

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN TESIS	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
INTISARI	xvii
ABSTRACT	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Penelitian	1
B. Perumusan Masalah.....	4
C. Keaslian Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian.....	6
E. Tujuan Penelitian.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
A. Telaah Pustaka.....	8
1. Sefalosporin C	8
2. Biokonversi Sefalosporin C Menjadi 7-ACA.....	9
3. Sefalosporin C Asilase (CCA).....	12
4. Kloning Molekuler, Vektor dan Metode Kloning	17
5. Plasmid pET28b	19
6. Penggunaan <i>Escherichia coli</i> DH5α Sebagai Inang Kloning.....	20
7. Ekspresi Protein Rekombinan dalam Sel Inang <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	21
8. Badan Inklusi, <i>Chaperone</i> dan Osmolit	24
9. Faktor-Faktor Lain yang Mempengaruhi Aktivitas Sefalosporin C Asilase (CCA).....	26
B. Landasan Teori atau Dasar Pemikiran Teoritis	30
C. Kerangka Konsep	33

D.	Hipotesis atau Keterangan Empiris	34
BAB III METODE PENELITIAN		35
A.	Desain Penelitian	35
B.	Bahan, Subyek atau Materi Penelitian.....	37
1.	Alat	37
2.	Bahan	37
C.	Identifikasi Variabel Penelitian	39
D.	Definisi Operasional Variabel	40
1.	Variabel Bebas.....	40
A.	Induser.....	40
B.	Konsentrasi Osmolit Glisin-Betain	40
2.	Variabel Tergantung.....	41
A.	Konsentrasi Protein	41
B.	Hasil Pemisahan Protein dengan SDS-PAGE.....	41
C.	Aktivitas CCA _{S12-A675G}	41
3.	Variabel Terkendali	41
A.	Gen pET28b-CCAs12-A675G.....	42
B.	Vektor.....	42
C.	Sel Inang	43
D.	Media Fermentasi.....	43
E.	Kondisi Kultur.....	43
E.	Instrumen Penelitian.....	43
F.	Cara Kerja Penelitian	44
1.	Desain Sekuens CAs12-A675G	44
2.	Desain Primer	45
3.	Transformasi Plasmid Rekombinan pET28b-CCAs12-A675G dalam <i>E. coli</i> DH5α	48
A.	Pembuatan Larutan Stok Plasmid Rekombinan.....	48
B.	Pembuatan Sel Kompeten <i>E. coli</i> DH5α.....	49
C.	Transformasi	50
4.	Isolasi Klon Plasmid Rekombinan pET28b-CCAs12-A675G	50
5.	Pemotongan Plasmid dengan Enzim Restriksi XhoI dan NdeI	52
6.	Amplifikasi DNA Isolat Plasmid Rekombinan pET28b- CCAs12-A675G Menggunakan PCR.....	52
7.	Sekuensing DNA Produk PCR.....	53

8.	Transformasi Klon Plasmid Rekombinan pET28b-CCAs12-A675G dalam <i>E. coli</i> BL21(DE3)	55
9.	Fermentasi	55
	A. Pembuatan Stok Gliserol.....	55
	B. Inokulasi Stok Gliserol ke Media Agar.....	56
	C. Pembuatan Inokulum/Pre-kultur	57
	D. Fermentasi Produksi CCAs12-A675G	57
10.	Isolasi Enzim CCAs12-A675G	57
	A. Isolasi Sel Hasil Fermentasi.....	58
	B. Isolasi CCAs12-A675G dengan Teknik Sonikasi	58
11.	Uji Aktivitas CCAs12-A675G	59
	A. Pembuatan Kurva Baku 7-ACA.....	59
	B. Pengukuran Aktivitas CCAs12-A675G	60
12.	Pengukuran Konsentrasi Protein (Metode <i>Bradford Assay</i>)	61
	A. Pembuatan Kurva Baku BSA.....	62
	B. Pengukuran Konsentrasi Protein Sampel.....	63
13.	SDS-PAGE	63
	A. Preparasi Sampel.....	64
	B. Membuat Gel Poliakrilamid.....	64
	C. Proses Pemisahan Protein dengan SDS-PAGE.....	65
	D. Pewarnaan Gel	65
G.	Analisis Data	66
	1. Analisis Hasil Kloning Plasmid Rekombinan pET28b-CCAs12-A675G Dalam <i>Escherichia coli</i> DH5α	66
	2. Efek Modifikasi Induser Terhadap Ekspresi Dan Aktivitas CCAs12-A675G	67
	3. Efek Suplementasi Osmolit Glisin-Betain Terhadap Ekspresi Dan Aktivitas CCAs12-A675G	67
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		69
A.	Hasil Optimasi Sekuens Gen Rekombinan Sintetik pET28b-CCAs12-A675G	69
B.	Desain Primer untuk Mengonfirmasi Kesesuaian Gen CCAs12-A675G	70
C.	Analisis Klon Plasmid Rekombinan pET28b-CCAs12-A675G dalam Inang Kloning <i>Escherichia coli</i> DH5α	74

1.	Transformasi dan Skrining Klon yang Positif Membawa Vektor	74
2.	Skrining Klon yang Positif Membawa <i>Construct</i>	76
3.	Konfirmasi Kesesuaian Urutan DNA Gen <i>CCAs12-A675G</i> pada Rekombinan Klon.....	78
4.	Isolasi DNA Klon Plasmid Rekombinan.....	81
5.	Pengecekan Enzim Restriksi	83
D.	Transformasi Klon Plasmid pET28b- <i>CCAs12-A675G</i> ke dalam Inang Ekspresi <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) dan Skrining Klon Positif.....	85
G.	Optimasi Ekspresi <i>CCAs12-A675G</i> dalam <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	88
1.	Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>Wild-type</i> dan Rekombinan.....	88
2.	Pengaruh Induser terhadap Aktivitas dan Ekspresi <i>CCAs12-A675G</i> . ..	89
3.	Pengaruh Suplementasi Osmolit Glisin-betain terhadap Aktivitas dan Ekspresi <i>CCAs12-A675G</i>	94
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		99
A.	Kesimpulan	99
B.	Saran	100
DAFTAR PUSTAKA		101
DAFTAR PUBLIKASI PENULIS TESIS		106
LAMPIRAN.....		116