

LOG-BOOK



Title of activity	: I-COLIN (IN SILICO DESIGN OF proINSULIN PRODUCTION IN TRANSGENIC <i>Aloe vera</i> CHLOROPLAST USING PARTICLE BOMBARDMEN”
Member(s) 1	: Aisyah Rifa Fadhilah
Member(s) 2	: Muhamad Nabil Alhanif
Institution	: SMA Kharisma Bangsa

Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia – LIPI

Indonesian Institute of Sciences

Date and time | 15 Juli 2020

Aisyah & Nabil

Dr. Satya Nugroho

Memenuhi kebutuhan insulin untuk mengatasi permasalahan penderita diabetes melalui "Overekspresi Tanaman"

15 Juli 2020

1. Pengetahuan Dasar —> Bangun argumen yang kuat
2. Didukung dengan data yang valid.
-kemenkes, WHO, publikasi ilmiah

Hal yang perlu diklarifikasi :

1. [Latar Belakang Kebutuhan Insulin] Bagaimana kebutuhan insulin di Indonesia dan di dunia, apakah sudah terpenuhi baik dari aspek ketersediaan dan keterjangkauan (harga contohnya)
2. Eksperimental
-Dry Lab : Tidak memerlukan langsung ke lab dan percobaan (In Silico)
hasil dry lab perlu di validasi di Web Lab
-Wey Lab : Harus masuk ke lab dan percobaan langsung dengan material asli. (DNA, RNA, Protein organisme model)

Conclusions (why do we use in silico method?)

1. Waktu pendek
2. Pandemi
3. Tidak membutuhkan material asli langsung
4. Efisien dan ekonomis
5. Untuk merancang penelitian selanjutnya (in vitro, in vivo)

Tugas :

1. Perbaiki pemahaman di proposal sehingga penguasaan permasalahan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.
2. Sejauh mana pemahaman terhadap masalahnya? (In silico)
3. Mengapa melakukan penelitian tersebut?
4. Mengidentifikasi ketersediaan materi/bahan awal sehingga bisa mulai kerja.
5. Bagaimana cara melakukannya?
Ex: bila kebutuhan insulin menurun
 - a. Bagaimana memenuhi kebutuhan insulin saat ini?
 - b. Ada masalah ga dengan cara tersebut?
 - c. Kalo ada, alternatif apa untuk memecahkan masalah tersebut?
 - d. Modal apa yang sudah kita miliki untuk memberikan alternatif pemecahan masalah?

Modal:

- info apa yang dilakukan orang sebelumnya kurang efisien (mahal, sulit, lama. Maka kita perbarui menjadi murah, mudah, cepat).
- menetapkan target

7. Data penting

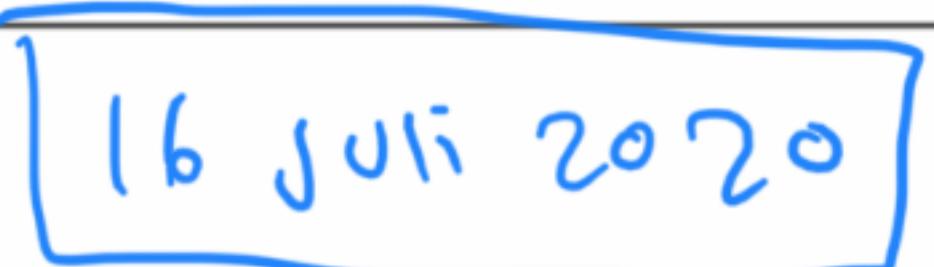
- Insulin dan permasalahannya
- Data apa saja yang dilakukan orang untuk memproduksi insulin dan permasalahannya
- Kita ingin memberikan kontribusi dimana? (Dalam memenuhi produksi insulin)
- Apakah alternatif kita lebih baik caranya?

8. Cari Source Molecular Pharming

Produksi senyawa therapeutic tanaman

- Mengapa memilih tanaman untuk menghasilkan insulin?
- Sudah ada yang melakukannya sebelumnya?

