitian | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pengolahan dan interpretasi data | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Penulisan <i>draft</i> artikel untuk publikasi | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proses pemasukkan artikel ke salah satu jurnal ilmiah | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Monev | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pembuatan laporan akhir | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Instrumen Pelaksanaan

Instrumen dalam penelitian ini adalah *mortar* dan *pestle*, *microtube*, *micropipette*, *water bath*, *centrifuge*, *coolbox*, lemari pendingin (4°C dan -20°C), *electrophoresis chamber*, gel visualizer, Nanodrop 2000, dan *thermal cycler*.

Rekapitulasi Rancangan dan Realisasi Biaya

Tabel 2. Rancangan biaya selama penelitian

| No | Pengeluaran | Unit | Jumlah | Harga / Unit (Rp) | Total (Rp) |
|-----|---|--------|--------|-------------------|------------|
| 1 | Isolasi DNA | sampel | 216 | 15,000 | 3,240,000 |
| 2 | Biaya Analisis | | | | |
| 2.1 | Cek Kualitas : Elektroforesis | paket | 15 | 25,000 | 375,000 |
| 2.2 | Cek Kuantitas : Nanodrop | paket | 216 | 6,000 | 1,296,000 |
| 2.3 | Pengecekan Kualitas dan Kuantitas DNA : PCR | paket | 102 | 5,000 | 510,000 |
| 3 | Administrasi | | | | |
| 3.1 | Proposal dan Compile CD | Eks | 2 | 15,000 | 30,000 |
| 3.2 | Laporan Kemajuan | Eks | 2 | 10,000 | 20,000 |
| 3.3 | Poster dan foto 4R | lembar | 1 | 47,000 | 47,000 |
| 3.4 | Logbook, buku keuangan, dan ATK | paket | 1 | 25,000 | 25,000 |
| 3.5 | Fotocopy dan print | paket | 1 | 200,000 | 200,000 |
| 4 | Lainnya | | | | |
| 4.1 | Sarung tangan (gloves) | kotak | 1 | 60,000 | 60,000 |
| 4.2 | Tissue | gulung | 5 | 5,000 | 25,000 |
| 4.3 | Label | paket | 1 | 3,500 | 3,500 |
| 4.4 | Wadah Sampel | kotak | 1 | 4,000 | 4,000 |
| 4.5 | Transportasi | hari | 64 | 5,000 | 320,000 |
| 4.6 | Komunikasi | bulan | 4 | 50,000 | 200,000 |

| | | | | | |
|------------------|---------------------|-------|---|-------|-----------|
| 4.7 | Plastik dan Es Batu | paket | 1 | 2,500 | 2,500 |
| 4.8 | Pupuk Kandang | Kg | 1 | 5,000 | 5,000 |
| TOTAL PENGGUNAAN | | | | | 6,363,000 |

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA tanaman ubi kayu telah diisolasi dari daun muda pada empat (4) genotipe ubi kayu, yaitu Ratim, Jame-jame, Malang-4 dan ubi kayu raksasa dari Kalimantan Timur. Daun tanaman ubi kayu disimpan dengan tiga (3) cara dan diisolasi menggunakan enam (6) metode. Rasio A_{260}/A_{280} umum digunakan untuk menentukan kemurnian DNA yang diisolasi, terutama dari kontaminan berupa protein. Rasio A_{260}/A_{280} antara 1.8-1.9 menunjukkan kualitas DNA yang baik (Sambrook *et al.*, 1989). Kualitas DNA berdasarkan rasio A_{260}/A_{280} pada genotipe Ratim dan genotipe Raksasa dari Kalimantan Timur cukup baik, karena berkisar antara 1.8-1.9, baik pada DNA yang diisolasi dari sampel segar maupun dari DNA yang diisolasi dari sampel yang disimpan selama satu minggu pada suhu 4 °C atau -20 °C (Tabel 3). Sebaliknya, nilai rasio A_{260}/A_{280} pada genotipe Jame-jame dan Malang-4 adalah < 1.8 yang menunjukkan bahwa terdapat kontaminan protein yang cukup tinggi pada DNA yang diisolasi dari kedua genotipe tersebut.

