REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SERTIFIKAT PATEN SEDERHANA

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten Sederhana kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten	:	LPPM UNIVERSITAS MULAWARMAN Jl. Krayan No. 1, Kampus Gn. Kelua, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur 75119 INDONESIA
Untuk Invensi dengan Judul	:	KOMPOSISI BUFFER EKSTRAKSI DNA UNTUK TANAMAN YANG MENGANDUNG POLYPHENOL DAN METABOLIT SEKUNDER TINGGI PADA METODE EKSTRAKSI TANPA MENGGUNAKAN NITROGEN CAIR DAN PHENOL
Inventor	:	Widi Sunaryo Nurhasanah Aris Sugiarto
Tanggal Penerimaan	:	07 Desember 2017
Nomor Paten	:	IDS000002031
Tanggal Pemberian	:	29 November 2018

Perlindungan Paten Sederhana untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 10 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 23 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten Sederhana ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001

(12) PATEN INDONESIA

(19) DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

(11) IDS000002031 B

(45) 29 November 2018

(51) Klasifikasi IPC[8] : C 07H 1/06, C 12N 15/10

(21) No. Permohonan Paten : S00201708791

(22) Tanggal Penerimaan: 07 Desember 2017

(30) Data Prioritas :
(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara

( ) Tanggal Pengumuman: 16 Maret 2018

Dokumen Pembanding:
Jurnal homepage: http://ejournal.unkhair.ac.id/index.php/Techno
PIETER AGUSTHINUS RIUPASSA, Karya Tulis, Pascasarjana Institut Pertanian Bogor Bogor, 2016
US 20140086879 A1
US 20140051571 A1
WO 2013138398 A1

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
LPPM UNIVERSITAS MULAWARMAN
Jl. Krayan No. 1, Kampus Gn. Kelua,
Universitas Mulawarman, Samarinda,
Kalimantan Timur 75119
INDONESIA

(72) Nama Inventor :
Widi Sunaryo, ID
Nurhasanah, ID
Aris Sugiarto, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Ir. Susilo Wardoyo

Jumlah Klaim : 1

(54) Judul Invensi : KOMPOSISI BUFFER EKSTRAKSI DNA UNTUK TANAMAN YANG MENGANDUNG POLYPHENOL DAN METABOLIT SEKUNDER TINGGI PADA METODE EKSTRAKSI TANPA MENGGUNAKAN NITROGEN CAIR DAN PHENOL

(57) Abstrak :

Invensi ini berhubungan dengan komposisi dan konsentrasi buffer ekstraksi DNA untuk tanaman yang mengandung polyphenol metabolit sekunder tinggi pada metode ekstraksi tanpa menggunakan nitrogen cair dan phenol. Komposisi buffer ekstraksi DNA asis CTAB yang mengandung 4% PVP + 2% β-Mercaptoethanol + 1,5 M NaCl, memberikan hasil yang terbaik terhadap kuantitas dan as dari DNA yang dihasilkan. Pelet DNA yang yang dihasilan jelas dan cukup besar serta berwarna putih, menghasilkan pita DNA an jelas (diskrit) dengan tidak adanya smear, menghasilkan rata-rata konsentrasi DNA yang sangat tinggi, yaitu 843,91 ng/µl dan ian DNA yang baik dengan nilai rasio λ 260/280 sebesat 1,809. Validasi pengujian kualitas DNA yang ditunjukkan melalui asilan amplifikasi fragmen DNA menggunakan primer *rbcl* dan didapatkan amplicon yang diskrit dan jelas. Hasil pengujian efektivitas kstraksi pada daun segar tanaman durian, sirsak dan cempedak menunjukkan keberhasilan didapatkannya DNA dengan kuantitas itas yang baik, dan juga berhasil diamplifikasi dengan baik.