[JAWABAN DAN DISKUSI DARI MENTORING DICANTUMKAN DI MAKALAH yang akan dikirimkan ke email professor]

Executor(s) :	 Aisyah Rifa F & Muhamad Nabil A.	Supervisor :
Date and time	16 Juli 2020	

Alur kerja
(Proposed)

1. Mencari informasi tentang penting nya insuline termasuk kebutuhan insulin dan produksi insulin
2. Informasi tentang produksi insuline recombinan, permasalahan yang dihadapi
3. Molecular pharming sebagai alternatif (mencari alternatif tanaman yang dapat digunakan untuk produksi protein/ insulin dan mudah untuk ditransformasi (Ciri tanaman yang cocok untuk produksi senyawa secara rekayasa genetika, dan banyak ditemukan/mudah ditanam/mudah dimusbnahkan)
4. Mencari DNA sequence human insulin (ada berapa jenis/varian?) (kata kunci untuk search bisa: production, human insulin pada pubmed lalu cari gen nya. Dapat pula menggunakan kata kunci human insulin pada gen/protein search di www.ncbi.nlm.nih.gov)
5. Codon optimization di tanaman
6. Mencari vector/plasmid yang tepat untuk ekspresi di tanaman
7. Mencari promoter (apakah jenis promoter yang terekspresi terus menerus dan disemua jaringan tanaman (constitutive) atau promoter yang khusus terekspresi di biji/daun/dll), mencari terminator yang tepat untuk produksi di tanaman
8. Simulasi cloning gen dan promoter ke plasmid untuk produksi di tanaman

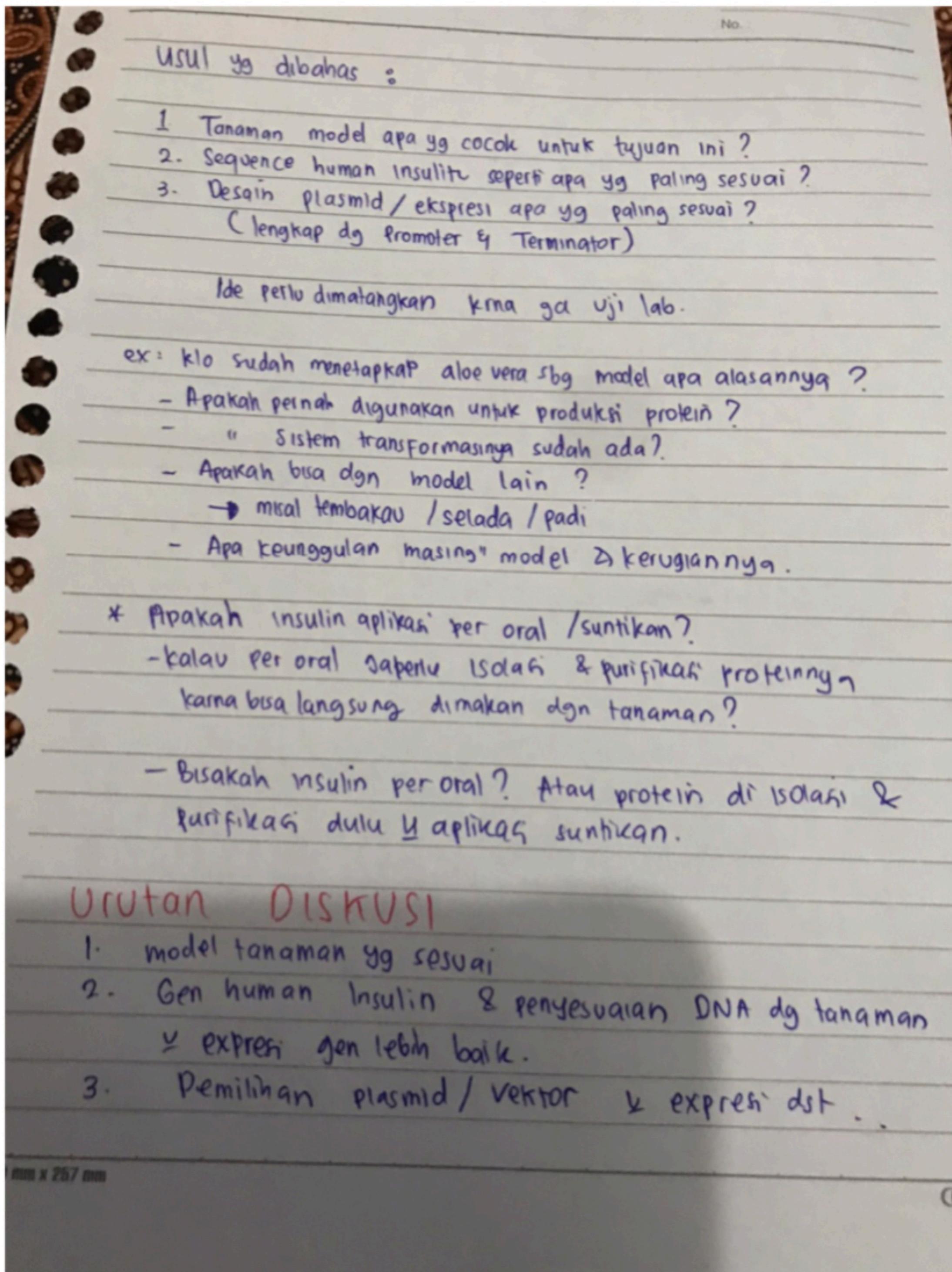
Dan sudah mencoba beberapa simulasi software yang berhubungan dengan topik ini. Contohnya simulasi PCR.

