

DAFTAR ISI

| | |
|---|-------------|
| HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN | iii |
| KATA PENGANTAR | iv |
| UCAPAN TERIMA KASIH..... | v |
| HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS | vii |
| ABSTRAK..... | viii |
| ABSTRACT | ix |
| DAFTAR TABEL..... | xi |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| BAB I: PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1. Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 2 |
| 1.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian..... | 2 |
| BAB II: TINJAUAN PUSTAKA | 3 |
| 2.1. Landasan Teori..... | 3 |
| 2.1.1. <i>Human Papilloma Virus (HPV)</i> | 3 |
| 2.1.2. Gen L1 HPV | 5 |
| 2.1.3. <i>Escherichia coli</i> | 6 |
| 2.1.4. <i>Pichia pastoris</i> | 8 |
| 2.1.5. Rekombinasi DNA..... | 9 |
| 2.1.5.1. Rekombinasi Homolog | 9 |
| 2.1.5.2. Metode transformasi | 10 |
| 2.1.5.3. Vektor Ekspresi..... | 11 |
| 2.1.5.4. Gen Multikopi (<i>Multivcopy gene</i>)..... | 13 |
| a. Konstruksi plasmid invitro..... | 13 |

| | |
|---|-----------|
| b. Seleksi antibiotik dengan konsentrasi tinggi..... | 14 |
| c. Seleksi antibiotik bertingkat (Posttransformational Vector Amplification) | 14 |
| 2.2 Hipotesis..... | 14 |
| BAB III METODOLOGI | 15 |
| 3.1. Kerangka Penelitian..... | 15 |
| 3.2. Alat dan Bahan | 16 |
| 3.3. Prosedur Penelitian | 16 |
| 3.3.1. Regenerasi Sampel, PCR Koloni, dan Seleksi Transforman | 16 |
| 3.3.2. Isolasi Plasmid..... | 17 |
| 3.3.3. Restriksi Plasmid | 18 |
| 3.3.4. Transformasi Plasmid Rekombinan ke <i>Pichia pastoris</i> | 18 |
| 3.3.5. Seleksi dan <i>Screening</i> Hasil Transformasi Menggunakan PCR Koloni | 20 |
| 3.3.6. Analisa <i>copy number</i> dari Gen Target Menggunakan ImageJ..... | 21 |
| 3.3.7. Seleksi Transformasi dengan Peningkatan Antibiotik Secara Bertingkat | 22 |
| BAB IV HASIL..... | 24 |
| 4.1. Hasil Regenerasi <i>E. coli</i> +pPICZA L1HPV45 | 24 |
| 4.2. PCR Koloni hasil regenerasi | 24 |
| 4.3. Isolasi Plasmid pPICZA L1HPV45..... | 25 |
| 4.4. Hasil Transformasi Menggunakan Metode Elektroporasi..... | 26 |
| 4.5. Seleksi Transformasi dan <i>Screening</i> transforman menggunakan PCR Koloni | 27 |
| 4.6. Analisa <i>copy number</i> dari gen target menggunakan ImageJ | 29 |
| 4.7. Peningkatan konsentrasi antibiotik secara bertingkat..... | 31 |
| BAB V PEMBAHASAN | 33 |
| 5.1. Perbanyak dan Isolasi Plasmid | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2. Proses Transformasi | 34 |
| 5.3. Analisa Hasil Transformasi | 34 |
| 5.4. Peningkatan Konsentrasi Antibiotik Secara Bertingkat | 36 |
| BAB VI. PENUTUP | 37 |
| 6.1. Kesimpulan..... | 37 |
| 6.2. Saran..... | 37 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 38 |
| LAMPIRAN | 43 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 1. Taksonomi dari HPV45 | 4 |
| Tabel 2 PCR master mix dan siklus PCR | 17 |
| Tabel 3 Kontrol yang digunakan pada transformasi | 20 |
| Tabel 4 Komposisi dan siklus untuk PCR koloni | 21 |
| Tabel 5 Konsentrasi hasil isolasi plasmid ppicza-L1HPV45 | 26 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 1 HPV Genome Mapping (Wilson, 2014)..... | 3 |
| Gambar 2. Pohon filogenetik alphapapillomavirus. Hr: high risk lr: low risk (chen et al., 2018) | 5 |
| Gambar 3. Struktur protein I1 (buck et al., 2013) | 6 |
| Gambar 4 Escherichia coli | 7 |
| Gambar 5 Pichia pastoris | 8 |
| Gambar 6. Mekanisme Rekombinasi Homolog pada Pichia pastoris (Invitrogen, 2014) | 10 |
| Gambar 7. Skema elektroporasi pada Pichia pastoris (Karbalaie et al., 2020) | 11 |
| Gambar 8. Konstruksi (a) plasmid pPICZA; (b) pPICZA-L1HPV45 sumber: dokumentasi pribadi.... | 12 |
| Gambar 9 Kerangka penelitian menggunakan Pichia pastoris..... | 15 |
| gambar 10 Kultur E.coli+pPICZA L1HPV45 | 24 |
| Gambar 11 PCR koloni E. Coli+pPICZA L1HPV45 | 25 |
| Gambar 12 Restriksi plasmid menggunakan Enzim <i>SacI</i> | 26 |
| Gambar 13 Hasil Transformasi | 27 |
| Gambar 14 seleksi transformasi..... | 28 |
| Gambar 15 PCR Koloni Menggunakan Primer 5'AOX dan 3'AOX..... | 29 |
| Gambar 16 Hasil PCR gen target menggunakan primer spesifik | 30 |
| Gambar 17 Grafik hasil analisa copy number menggunakan ImageJ..... | 31 |
| Gambar 18 Koloni Transforman pada medium dengan konsentrasi bertingkat..... | 32 |