

Transformasi gen metCSF3 menggunakan plasmid rekombinan pPICZ-metCSF3 dengan promotor induktif PAOX1 dan pengujian Fenotipe Mut pada *Komagataella phaffii* = Transformation metCSF3 gene using pPICZ-metCSF3 recombinant plasmid with PAOX1 inductive promoter and analysing Mut phenotype on *Komagataella phaffii*

Mohamad Faisal Gunawan, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20509633&lokasi=lokal>

Abstrak

Protein Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) memiliki peran spesifik dalam menstimulasi proliferasi dan pematangan sel neutrofil. Penelitian sebelumnya, gen CSF3 telah berhasil dikonstruksi secara *in vitro* di dalam vektor pPICZ $\hat{\pm}$ dengan penyisipan kodon metionin pada ujung-5' dan kodon stop pada ujung-3' dari gen CSF3. Konstruksi tersebut menghasilkan pPICZ $\hat{\pm}$ -metCSF3. Tujuan penelitian ini adalah transformasi plasmid pPICZ $\hat{\pm}$ -metCSF3 pada sel inang *Komagataella phaffii* dan melakukan pengujian fenotipe Mut pada sel transforman yang diperoleh. Plasmid pPICZ $\hat{\pm}$ -metCSF3 diisolasi dari *Escherichia coli* DH5 $\hat{\pm}$ dan dilinierisasi sehingga menghasilkan plasmid linier berukuran 4.131 pb. Plasmid rekombinan dipurifikasi dan dikuantifikasi, selanjutnya ditransformasikan ke dalam sel inang *K. phaffii* dengan metode elektroporasi. Jumlah koloni yang terbentuk berkisar 214 koloni transforman dan nilai efisiensi transformasi mencapai $0,18 \times 10^3$ cfu/ μ g plasmid DNA. Seleksi koloni transforman dilakukan pada medium YPD dengan konsentrasi zeosin yang bertingkat. Sebanyak 15 dari 23 koloni transforman memiliki resistensi terhadap seluruh tingkatan konsentrasi zeosin. Pengujian fenotipe Mut pada 23 koloni transforman memiliki fenotipe Mut⁺. Berdasarkan data pengamatan yang diperoleh bahwa *K. phaffii* berhasil membawa plasmid pPICZ $\hat{\pm}$ -metCSF3 dan koloni transforman memiliki keberadaan gen aktif AOX1 dan AOX2 (fenotipe Mut⁺). Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) protein has a specific role to stimulate proliferation and maturation of neutrophils. Previous research has succeeded an *in vitro* construction of CSF3 gene on pPICZ $\hat{\pm}$ vector, while inserting a methionine codon at 5'-end and two stop codons at 3'-end of CSF3 gene sequences. The metCSF3 gene has been formed in recombinant plasmid named pPICZ $\hat{\pm}$ -metCSF3. The purposes of this research are to transform the pPICZ $\hat{\pm}$ -metCSF3 recombinant plasmid into *Komagataella phaffii* host and conducting the phenotype Mut analysis on the transformant colonies. The pPICZ $\hat{\pm}$ -metCSF3 plasmid was isolated from *Escherichia coli* DH5 $\hat{\pm}$ and was linearized to 4.131 bp of plasmid in size. pPICZ $\hat{\pm}$ -metCSF3 plasmid was purified and quantified, then it was transformed into *K. phaffii* through electroporation method. Approximately 214 transformant colonies successfully produced and the transformation efficiency reached up to $0,18 \times 10^3$ cfu/ μ g of DNA plasmid. The transformant was selected on YPD medium with increasing zeocin concentration. Approximately 15 out of 23 transformant were resistant against all stage of zeocin concentration. The determination of Mut phenotype on 23 transformant colonies categorized as Mut⁺ phenotype. In brief, *K. phaffii* has been succeeded to bring pPICZ $\hat{\pm}$ -metCSF3 plasmid and transformant colonies have active AOX1 and AOX2 gene (Mut⁺ phenotype).