

BAB III

TATA KERJA

3.1 Alat

Alat-alat yang di gunakan dalam penelitian ini antara lain adalah vortex (*Thermo*[®]), *water bath* (*AccuTherm*[®]), sentrifugasi (*Hettich*[®]), elektroforesis *chamber*, *Refrigerator* (*Polytron*[®]), nanodrop (*Thermo*[®]), qubit (*Thermo*[®]), mikropipet (*Watson*[®]), *incubator*, *microtube* 1,5 ml.

3.2 Bahan

Bahan-bahan yang di gunakan pada penelitian ini adalah kultur *Salmonella typhi*, isopropanol, etanol 70%, *Wizard Genomic DNA Purification kit* (*nuclei lysis solution*, *RNAse solution*, *protein precipitation solution*, *DNA rehydration solution*), *aquadest*, *powder* agarosa, larutan standar qubit, (*Tris – EDTA*) *TE Buffer* 1x, *loading dye*, *cybersafe*, *tip micropipet*, *DNA ladder*.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian meliputi proses isolasi DNA genom *Salmonella typhi* dan pengujian kualitatif & kuantitatif.

3.3.1 Isolasi DNA Salmonella typhi

Kultur bakteri *Salmonella typhi* dengan varian *Optical density* (OD) sebesar 0,75; 1,5; dan 3 masing – masing dimasukkan ke dalam *microtube* sebanyak 1 ml. Kemudian, kultur disentrifugasi selama 2 menit (kecepatan 13.000 – 16.000 rpm). Supernatan dibuang dan hasil endapan ditambahkan 600 µl larutan *nuclei lysis* secara perlahan. Kemudian, larutan diinkubasi 80°C selama 5 menit. Larutan didinginkan di suhu ruangan. Kemudian, larutan ditambahkan 3 µl *Rnase solution*, dicampurkan dengan membolak-balikkan 3 – 5 kali dan diinkubasi 37°C selama 15 – 60 menit. Kemudian, larutan didinginkan dalam suhu ruangan. Kemudian, larutan ditambahkan 200 µl *protein precipitation solution* yang dihomogenkan dengan menggunakan vortex kecepatan tinggi selama 20 detik kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit. Kemudian, larutan disentrifugasi

selama 3 menit (kecepatan 13.000 – 16.000 rpm). Lalu, supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* yang berisi 600 µl isopropanol dan dicampurkan secara perlahan sampai terlihat untaian DNA. Kemudian, larutan disentrifugasi selama 2 menit (kecepatan 13.000 – 16.000 rpm). Supernatan dibuang dan dikeringkan *tube* pada kertas penyerap. DNA pelet ditambahkan 600 µl ethanol 70%, dicampurkan dengan membolak – balikkan secara perlahan. Campuran disentrifugasi selama 2 menit (kecepatan 13.000 – 16.000 rpm). pelet DNA dibiarkan di udara kering selama 10 – 15 menit. Pelet ditambahkan 100 µl DNA *Rehydration solution* dan dilakukan inkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam atau rehidrasi DNA dengan diinkubasi semalaman pada suhu ruangan atau 4°C. DNA disimpan pada suhu 2-8°C.

3.3.2 Pengujian kualitatif dan kuantitatif

a. Uji kualitatif elektroforesis gel agarosa

Pembuatan gel agarose (1%): agarosa serbuk ditimbang sebanyak 35 mg dalam 350 ml TE *buffer* 1x kemudian dipanaskan pada *microwave* hingga mendidih dan larut sempurna. Setelah mendidih, gel didinginkan hingga suhu $\pm 55^{\circ}\text{C}$ lalu Ethidium bromida (EtBr) ditambahkan sebanyak 1 µl dan dihomogenkan. Gel dimasukkan ke dalam cetakan yang telah disisipkan sisir elektroforesis dibagian sisi-sisinya. Gel dibiarkan membeku (\pm selama 30 menit). DNA *ladder* dimasukkan kedalam sumuran gel pertama sebagai pembanding. Kemudian, sampel dimasukkan kedalam sumuran berikutnya lalu alat elektroforesis dijalankan pada tegangan 50 volt selama 75 menit.

b. Uji kuantitatif qubit

Tabung standar 1 dimasukkan ke dalam qubit fluorometri. pembacaan dilakukan selama 3 detik. Kemudian, standar 1 dipindahkan dan standar 2 dimasukkan ke alat. pembacaan dilakukan. Kemudian, tabung sampel dimasukkan kedalam qubit fluorometri dan dilakukan pembacaan.

c. Uji kuantitatif NanoDrop

Aquadest dimasukkan ke dalam wadah sampel sebagai blanko. Kemudian wadah dibersihkan dan sampel dimasukkan kedalam wadah sampel dan dilakukan pembacaan. Standar kemurnian DNA memasuki *range* 1,8 – 2,0.