

## **BAB III**

### **TATA KERJA**

#### **3.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah tabung mikrosentrifugasi, vortex (*Thermo scientific*), Nano Drop (*Thermo scientific*), sentrifugator, Qubit fluorescence 2.0 (*Invitrogen*), alat elektroforesis gel (*BioRAD*), inkubator (*Thermo scientific*), mikropipet (*Thermo scientific*), Erlenmeyer, dan alat Spektrofotometer UV-Visibel (*Shimadzu UV 1800*).

#### **3.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur *Hansenula polymorpha*, isopropanol, etanol 70%, *yeast lysis solution* (*Masterpure Epicentre*), *RNase solution* (*Masterpure Epicentre*), *protein precipitation reagent* (*Masterpure Epicentre*) dan larutan penyangga TE (Tris-Cl dan EDTA dari *Qiagen*).

#### **3.3 Metode Penelitian**

Metode penelitian meliputi proses isolasi DNA genom *Hansenula polymorpha*, pengujian kemurnian dan konsentrasi hasil isolasi genom.

##### **3.3.1 Pembuatan variasi OD *Hansenula polymorpha***

Kultur *Hansenula polymorpha* divariasikan menjadi OD 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 dan di cek menggunakan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang 600 nm dengan pembawa akuades.

##### **3.3.2 Isolasi Genom *Hansenula polymorpha***

Sebanyak 1,5 mL kultur ragi *Hansenula polymorpha* disentrifugasi selama 5 menit pada 13.000 rpm, media pertumbuhan dibuang dan didapatkan pelet ragi. Sebanyak 300  $\mu$ L *Yeast cell lysis solution* dan 1  $\mu$ L RNase dimasukkan ke dalam pelet dan dihomogenkan. Suspensi ragi kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu 65<sup>0</sup>C dan 0<sup>0</sup>C selama 5 menit. Sebanyak 150  $\mu$ L *reagen protein precipitation* dimasukkan ke dalam

suspensi, dihomogenkan dan disentrifugasi selama 10 menit pada 10.000 rpm.

Sebanyak 500  $\mu$ l isopropanol dimasukkan ke dalam supernatan yang sudah dipindahkan dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit dan didapatkan pelet DNA. Supernatan yang terdapat pada pelet DNA dibuang, kemudian pelet dibilas dengan etanol 70% dan etanol dibuang sampai benar-benar hilang. Pelet DNA disuspensikan dengan 35  $\mu$ L larutan penyangga TE.

### 3.3.3 Pengujian *stabilitas seed*

#### 1. Elektrophoresis Gel

Gel agarosa dengan konsentrasi 1% dibuat dengan pelarut penyangga TAE sebanyak 35. Larutan gel agarose didinginkan sampai agak hangat kemudian dimasukkan 3  $\mu$ L syber safe dan dituang ke dalam cetakkan serta dibiarkan mengeras. *DNA ladder* disiapkan dengan menghomogenkan 3  $\mu$ L *DNA ladder* Invitrogen 1kb dan 1  $\mu$ L *loading dye* Promega. Sampel disiapkan dengan menghomogenkan 3  $\mu$ L sampel dengan 1  $\mu$ L *loading dye* Promega. Alat elektroforesis gel disiapkan. *DNA ladder* dan sampel kemudian dimasukkan ke dalam gel yang sudah mengeras dan diatur waktu 75 menit pada tegangan 50 volt.

#### 2. Nano Drop

Blanko yang digunakan berupa akuades steril atau pelarut. Rentang kemurnian berada pada kisaran 1,8-2. Untuk proses pengukuran sampel, alat dibersihkan terlebih dahulu dengan 2  $\mu$ L akuades sebanyak 2 kali.

#### 3. Qubit DNA

Larutan kerja disiapkan dengan menghomogenkan 1 bagian reagen qubit dan 199 bagian larutan penyangga (untuk 1 sampel). Larutan standar disiapkan dengan menghomogenkan 10  $\mu$ L larutan standar dengan 190  $\mu$ L larutan kerja. Sampel disiapkan dengan menghomogenkan 10  $\mu$ L sampel dengan 190  $\mu$ L larutan kerja. Alat Qubit fluorometer 2.0 disiapkan,

dikalibrasi dengan larutan standar kemudian dipilih menu uji DNA pada *display*. Larutan sampel dimasukkan dan dicatat konsentrasinya.