

DAFTAR ISI

LEMBAR JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 β -glukanase	5
2.1.1 β -1,3-glukanase	5
2.2 Kloning Gen	6
2.3 Sistem Ekspresi di Eukariot	8
2.3.1 Sel Inang <i>Pichia pastoris</i>	9

2.3.2 Beberapa <i>Strain Pichia pastoris</i> untuk Ekspresi	11
2.3.3 Vektor pPICZ α	11
2.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	13
BAB III METODE PENELITIAN	16
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.2 Sampel, Alat, dan Bahan Penelitian	16
3.2.1 Sampel Penelitian	16
3.2.2 Alat-alat Penelitian	16
3.2.3 Bahan-bahan Penelitian	16
3.3 Diagram Alir Penelitian.....	18
3.4 Prosedur Penelitian.....	19
3.4.1 Kultivasi <i>E. coli</i> BM 25.8 rekombinan.....	19
3.4.2 Isolasi plasmid rekombinan pTriplEx2- <i>MKAFGluI</i> dari <i>E. coli</i> BM 25.8 rekombinan pTriplEx2- <i>MKAFGluI</i>	19
3.4.3 Elektroforesis agarosa.....	20
3.4.4 Desain primer.....	20
3.4.5 Amplifikasi gen <i>MKAFGluI</i> dengan PCR dan pemurniannya.....	20
3.4.6 Konstruksi plasmid pPICZ α A- <i>MKAFGluI</i> dan transformasi ke <i>E. coli</i> TOP10.....	22
3.4.6.1 Preparasi <i>E. coli</i> TOP10 kompeten.....	22
3.4.6.2 Restriksi dan pemurnian plasmid pPICZ α A	22
3.4.6.3 Restriksi dan pemurnian gen <i>MKAFGluI</i>	23
3.4.6.4 Ligasi plasmid pPICZ α A dengan gen <i>MKAFGluI</i>	23
3.4.6.6 Analisis transforman dan isolasi plasmid rekombinan pPICZ α A- <i>MKAFGluI</i>	24

3.4.7 Transformasi plasmid rekombinan pPICZ α A-MKAFGlu1 ke <i>P. pastoris</i> X-33	25
3.4.7.1 Linierisasi plasmid rekombinan pPICZ α A-MKAFGlu1.....	25
3.4.7.2 Pembuatan sel kompeten <i>P. pastoris</i>	25
3.4.7.3 Transformasi ke <i>P. pastoris</i> X-33 kompeten.....	26
3.4.8 Penentuan fenotip dari Mut pada X-33.....	26
3.4.9 Ekspresi MKAF-Glu1	27
3.4.10 Uji aktivitas enzim MKAFGlu1	27
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1 Kultivasi <i>E. coli</i> BM 25.8 Rekombinan	28
4.2 Isolasi Plasmid Rekombinan pTriplEx2-MKAFGlu1.....	28
4.3 Amplifikasi Gen MKAFGlu1 dengan PCR	31
4.4 Konstruksi Plasmid pPICZ α A-MKAFGlu1	33
4.4.1 Restriksi dan pemurnian plasmid pPICZ α A	33
4.4.2 Pemurnian dan restriksi gen MKAFGlu1.....	34
4.4.3 Ligasi plasmid pPICZ α A dan gen MKAFGlu1.....	35
4.5 Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> TOP10	36
4.5.1 Preparasi <i>E. coli</i> TOP10 kompeten.....	36
4.5.2 Transformasi pPICZ α A-MKAFGlu1 ke <i>E. coli</i> TOP10 kompeten.....	37
4.5.3 Analisis transforman.....	38
4.6 Isolasi Plasmid Rekombinan pPICZ α A-MKAFGlu1 dari <i>E. coli</i> TOP10 ...	39
4.7 Transformasi plasmid rekombinan pPICZ α A-MKAFGlu1 ke <i>Pichia pastoris</i> X-33.....	41
4.7.1 Preparasi <i>Pichia pastoris</i> X-33 kompeten	41
4.7.2 Transformasi pPICZ α A-MKAFGlu1 ke <i>P. pastoris</i> X-33 kompeten ...	42

4.8 Ekspresi <i>MKAFGlu1</i> pada <i>P. pastoris</i> X-33	44
4.8.1 Penentuan fenotip dari <i>P. pastoris</i> X-33 rekombinan pPICZ α A- <i>MKAFGlu1</i>	44
4.8.2 Ekspresi <i>MKAFGlu1</i> dan Uji aktivitas	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1 Kesimpulan.....	48
5.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	