

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PRAKATA.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	6
1.3. Tujuan.....	7
1.4. Manfaat.....	7
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. L-Aspartat dan Amonia.....	8
2.2. L-Asparaginase.....	9
2.3. <i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	12
2.4. Protein Rekombinan.....	13
2.4.1 Kloning Gen.....	13
2.4.2 Ekspresi Gen.....	16
2.5. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	17
2.6. Vektor.....	18
2.6.1. Plasmid pET28a(+)......	19
2.7. <i>Escherichia coli</i> DH5 α	21
2.8. <i>Escherichia coli</i> BL21 Star (DE3).....	22
2.9. Purifikasi Protein.....	25
2.9.1. Purifikasi Protein dengan Metode Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC).....	26
2.10. <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (SDS- Page).....	27
2.11. <i>Bicinchoninic Acid Protein Assay</i> (BCA Protein Assay) 29	29
III. METODE PENELITIAN.....	32
3.1. Tempat dan Waktu.....	32
3.2. Alat dan Bahan.....	32
3.2.1 Alat.....	32
3.2.2 Bahan.....	33
3.3. Metode Penelitian.....	35
3.4. Cara Kerja.....	35

3.4.1	Kloning Gen Ap-Asn dari genom bakteri <i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> dan Plasmid pET28a(+)	35
3.4.1.1	Isolasi Gen Ap-Asn dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	35
3.4.1.2	Isolasi dan Pemurnian Plasmid pET28a(+)	37
3.4.1.3	Digesti Plasmid pET28a(+)	40
3.4.1.4	Pemurnian Gen Asn dan Plasmid pET28a(+)	dari Gel Agarose . 41
3.4.1.5	Insersi Gen Asn pada Plasmid pET28a(+)	serta Transformasi Plasmid pET28a(+)
3.4.1.6	yang mengandung gen Asn ke Sel Kompeten BL21 Star (DE3)	43
3.4.1.6	Isolasi pET28a(+).ApL-Asn	44
3.4.1.7	Konfirmasi Hasil Kloning	46
3.4.2	Ekspresi Protein ApL-Asn Rekombinan	47
3.4.2.1	Pembuatan Sel Kompeten <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	47
3.4.2.2	Transformasi pET28a(+).ApL-Asn ke <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	48
3.4.2.3	Kultur Bakteri <i>Escherichia coli</i> BL21 dan Pemanenan Sel	49
3.4.2.4	Isolasi Protein dari Bakteri	50
3.4.3	Purifikasi Protein	51
3.4.3.1	Purifikasi Metode Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)	51
3.4.3.2	Dialisis	52
3.4.4	Pengujian Analisis Protein	53
3.4.4.1	Pengecekan ApL-Asn dengan SDS-Page	53
3.4.4.1.1	Pembuatan Gel SDS-Page	53
3.4.4.1.2	Running SDS-Page	55
3.4.4.1.3	Staining Gel SDS	56
3.4.4.2	Bicinchoninic Protein Assay (BCA Protein Assay)	56
3.5.	Diagram Alir	58
3.6.	Analisis Data	60
3.7.	Jadwal Penelitian	60
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	61
4.1	Kloning Gen Asn dari Genom Bakteri <i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> dan Plasmid pET28a(+)	61
4.1.1	Peremajaan Bakteri <i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	61
4.1.2	Isolasi Gen Asn dan Amplifikasi dengan <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	63
4.1.3	Digesti Plasmid pET28a(+)	72

4.1.4	Pemurnian Gen Asn dan Plasmid pET28a(+) dari Gel Agarose ...	77
4.1.5	Inseri Gen Asn pada Plasmid pET28a(+) serta Transformasi Plasmid pET28a(+) yang mengandung gen Asn ke Sel Kompeten BI21	79
4.1.6	Isolasi pET28a(+).ApL-Asn	83
4.1.7	Konfirmasi Hasil Kloning	88
4.2	Eksresi dan Purifikasi Protein ApL-Asn Rekombinan	90
4.2.1.	Transformasi ApL-Asn ke Sel Inang E. coli BL21 Star (DE3).....	90
4.2.2.	SDS-Page Kultur ApL-Asn dan Regulasi Operon lac pada Sistem Ekspresi E. coli	94
4.2.3.	Pencegahan Inclusion Body	98
4.2.4.	SDS-Page Hasil Purifikasi ApL-Asn dengan Metode IMAC	102
4.3	Pengujian Kadar Total ApL-Asn dengan Metode Bicinchoninic Protein Assay (BCA Protein Assay).....	108
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	112
5.1	Kesimpulan.....	112
5.2	Saran	113
	DAFTAR PUSTAKA	114
	UCAPAN TERIMA KASIH.....	138
	LAMPIRAN.....	139
	DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	145