Tabel 3. Konsentrasi dan kualitas DNA yang diisolasi dari daun empat genotipe ubi kayu pada kondisi penyimpanan sampel yang berbeda

| Kondisi penyimpanan sampel | Konsentrasi DNA (μ g/ g bobot basah) | Rasio A_{260}/A_{280} | Rasio A_{260}/A_{230} |
|--------------------------------|--|-------------------------|--------------------------|
| Genotipe 'Ratim' | | | |
| Sampel segar | 1,317 | 1.88 | 1.23 |
| Disimpan 1 minggu pada 4°C | 1,339 | 1.82 | 1.06 |
| Disimpan 1 minggu pada -20°C | 1,822 | 1.93 | 1.23 |
| Koefisien keragaman (%) | 31.85¹ | 12.13 | 9.22¹ |
| Genotipe 'Jame-jame' | | | |
| Sampel segar | 2,769 | 1.69 | 1.06 |
| Disimpan 1 minggu pada 4°C | 1,559 | 1.73 | 0.89 |
| Disimpan 1 minggu pada -20°C | 1,828 | 1.72 | 0.89 |
| Koefisien keragaman (%) | 30.16¹ | 9.05 | 8.21¹ |
| Genotipe 'Malang-4' | | | |
| Sampel segar | 4,167a | 1.58b | 0.78b |
| Disimpan 1 minggu pada 4°C | 2,430b | 1.71a | 1.03a |
| Disimpan 1 minggu pada -20°C | 1,960b | 1.60b | 0.87b |
| Koefisien keragaman (%) | 24.32¹ | 8.35 | 7.14¹ |
| Genotipe 'Raksasa' | | | |
| Sampel segar | 4,256 | 1.79 | 1.07 |
| Disimpan 1 minggu pada 4°C | 4,158 | 1.90 | 1.31 |
| Disimpan 1 minggu pada -20°C | 6,006 | 1.80 | 1.21 |
| Koefisien keragaman (%) | 29.30¹ | 12.91 | 24.23¹ |

Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama di tiap genotipe menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan *DMRT* pada taraf $\alpha = 5\%$. ¹ = data ditransformasi menggunakan $\sqrt{x + 0.5}$

Isolasi DNA menggunakan metode CTAB yang dilakukan oleh Sharma *et al.* (2008) pada daun tanaman ubi kayu menghasilkan DNA dengan kontaminan protein yang cukup tinggi. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa

kontaminasi protein pada DNA genom dipengaruhi oleh materi yang digunakan. Walaupun berasal dari spesies yang sama, genotipe Jame-jame dan Malang-4 memiliki rasio A_{260}/A_{280} yang lebih rendah dibandingkan genotipe Ratim dan genotipe Raksaksa dari Kalimantan Timur. Rasio A_{260}/A_{230} menggambarkan taraf kontaminasi DNA oleh kontaminan selain protein, terutama polisakarida (Wilson dan Walker, 2005). Nilai rasio A_{260}/A_{230} di atas 1.7 menunjukkan bahwa DNA cukup murni dari kontaminan berupa polisakarida. Pada penelitian ini, DNA yang diisolasi dari empat genotipe ubi kayu menggunakan tiga kondisi simpan yang berbeda memiliki rasio $A_{260}/A_{230} < 1.7$. Hal tersebut menunjukkan bahwa kontaminan berupa polisakarida cukup dominan pada daun tanaman ubi kayu.