Deskripsi

KOMPOSISI BUFFER EKSTRAKSI DNA UNTUK TANAMAN YANG MENGANDUNG POLYPHENOL DAN METABOLIT SEKUNDER TINGGI PADA METODE EKSTRAKSI TANPA MENGGUNAKAN NITROGEN CAIR DAN PHENOL

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan jenis bahan kimia dan konsentrasi bahan kimia yang digunakan sebagai buffer dalam proses ekstraksi DNA tanaman untuk tanaman yang mengandung polyphenol dan metabolit sekunder tinggi pada metode ekstraksi tanpa nitrogen cair dan phenol.

Latar Belakang Invensi

Ekstraksi DNA pada tanaman-tanaman yang mengandung polyphenol dan metabolit sekunder tinggi banyak mengalami kendala, baik dalam menghasilkan DNA dengan kualitas yang baik dan kuantitas yang cukup. Hal ini dikarenakan adanya kontaminasi dari metabolit sekunder dan polisakarida yang terlalu banyak dari tanaman tersebut. Metode ekstraksi DNA perlu disesuaikan untuk setiap spesies tanaman dan bahkan untuk setiap jaringan tanaman karena kehadiran metabolit sekunder ini, tidak seperti hewan dan mikroba (Sahu et al., 2012). Warino (2012) menyatakan bahwa durian merupakan tanaman tahunan yang daunnya mengandung metabolit sekunder seperti polifenol dan polisakarida yang lebih tinggi dibandingkan tanaman lain. Keberadaan metabolit sekunder dan polisakarida dalam sel tanaman sering menyulitkan dalam isolasi asam nukleat (Wilkins dan Smarts 1996 *dalam* Warino, 2012). Apabila daun digerus metabolit sekunder (fenol) akan keluar dan akan menjadi penghambat dalam isolasi dan

purifikasi DNA. Hikmah (2013) menambahkan, kesulitan dalam mengisolasi DNA dari daun durian yaitu karena ada banyaknya lendir yang dihasilkan dan adanya warna kecoklatan pada pelet hasil isolasi DNA.

Pada umumnya teknik isolasi DNA pada tanaman tahunan diperlukan penggunaan nitrogen cair untuk membantu menghancurkan jaringan (Syafaruddin et al., 2011). Penggunaan nitrogen cair akan menimbulkan masalah bila lokasi penelitian jauh dari pusat industri sehingga sulit mendapatkan nitrogen cair. Dengan demikian akan berdampak pada peningkatan biaya dan waktu yang diperlukan akan lebih lama. Selain masalah nitrogen cair, untuk memperoleh DNA yang murni tanpa kontaminasi polisakarida biasanya digunakan phenol. Phenol merupakan bahan kimia toksik yang penggunaannya harus dilakukan di dalam lemari asam (Fume Hood). Hal ini akan menimbulkan masalah jika laboratorium tidak dilengkapi dengan lemari asam (Fume Hood) (Ardiana, 2009).

Bahan yang diketahui dapat digunakan untuk mencegah kontaminasi metabolit sekunder dan polisakarida pada proses isolasi DNA adalah PVP (Polyvinylpyrrolidone), β-Mercaptoethanol dan NaCl (Natriumchlorides. PVP dan β-Mercaptoethanol berfungsi untuk menghambat enzim polifenol oksidase, karena PVP termasuk antioksidan yang dapat mencegah terjadinya reaksi oksidasi sedangkan β-mercaptoethanol dapat mereduksi ikatan sulfida dari enzim tersebut. Enzim polifenol oksidase termasuk enzim nuklease yang dapat mendegradasi rantai DNA dan dapat menyebabkan teroksidasinya senyawa polifenol yang ditandai dengan warna coklat pada jaringan tanaman yang akan diekstrak (Warino,

2012). NaCl pada konsentrasi tinggi berfungsi untuk mengatasi keberadaan polisakarida pada konsentrasi yang tinggi (Harahap, 2014).

