

## DAFTAR ISI

SAMPUL DALAM.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI.....	iv
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
INTISARI .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang .....	1
B. Permasalahan .....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS.....	5
A. Tinjauan Pustaka.....	5
1. <i>Aspergillus niger</i> .....	5
2. Selulosa.....	6
3. Enzim Selulase.....	7
4. Etanol Selulosa.....	9
5. Kloning Gen.....	11
6. Komponen Kloning Gen.....	11
a. Gen target.....	12
b. Vektor.....	12
c. Enzim restriksi.....	14
d. Ligasi.....	14
e. Sel inang.....	15
7. Transformasi DNA pada Sel Inang.....	15
8. <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	16
9. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	17
10. Elektroforesis Gel Agarosa.....	19
B. Hipotesis.....	19
BAB III. METODE PENELITIAN.....	20
A. Tempat dan Waktu Penelitian.....	20
B. Alat dan Bahan Penelitian.....	20
C. Cara Kerja.....	21
1. Persiapan Isolat <i>Aspergillus niger</i> .....	21
2. Uji Kualitatif Aktivitas Selulolitik Isolat <i>Aspergillus niger</i> .....	21
	viii

3. Isolasi RNA <i>Aspergillus niger</i> .....	22
4. Visualisasi Hasil Isolasi RNA <i>Aspergillus niger</i> .....	23
5. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian RNA <i>Aspergillus niger</i> .....	24
6. Koleksi Data dan Perancangan Primer Gen <i>CBHA</i> .....	24
7. Sintesis cDNA dan Amplifikasi Gen <i>CBHA</i> dengan PCR.....	25
8. Purifikasi Gel Gen <i>CBHA</i> .....	26
9. Perbanyakkan Sel Kompeten <i>Escherichia coli</i> DH10B.....	27
10. Preparasi Plasmid pWYH257.....	27
a. Transformasi plasmid pWYH257 pada sel kompeten <i>Escherichia coli</i> DH10B.....	27
b. Purifikasi plasmid pWYH257.....	28
11. Penyisipan Gen <i>CBHA</i> pada Vektor Ekspresi <i>Yeast</i> (pWYH257).....	29
a. Pemotongan fragmen DNA dengan enzim restriksi.....	29
b. Purifikasi plasmid pWYH257 dan <i>insert CBHA</i> .....	30
c. Ligasi plasmid pWYH257 dan <i>insert CBHA</i> .....	31
12. Transformasi Plasmid Rekombinan pada Sel Kompeten <i>Escherichia coli</i> DH10B.....	31
13. Purifikasi Plasmid Rekombinan.....	32
14. Analisis Plasmid Rekombinan dengan Digesti Enzim <i>Pst</i> I dan <i>Spe</i> I.....	32
D. Analisis Data.....	32
1. Analisis Hasil Visualisasi dengan Metode Elektroforesis.....	33
2. Analisis Hasil Pengukuran RNA dan <i>Optical Density</i> (OD) Sel <i>Escherichia coli</i> DH10B dengan Metode Spektrofotometri.....	33
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
A. Uji Kualitatif Aktivitas Selulolitik Isolat <i>Aspergillus niger</i> .....	34
B. Isolasi RNA <i>Aspergillus niger</i> .....	35
C. Data Sekuens Gen <i>CBHA</i> dan Perancangan Primer.....	37
D. Amplifikasi Gen <i>CBHA</i> .....	40
E. Perbanyakkan Sel Kompeten <i>Escherichia coli</i> DH10B.....	41
F. Purifikasi Vektor Ekspresi <i>Yeast</i> (pWYH257).....	43
G. Penyisipan Gen <i>CBHA</i> pada Vektor Ekspresi <i>Yeast</i> (pWYH257).....	45
H. Transformasi Plasmid Rekombinan pada Sel Kompeten <i>Escherichia coli</i> DH10B.....	46
I. Visualisasi Hasil Purifikasi Plasmid Rekombinan.....	49
J. Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Digesti Enzim <i>Pst</i> I dan <i>Spe</i> I.....	50
BAB V. SIMPULAN DAN SARAN.....	52
A. Simpulan.....	52

B. Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	53
LAMPIRAN.....	59

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Struktur kimia selulosa.....	6
Gambar 2.	Mekanisme kerja enzim selulase.....	8
Gambar 3.	Proses produksi etanol selulosa.....	10
Gambar 4.	Penyisipan fragmen DNA ke dalam vektor plasmid.....	11
Gambar 5.	Struktur vektor plasmid (pRS425).....	13
Gambar 6.	Tipe enzim restriksi.....	14
Gambar 7.	Proses pembentukan cDNA dengan teknik RT-PCR.....	17
Gambar 8.	Proses PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	18
Gambar 9.	Zona jernih pada medium CMC.....	34
Gambar 10.	Hasil visulisasi RNA total.....	36
Gambar 11.	Sekuens gen <i>CBHA</i> yang diperoleh dari situs NCBI.....	37
Gambar 12.	Vektor ekspresi <i>yeast</i> (pWYH257).....	39
Gambar 13.	Situs restriksi pada gen <i>CBHA</i> .....	40
Gambar 14.	Hasil visualisasi gen <i>CBHA</i> setelah diamplifikasi dengan PCR.....	41
Gambar 15.	Pertumbuhan sel kompeten <i>Escherichia coli</i> DH10B pada medium LB agar.....	42
Gambar 16.	Hasil visualisasi plasmid pWYH257 setelah dipurifikasi.....	44
Gambar 17.	Sekuens fragmen DNA yang dipotong oleh enzim restriksi.	45
Gambar 18.	Hasil visualisasi pemotongan fragmen DNA oleh enzim <i>Pst</i> I.....	45
Gambar 19.	Pertumbuhan sel kompeten <i>Escherichia coli</i> DH10B pada medium LB-Ampisilin agar.....	47
Gambar 20.	Hasil visualisasi plasmid rekombinan.....	50
Gambar 21.	Hasil visualisasi digesti enzim plasmid rekombinan.....	51

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Komposisi pembuatan TBE 1X.....	23
Tabel 2.	Perancangan primer gen <i>CBHA</i> .....	24
Tabel 3.	Komposisi <i>MyTaq<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR Kit</i> .....	25
Tabel 4.	Protokol program <i>MyTaq<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR Kit</i> .....	25
Tabel 5.	Komponen pemotongan fragmen DNA dengan enzim <i>Pst</i> I.....	29
Tabel 6.	Komponen pemotongan fragmen DNA dengan enzim <i>Spe</i> I.....	30
Tabel 7.	Komponen reaksi ligasi.....	31
Tabel 8.	Konsentrasi dan kemurnian RNA hasil isolasi.....	36
Tabel 9.	Pasangan primer gen <i>CBHA</i> dari <i>Aspergillus niger</i> .....	38
Tabel 10.	Pertumbuhan sel kompeten <i>Escherichia coli</i> DH10B pada medium LB cair.....	42
Tabel 11.	<i>Optical Density</i> (OD) sel kompeten <i>Escherichia coli</i> DH10B.....	43
Tabel 12.	Pertumbuhan sel kompeten <i>Escherichia coli</i> DH10B yang mengandung plasmid rekombinan pWYH257- <i>CBHA</i> pada medium LB cair.....	48