Metode isolasi DNA berpengaruh nyata terhadap konsentrasi DNA dan kualitas DNA (ratio A_{260}/A_{230}) pada seluruh genotipe ubi kayu yang diuji (Tabel 2). Konsentrasi DNA yang diisolasi menggunakan metode SDS-cepat dan SDS-cepat-dipanaskan lebih tinggi dibandingkan konsentrasi DNA yang diisolasi menggunakan metode lainnya, baik pada genotipe Ratim, Jame-jame, Malang-4, maupun genotipe Raksaksa dari Kalimantan Timur. Sebaliknya, konsentrasi DNA yang diisolasi menggunakan metode CTAB-cepat dan CTAB-cepat-dipanaskan lebih rendah dibandingkan konsentrasi DNA yang diisolasi menggunakan metode lainnya, pada genotipe Jame-jame, Ratim, dan Malang-4. *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) merupakan deterjen anionik kuat yang dapat melarutkan protein dan lipid pada membran sel (Tan et al., 2013). Oleh karena itu pada metode sederhana (sampel daun hanya dipotong kecil-kecil menggunakan gunting, serta tanpa penggerusan) seperti metode cepat atau metode cepat-dipanaskan, SDS diduga mampu melakukan proses *lysis* (penghancuran dinding dan membran sel) lebih baik dibandingkan CTAB. Buffer SDS dan CTAB sama efisiennya dalam mengisolasi DNA keempat genotipe ubi kayu saat digunakan pada metode standar (daun digerus hingga halus menggunakan mortar dan pestle).

Metode isolasi DNA tidak berpengaruh nyata terhadap rasio A_{260}/A_{280} pada genotipe Ratim (Tabel 4). DNA yang diisolasi dari daun genotipe Ratim menggunakan enam metode isolasi DNA memiliki rasio $A_{260}/A_{280} > 1.8$. Kualitas DNA yang cukup baik (ratio $A_{260}/A_{280} > 1.8$) pada genotipe Jame-jame hanya ditemukan pada DNA yang diisolasi menggunakan buffer CTAB dengan metode standar atau metode cepat. Rasio A_{260}/A_{280} di atas 1.8 pada genotipe Malang-4 dan genotipe Raksaksa ditemukan pada DNA yang diisolasi menggunakan metode standar, baik dengan buffer CTAB maupun SDS. Secara umum, rasio A_{260}/A_{280} yang cukup tinggi teramat pada DNA yang diisolasi dengan metode standar, terutama dengan buffer CTAB. Mengingat SDS merupakan deterjen anionik kuat yang dapat melarutkan protein dan lipid pada membran sel (Tan et al., 2013), singkatnya waktu inkubasi pada metode cepat maupun metode cepat-dipanaskan diduga menyebabkan SDS mendenaturasi protein secara tidak sempurna sehingga menurunkan nilai rasio A_{260}/A_{280} .

Hampir seluruh rasio A_{260}/A_{230} memiliki nilai < 1.7 , kecuali pada DNA genotipe Ratim dan Jame-jame yang diisolasi menggunakan metode CTAB-standar. Hal tersebut menunjukkan bahwa, metode isolasi cepat maupun metode isolasi cepat dengan pemanasan dan penggunaan buffer *lysis* yang terlalu kuat seperti SDS menyebabkan peningkatan kontaminan terutama polisakarida sehingga menurunkan kualitas DNA. Secara umum, rendahnya kualitas DNA pada penelitian ini diduga akibat tidak digunakannya *polyvinylpyrrolidone* (PVP)

dan β -mercaptoethanol. Bhattacharjee *et al.* (2009) berhasil mengisolasi DNA genom dengan kualitas baik dari daun tanaman ubi kayu dengan menambahkan PVP dan β -mercaptoethanol pada buffer ekstraksi.