Buffer ekstraksi DNA umumnya diaplikasikan pada metoda ekstraksi DNA dengan menggunakan nitrogen cair dan dikombinasikan dengan penggunaan beberapa bahan berbahaya lain seperti phenol, untuk mendapatkan DNA dengan kualitas yang baik dan kuantitas yang cukup. Formulasi buffer ekstraksi DNA yang digunakan dalam invensi ini, dapat diaplikasikan pada metode ekstraksi DNA tanpa bergantung pada penggunaan nitrogen cair (nitrogen cair sulit didapatkan pada daerah-daerah tertentu, harga dan peralatan yang dibutuhkan untuk menyimpannya juga relatif mahal) dan phenol (penggunaan phenol harus berhati-hati karena berbahaya untuk kesehatan jika tidak digunakan di dalam fumehood (lemari asam), yang belum tentu tersedia pada laboratorium-laboratorium sederhana).

Buffer ekstraksi DNA yang diinvensi saat ini dapat menghasilkan DNA dengan kualitas yang baik dan kuantitas yang lebih dari cukup untuk tanaman-tanaman yang mengandung polyphenol dan metabolit sekunder tinggi.

Uraian Singkat Invensi

Invensi yang diusulkan ini pada prinsipnya adalah komposisi dan konsentrasi buffer ekstraksi DNA untuk tanaman yang mengandung polyphenol dan metabolit sekunder tinggi pada metode ekstraksi tanpa menggunakan nitrogen cair dan phenol. Komposisi buffer ekstraksi DNA berbasis CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) dengan kombinasi konsentrasi *Polyvinylpyrrolidone* (PVP) 2%, 4%, 6%; β-

Mercaptoethanol 0,2%, 2%, 4%; dan *Natriumchloride* (NaCl) 1,5 M, 3 M, 4,5 M digunakan dalam buffer ekstraksi DNA tanaman durian. Kombinasi buffer ekstraksi DNA berbasis CTAB yang mengandung 4% PVP + 2% β-Mercaptoethanol + 1,5 M NaCl, memberikan hasil yang terbaik terhadap kuantitas dan kualitas dari DNA yang dihasilkan, baik pada daun segar maupun daun yang sudah dipreservasi dari tanaman durian.

Uraian Lengkap Invensi

Sebagaimana yang telah dikemukakan pada latar belakang invensi bahwa isolasi DNA tanaman tahunan yang mempunyai kandungan metabolit sekunder dan polisakarida tinggi seperti daun durian secara konvensional sangat jarang dilakukan. Pada umumnya isolasi DNA pada tanaman tahunan dilakukan dengan menggunakan kit, namun kelemahan dari kit adalah karena biaya yang mahal. Isolasi DNA dari tanaman tahunan biasanya terganggu oleh kontaminasi metabolit sekunder dan polisakarida yang terlalu banyak, sehingga sering menjadi kendala terutama dalam mendapatkan DNA yang murni.

Biasanya isolasi DNA tanaman tahunan juga dilakukan dengan menggunakan nitrogen cair dan phenol. Penggunaan nitrogen cair untuk membantu menghancurkan jaringan (Syafaruddin et al., 2011). Penggunaan nitrogen cair akan menimbulkan masalah bila lokasi penelitian jauh dari pusat industri sehingga sulit mendapatkan nitrogen cair. Dengan demikian akan berdampak pada peningkatan biaya dan waktu yang diperlukan akan lebih lama. Phenol merupakan bahan kimia toksik yang penggunaannya harus dilakukan didalam lemari asam (Fume Hood). Hal ini akan menimbulkan masalah

jika laboratorium tidak dilengkapi dengan lemari asam (Fume Hood) (Ardiana, 2009).

Dalam invensi ini telah ditemukan metode isolasi DNA dari daun durian secara konvensional yang tidak menggunakan nitrogen cair dan phenol tetapi tetap dapat menghasilkan DNA dengan kuantitas dan kualitas yang baik, yaitu dengan cara memodifikasi berbagai konsentrasi PVP, β-Mercaptoethanol dan NaCl pada buffer isolasi berbasis CTAB.