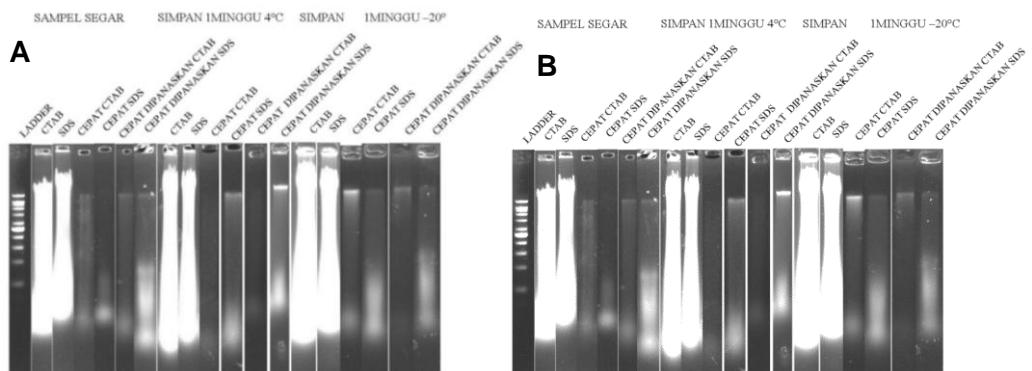
Tabel 4. Konsentrasi dan kualitas DNA yang diisolasi dari daun empat genotipe ubi kayu menggunakan metode isolasi yang berbeda

| Metode isolasi DNA | Konsentrasi DNA (μ g/ g bobot basah) | Rasio A_{260}/A_{280} | Rasio A_{260}/A_{230} |
|-----------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| Genotipe 'Ratim' | | | |
| CTAB standar | 1,147b | 1.98 | 1.73a |
| SDS standar | 1,211b | 1.84 | 1.56a |
| CTAB cepat | 771c | 1.89 | 0.88c |
| SDS cepat | 2,748a | 1.81 | 1.17b |
| CTAB cepat dipanaskan | 508c | 1.92 | 0.83c |
| SDS cepat dipanaskan | 2,573a | 1.82 | 0.88c |
| Koefisien keragaman (%) | 31.85 ¹ | 12.13 | 9.22 ¹ |
| Genotipe 'Jame-jame' | | | |
| CTAB standar | 1,348b | 2.00a | 1.93a |
| SDS standar | 1,346b | 1.76bc | 1.15b |
| CTAB cepat | 585c | 1.91ab | 0.94bc |
| SDS cepat | 5,108a | 1.44d | 0.44d |
| CTAB cepat dipanaskan | 289c | 1.72c | 0.79c |
| SDS cepat dipanaskan | 3,635a | 1.45d | 0.42d |
| Koefisien keragaman (%) | 30.16 ¹ | 9.05 | 8.21 ¹ |
| Genotipe 'Malang-4' | | | |
| CTAB standar | 1,098bc | 1.87a | 1.24a |
| SDS standar | 1,629b | 1.91a | 1.27a |
| CTAB cepat | 542dc | 1.68b | 0.97b |
| SDS cepat | 6,004a | 1.35c | 0.46c |
| CTAB cepat dipanaskan | 532d | 1.64b | 0.89b |
| SDS cepat dipanaskan | 7,308a | 1.35c | 0.53c |
| Koefisien keragaman (%) | 24.32 ¹ | 8.35 | 7.14 ¹ |
| Genotipe 'Raksaksa' | | | |
| CTAB standar | 2,747b | 1.90ab | 1.41ab |
| SDS standar | 3,696b | 1.90ab | 1.27b |
| CTAB cepat | 2,672b | 1.98a | 1.62a |
| SDS cepat | 8,218a | 1.68bc | 0.86c |
| CTAB cepat dipanaskan | 2,311b | 1.88ab | 1.39ab |
| SDS cepat dipanaskan | 9,200a | 1.62c | 0.66c |
| Koefisien keragaman (%) | 29.30 ¹ | 12.91 | 24.23 ¹ |