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan sampel daun durian yang telah dipreservasi selama ± satu tahun. Sampel tersebut dikeluarkan dari freezer dan ditimbang sebanyak 0,1 g tanpa tulang daun. Buffer ekstraksi DNA yang digunakan adalah ekstraksi DNA berbasis CTAB dengan menggunakan 2% CTAB, 20 mM EDTA (*ethylenedinitrilotetraacetic acid*), 100 mM Tris-HCl (Tris Hydrochloride). Komposisi buffer CTAB terebut ditambah dengan kombinasi konsentrasi dari PVP 2%, 4%, 6%; β-Mercaptoethanol 0,2%, 2%, 4%; dan Natriumchloride (NaCl) 1,5 M, 3 M, 4,5 M (27 kombinasi perlakuan).

Tahapan pembuatan buffer ekstraksi dimulai dengan melarutkan CTAB, EDTA, Tris-HCl, PVP dan NaCl sesuai dengan kombinasi perlakuan konsentrasi PVP, β-Mercaptoethanol dan NaCl ke dalam 70 ml aquadest dan diaduk menggunakan spatula kaca kemudian ditambahkan kembali aquades hingga larutan mencapai 100 ml. Larutan diaduk kembali sampai merata. β-Mercaptoethanol ditambahkan sebelum buffer isolasi digunakan.

Protokol yang digunakan untuk isolasi DNA adalah modifikasi prosedur isolasi yang dikembangkan oleh Doyle dan Doyle (1987). Sampel daun durian yang telah ditimbang

diletakkan dalam mortar dan pestel steril kemudian ditambah 600 µl buffer ekstraksi yang telah diinkubasi dalam water bath bersuhu 65°C selama 15 menit kemudian digerus dengan mortar dan pestel steril sampai daun lumat. Daun sampel yang telah lumat dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml, kemudian ditambahkan kembali buffer isolasi CTAB sebanyak 400 µl dan divortex selama 2-3 menit.

Tahapan selanjutnya dilakukan inkubasi sampel dalam water bath bersuhu 65°C selama 15 menit sambil tabung dibolak-balik setiap 5 menit. Tahapan ini dilakukan untuk mengoptimalkan kerja buffer isolasi yang ditambahkan ke dalam sampel. Sampel kemudian divortex selama 2-3 menit, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 25°C. Tujuannya untuk memisahkan debris dan komponen sel lain yang menjadi penyebab kontaminasi dengan DNA.

Supernatan yang telah diperoleh kemudian diambil dan ditambahkan dengan dua kali volume larutan chloroform:isolamyl alcohol dengan perbandingan 24:1. Penambahan chloroform:isolamyl alcohol ini dilakukan untuk mengekstraksi DNA dari kontaminan. Chloroform merupakan pelarut organik yang dapat melarutkan protein, lipid dan molekul lain seperti polisakarida, sehingga diharapkan akan diperoleh supernatan berisi DNA yang bebas kontaminan. Suspensi kemudian divortex sampai rata untuk optimalisasi homogenasi.

Selanjutnya suspensi disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 25°C selama 15 menit. Supernatan pada lapisan paling atas diambil dan ditambahkan dengan 2/3 x volume larutan isopropanol dingin untuk presipitasi DNA.

Supernatan yang telah ditambahkan isopropanol kemudian digoyang perlahan-lahan dengan cara membolak-balikkan tabung. Untuk mengendapkan DNA (pelet DNA), larutan disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit.

Endapan DNA dicuci dengan 70% ethanol sebanyak 500 µL, kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm dengan suhu 4°C, kemudian cairan ethanol dibuang dan pelet DNA dikeringanginkan, lalu dilarutkan dalam 50 µL buffer TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,5) dan ditambahkan 1 µL RNAse (10 mg/mL). Kemudian DNA disimpan dalam refrigerator sampai uji kuantitatif dan kualitatif dilakukan.

Berdasarkan keberadaan dan warna pelet (endapan) DNA diperoleh beberapa kombinasi perlakuan buffer ekstraksi DNA yang berhasil membentuk pelet DNA yang berwarna putih. Taraf konsentrasi PVP 2%, 4% dan 6% tidak berpengaruh terhadap keberadaaan dan warna pelet DNA. Hal ini dapat dilihat dari adanya pelet DNA pada masing-masing taraf konsentrasi PVP. Semua taraf konsentrasi PVP juga dapat memberikan hasil pelet DNA berwarna putih. Sedangkan konsentrasi β-Mercaptoethanol berpengaruh signifikan terhadap keberadaan dan warna pelet DNA, terutama terhadap warna pelet DNA. Pada konsentrasi β-Mercaptoethanol 0,2% rata-rata menghasilkan pelet DNA berwarna coklat, sedangkan pada konsentrasi 2% dan 4% menghasilkan pelet DNA berwarna putih. Demikian juga dengan konsentrasi NaCl mempunyai pengaruh signifikan terhadap keberadaan dan warna pelet DNA. Konsentrasi NaCl 1,5 M menghasilkan pelet DNA terbaik dibandingkan konsentrasi NaCl lainnya.

Rata-rata konsentrasi DNA yang diperoleh dalam penelitian ini berkisar antara 12,5-1506,39 ng/µl berdasarkan hasil pengujian kuantitas DNA yang dilakukan dengan menggunakan NanoDrop spektrofotometer. Terdapat dua kombinasi buffer ekstraksi yang menghasilkan rata-rata kuantitas DNA diatas 500 ng/µl, yaitu kombinasi buffer b13 dan b14 (4% PVP + 2% β-Mercaptoethanol + 1,5 M NaCl), b14 (4% PVP + 2% β-Mercaptoethanol + 3 M NaCl). Konsentrasi DNA ini termasuk dalam kategori sangat tinggi, karena menurut Pharmawati (2009) konsentrasi DNA yang kecil (10 ng/µl) telah cukup dan memberikan hasil yang baik untuk analisis amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR-RAPD pada tumbuhan Grevillea.

Berdasarkan hasil pengujian kualitas DNA dengan menggunakan gel elektroforesis 1%, perlakuan yang menghasilkan pita DNA utuh dan jelas (diskrit) dengan tidak adanya smear yaitu perlakuan b4 (2% PVP + 2% β-Mercaptoethanol + 1,5 M NaCl), b13 (4% PVP + 2% β-Mercaptoethanol + 1,5 M NaCl), b14 (4% PVP + 2% β-Mercaptoethanol + 3 M NaCl), b19 (6% PVP + 0,2% β-Mercaptoethanol + 1,5 M NaCl) dan b25 (6% PVP + 4% β-Mercaptoethanol + 1,5 M NaCl).

Hasil pengujian kualitas DNA dengan menggunakan NanoDrop spektrofotometer untuk menguji tingkat kemurnian DNA, nilai rasio λ 260/280 yang menunjukkan DNA murni (berkisar antara 1,8-2,0) adalah pada perlakuan b13 (4% PVP + 2% β-Mercaptoethanol + 1,5 M NaCl) yaitu 1,809.

Keberhasilan isolasi DNA ditunjukkan oleh nilai konsentrasi DNA yang tinggi dan murni, nilai kemurnian DNA yang baik berkisar antara 1,8-2,0 dan hasil gel

elektroforesis menghasilkan profil DNA yang utuh dan jelas (diskrit) dengan tidak adanya smear. Kombinasi buffer b13, yaitu buffer ekstraksi CTAB yang mengandung 4% PVP + 2% β-Mercaptoethanol + 1,5 M NaCl merupakan kombinasi buffer ekstraksi yang terbaik dari uji kuantitas dan kualitas DNA dan memenuhi semua unsur keberhasilan dalam proses ekstraksi DNA.