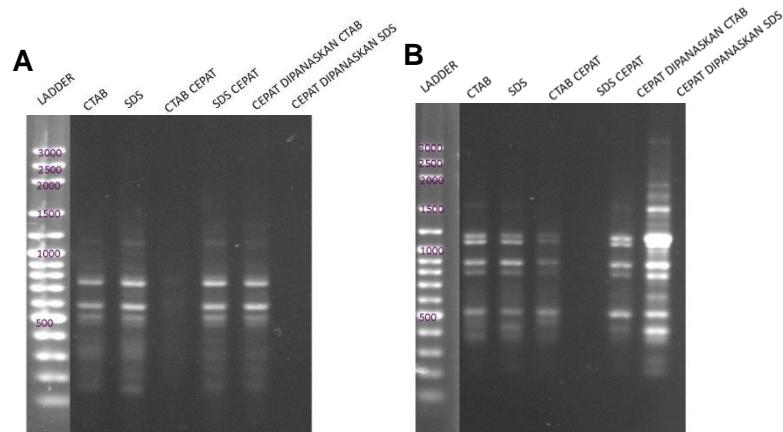
Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama di tiap genotipe menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan *DMRT* pada taraf $\alpha = 5\%$. ¹ = data ditransformasi menggunakan $\sqrt{x} + 0.5$

Rendahnya kualitas DNA juga tampak saat DNA genom dielektroporas pada gel agarose (Gambar 1). Kontaminasi protein dan polisakarida tampak sebagai pendar *smear*. Mengingat kondisi penyimpanan sampel tidak berpengaruh nyata terhadap kualitas DNA ubi kayu (Tabel 3), maka konfirmasi kualitas DNA menggunakan PCR dengan primer universal dilakukan pada genotipe Jame-jame dan Raksaksa yang disimpan pada -20°C selama satu minggu. Hasil amplifikasi menggunakan primer E19 menunjukkan bahwa amplifikasi tidak terjadi pada sampel genotipe Jame-jame yang diisolasi menggunakan metode CTAB cepat dan SDS cepat dipanaskan, dan pada genotipe Raksaksa yang diisolasi menggunakan metode SDS cepat (Gambar 2). Sampel-sampel tersebut memiliki

rasio A_{260}/A_{280} maupun rasio A_{260}/A_{230} yang sangat rendah (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa kualitas DNA merupakan faktor penting yang menentukan keberhasilan amplifikasi DNA menggunakan PCR.



Gambar 1. DNA genom yang diisolasi dari daun ubi kayu genotipe 'Ratim' (A) dan 'Jame-jame' (B). 'M. Elektroporasi dilakukan menggunakan 1% gel agarose; setiap *lane* berisi sebanyak 5 μ L DNA.



Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR pada genotipe 'Jame-jame' (A) dan 'Raksaksa' (B). Elektroporasi dilakukan menggunakan 1% gel agarose

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

Kondisi penyimpanan sampel tidak berpengaruh terhadap konsentrasi dan kualitas DNA pada seluruh genotipe, kecuali genotipe Malang-4, sedangkan metode isolasi DNA berpengaruh nyata terhadap konsentrasi DNA dan kualitas DNA (rasio A_{260}/A_{230}) pada seluruh genotipe ubi kayu yang diuji. Konsentrasi DNA yang diisolasi menggunakan metode SDS-cepat dan SDS-cepat-dipanaskan lebih tinggi dibandingkan konsentrasi DNA yang diisolasi menggunakan metode lainnya, baik pada genotipe Ratim, Jame-jame, Malang-4, maupun genotipe Raksaksa dari Kalimantan Timur. Sebaliknya, konsentrasi DNA yang diisolasi menggunakan metode CTAB-cepat dan CTAB-cepat-dipanaskan lebih rendah dibandingkan konsentrasi DNA yang diisolasi menggunakan metode lainnya, pada genotipe Jame-jame, Ratim, dan Malang-4.