Penggunaan buffer ini dalam proses ekstraksi DNA dari daun tanaman durian berhasil mengatasi kendala didalam proses ektraksi DNA pada tanaman durian yang mengandung polifenol, polisakarida dan metabolit sekunder yang tinggi. Menurut Wilkins dan Smarts (1996) dalam Warino (2012), keberadaan polisakarida yang cukup tinggi didalam tanaman akan mempersulit proses ekstraksi DNA dan mengakibatkan kekentalan supernatan yang dihasilkan. Daun durian merupakan jaringan aktif fotosintesis yang mengandung senyawa polifenol, ketika proses penggerusan, senyawa ini berinteraksi secara ireversibel dengan protein dan asam nukleat sehingga membentuk lendir (gelatinous matrix). Lendir ini yang menghambat proses PCR, jika tidak dihilangkan.

Isolasi DNA merupakan langkah awal dalam penelitian molekular, karena pada penelitian molekular hal yang paling penting adalah ketersediaan sampel DNA dengan kuantitas dan kualitas yang baik. Ketersediaan sampel DNA dengan kuantitas dan kualitas yang baik dapat digunakan untuk aplikasi DNA ke proses selanjutnya seperti PCR (Polymerase Chain Reaction), sequencing, cloning, digesti, analisis keragamanan genetik, DNA barcoding, DNA rekombinan dan lain-lain.

Hasil pengujian efektifitas buffer ekstraksi ini dalam menghasilkan DNA dengan kuantitas dan kualitas yang baik divalidasi dengan mengamplifikasi fragmen DNA menggunakan PCR. Hasil amplifikasi DNA menggunakan primer *rbcl* menunjukkan keberhasilan proses amplifikasi DNA dengan adanya amplicon yang diskrit dan jelas setelah dieletroforesis.

Efektivitas buffer ini juga telah diujikan pada daun segar tanaman durian, sirsak dan cempedak. Hasilnya menunjukkan keberhasilan proses ekstraksi mendapatkan DNA dengan kuantitas dan kualitas yang baik, yang diamati dari keberhasilan proses amplifikasi fragmen DNA dengan menggunakan primer *rbcl*.

Klaim

1. Metode isolasi DNA dari daun durian secara konvensional yang tidak menggunakan nitrogen cair dan phenol tetapi tetap dapat menghasilkan DNA dengan kuantitas dan kualitas yang baik, yaitu dengan cara:
   a. memodifikasi berbagai konsentrasi PVP, β-Mercaptoethanol dan NaCl pada buffer isolasi berbasis CTAB dimana ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan sampel daun durian yang telah dipreservasi selama ± satu tahun, yang mana selanjutnya sampel tersebut dikeluarkan dari freezer dan ditimbang sebanyak 0,1 g tanpa tulang daun, dan buffer ekstraksi DNA yang digunakan adalah ekstraksi DNA berbasis CTAB dengan menggunakan 2% CTAB, 20 mM EDTA (*ethylenedinitrilotetraacetic acid*), 100 mM Tris-HCl (Tris Hydrochloride), dimana komposisi buffer CTAB terebut ditambah dengan kombinasi konsentrasi dari PVP 2%, 4%, 6%; β-Mercaptoethanol 0,2%, 2%, 4%; dan Natriumchloride (NaCl) 1,5 M, 3 M, 4,5 M (27 kombinasi perlakuan),
   b. pembuatan buffer ekstraksi dimulai dengan melarutkan CTAB, EDTA, Tris-HCl, PVP dan NaCl sesuai dengan kombinasi perlakuan konsentrasi PVP, β-Mercaptoethanol dan NaCl ke dalam 70 ml aquadest dan diaduk menggunakan spatula kaca kemudian ditambahkan kembali aquades hingga larutan mencapai 100 ml, larutan diaduk kembali sampai merata. β-Mercaptoethanol ditambahkan sebelum buffer isolasi digunakan,