VII. DAFTAR PUSTAKA

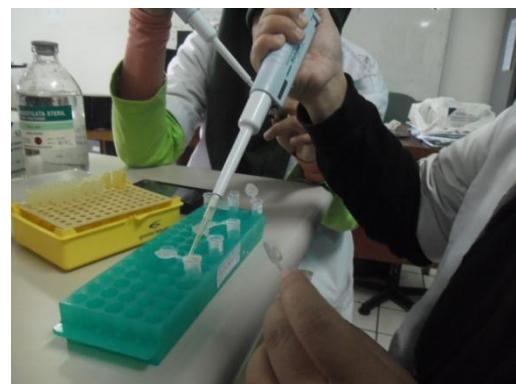
- Badan Pusat Statistik (BPS). 2012. Data Luas Panen, Produktivitas, dan Produksi Tanaman Ubi Kayu Indonesia. Badan Pusat Statistik. Jakarta. www.bps.go.id
- Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (Balitkabi). 2005. Teknologi Produksi Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian Malang. 36 hlm.
- Bi H, M Aileni, P Zhang. 2010. Evaluation of cassava varieties for cassava mosaic disease resistance jointly by agro-inoculation screening and molecular markers. Afr. J. Plant Sci. 4:330-338.
- Bhattacharjee, R., M. Ferguson, M. Gedil, D. Dumet, I. Ingelbrecht. 2009. Field collection, preservation and large scale DNA extraction procedures for cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Afr. J. Biotechnol. 8:3424-3430
- Ekanayake JI, DSO Osiru, MCM Porto. 1997. Morphology of cassava. IITA Research. <http://old.iita.org>
- Kawano, K., A. Amaya, P. Daza, M. Rios. 1978. Factors affecting efficiency of hybridization and selection in cassava. Crop Sci. 18:373-376.
- Kusmiyati. 2010. Perbandingan umbi iles-iles dan singkong sebagai substrat fermentasi *Saccharomyces cerevisiae* dalam produksi bioetanol. Bioteknologi 7:63-72.
- Mkumbira, J. 2002. Cassava development for small scale farmers:approaches to breeding in Malawi. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Agraria 365. Tryck: SLU Service/Repro, Uppsala.
- Norman, MJT, CJ Pearson, PGE Searle. 1995. The Ecology of Tropical Food Crops. Cambridge University Press. 430 p.
- Purwono, H. Purnamawati. 2007. Budidaya 8 Jenis Tanaman Pangan Unggul. Penebar Swadaya. Jakarta. 137 hal.
- Ribeiro, RA, Lovato MB. 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. Genet. Mol. Res. 6:173-187.
- Sambrook, J., E. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Meolcular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Semagn, K, A Bjornstad, MN Ndjjondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. Afr. J. Biotechnol. 5:2540-2568.
- Sharma K., A.K., Mishra, R.S. Misra. 2008. A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. Afr. J. Biotech. 7:1018-1022.
- Shepherd, M, M Cross, LR Stokoe, LJ Scott, ME Jones. 2002. High throughput DNA extraction from forest trees. Plant Mol. Biol. Repr. 20: 425a-425j.
- Slotta TAB, DP Horvath, ME Foley. 2005. Development of polymorphic markers for *Cirsium arvense*, Canada thistle, and their amplification in closely related taxa. Mol. Ecol. Notes 5:917-919.
- Sudarmonowati, E. 2012. Perbaikan sifat ubi kayu dan pengembangannya untuk ketahanan pangan dan nutrisi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. <http://www.wnpg.org>
- Tan, H., M. Tie, L. Zhang, Y. Zhu, H. Li. 2013. The effects of three different grinding methods in DNA extraction of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Afr. J. Biotechnol. 12:1946-1951.

- Wilson, K., J. Walker. 2005. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wong H-L, H-H Yeoh, S-H Lim, K-CL Looi. 1997. Design of primers for RAPD analyses of cassava, *Manihot esculenta*. Phytochemistry 46:805-810.
- Zidani S, A Ferchichi, M Chaieb. 2005. Genomic DNA extraction method from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) leaves. Afr. J. Biotechnol. 4:862-866

LAMPIRAN



Gambar 3. Penggerusan sampel segar



Gambar 4. Presipitasi sampel