c. protokol yang digunakan untuk isolasi DNA adalah sampel daun durian yang telah ditimbang diletakkan dalam mortar dan pestel steril kemudian ditambah 600 µl buffer ekstraksi yang telah diinkubasi dalam water bath bersuhu 65°C selama 15 menit kemudian digerus dengan mortar dan pestel steril sampai daun lumat, daun sampel yang telah lumat dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml, kemudian ditambahkan kembali buffer isolasi CTAB sebanyak 400 µl dan divortex selama 2-3 menit,

d. inkubasi sampel dalam water bath bersuhu 65°C selama 15 menit sambil tabung dibolak-balik setiap 5 menit, ini dilakukan untuk mengoptimalkan kerja buffer isolasi yang ditambahkan ke dalam sampel, sampel kemudian divortex selama 2-3 menit, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 25°C, untuk memisahkan debris dan komponen sel lain yang menjadi penyebab kontaminasi dengan DNA, dimana supernatan yang telah diperoleh kemudian diambil dan ditambahkan dengan dua kali volume larutan chloroform:isolamyl alcohol dengan perbandingan 24:1, dimana penambahan chloroform:isolamyl alcohol ini dilakukan untuk mengekstraksi DNA dari kontaminan, Chloroform merupakan pelarut organik yang dapat melarutkan protein, lipid dan molekul lain seperti polisakarida, sehingga diharapkan akan diperoleh supernatan berisi DNA yang bebas kontaminan, suspensi kemudian divortex sampai rata untuk optimalisasi homogenasi,selanjutnya suspensi disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 25°C selama 15 menit, supernatan pada lapisan paling atas diambil dan

ditambahkan dengan 2/3 x volume larutan isopropanol dingin untuk presipitasi DNA. Supernatan yang telah ditambahkan isopropanol kemudian digoyang perlahan-lahan dengan cara membolak-balikkan tabung dan untuk mengendapkan DNA (pelet DNA), larutan disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit,

e. endapan DNA dicuci dengan 70% ethanol sebanyak 500 µL, kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm dengan suhu 4°C, kemudian cairan ethanol dibuang dan pelet DNA dikeringanginkan, lalu dilarutkan dalam 50 µL buffer TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,5) dan ditambahkan 1 µL RNAse (10 mg/mL), kemudian DNA disimpan dalam refrigerator sampai uji kuantitatif dan kualitatif dilakukan.

Abstrak

KOMPOSISI BUFFER EKSTRAKSI DNA UNTUK TANAMAN YANG MENGANDUNG POLYPHENOL DAN METABOLIT SEKUNDER TINGGI PADA METODE EKSTRAKSI TANPA MENGGUNAKAN NITROGEN CAIR DAN PHENOL

Invensi ini berhubungan dengan komposisi dan konsentrasi buffer ekstraksi DNA untuk tanaman yang mengandung polyphenol dan metabolit sekunder tinggi pada metode ekstraksi tanpa menggunakan nitrogen cair dan phenol. Komposisi buffer ekstraksi DNA berbasis CTAB yang mengandung 4% PVP + 2% β-Mercaptoethanol + 1,5 M NaCl, memberikan hasil yang terbaik terhadap kuantitas dan kualitas dari DNA yang dihasilkan. Pelet DNA yang yang dihasilan jelas dan cukup besar serta berwarna putih, menghasilkan pita DNA utuh dan jelas (diskrit) dengan tidak adanya smear, menghasilkan rata-rata konsentrasi DNA yang sangat tinggi, yaitu 843,91 ng/µl dan kemurnian DNA yang baik dengan nilai rasio λ 260/280 sebesat 1,809. Validasi pengujian kualitas DNA yang ditunjukkan melalui keberhasilan amplifikasi fragmen DNA menggunakan primer *rbcl* dan didapatkan amplicon yang diskrit dan jelas. Hasil pengujian efektivitas buffer ekstraksi pada daun segar tanaman durian, sirsak dan cempedak menunjukkan keberhasilan didapatkannya DNA dengan kuantitas dan kualitas yang baik, dan juga berhasil diamplifikasi dengan baik.