Mempelajari pelbagai source yang diberikan oleh profesor dalam bentuk pdf, ppt, dan lain-lain. Seperi molecular pharming, dll.

Tugas 1-7 sudah diselesaikan. No. 8 belum, terkendala oleh keterbatasan kami dalam menggunakan software-software tersebut.

Penjelasan no 1-7 bisa dilihat dari MAKALAH YANG DIKIRIMKAN KE PROFESOR melalui email

Date and time 11 Agustus 2020



Urutan DISKUSI

1. model tanaman yg sesuai
2. Gen human Insulin & penyesuaian DNA dg tanaman
↳ expressi gen lebih baik.
3. Pemilihan plasmid / vektor & expressi dst .

Executor(s) :

Aisyah Rifa Fadhilah dan Muhamad Nabil Alhanif

Supervisor :

Dr. Satya Nugroho

Date and time 11 Agustus 2020

1. Kami membandingkan beberapa model tanaman yang cocok untuk model ini.
2. Mempertimbangkan target nya ke mana. Kami sedang mencari info tentang perbandingan beberapa target seperti peoproxisome, inti nucleus, dan kloroplast. Dari berbagai data dapat disimpulkan bahwa chloroplast lebih menguntungkan sebagai target pada penelitian ini. Keuntungannya yang paling utama yaitu high yield dan bebas kontaminasi.

- Transformasi juga dilokalisasikan pada nucleus (Kindle 1990), mitokondria (Remacle et al. 2006), dan kloroplas (Boynton et al. 1988). Ketiga kompartemen telah direkayasa secara genetik dengan tujuan yang berbeda tetapi kloroplaslah yang mendapat perhatian yang cukup besar, terutama untuk menunjukkan bahwa akumulasi protein rekombinan dalam organel ini layak dilakukan. Transformasi kloroplas dilakukan dengan menggunakan perangkat penembakan partikel seperti skema pada Gambar I. Teknologi transformasi kloroplas telah menunjukkan bahwa tidak hanya dapat bersaing dengan platform produksi saat ini tetapi juga akan lebih cocok untuk produksi beberapa protein seperti imunotoksin (Tran et al. 2013a; Tran dkk. 2013b), antigen non glikosilasi (Gregory dkk. 2012; Gregory dkk. 2013), dan antibodi (Mayfield dkk. 2003; Tran dkk. 2009) yang sulit diproduksi di tempat lain
3. Sedang mematantangkam sistem transformasi
4. Mempertimbangkan apakah produk nantinya berupa insulin per oral atau injeksi. Jika oral maka dibutuhkan sistem atau kapsul yang dapat mencegah degradasi protein insulin di sistem pencernaan.
5. Jika sudah terkumpul semuanya maka akan ditentukan promoter dan vektor yang tepat untuk penelitian ini.
6. Merapikan makalah
7. Untuk progress selengkapnya, dapat di cek pada makalah yang akan dikirimkan melalui email profesornya.
8. In sya Allah minggu depan akan diskusi melalui video conference.

Executor(s) :
Aisyah Rifa Fadhilah dan Muhamad Nabil Alhanif

Supervisor :

Dr. Satya Nugroho

Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia – LIPI

Indonesian Institute of Sciences

Date and time | September 2020

Mentoring

Krutan :

1. Tentuin tumbuhan (menemukan model tumbuhan)
2. Desain (konstruksi) ekspresi
 - Gen
 - Promotor
 - Terminator
3. Cara transformasi
 - Bombardeed particle : ini dah komplit benanya.
 - (Alternatif) Pakai agrobacterium (butuh plasmid & vektor)
4. Metode Distribusi → gausah.

PCAMBIA 1300

Aloe Vera

Why do we choose Aloe as a plants models :

1. mudah di dapat di Indo (tropis)
2. mudah di cultivasi & ekstraksi (budi daya)
3. Sudah pernah dijadikan model
4. Produktivitas ↑

♥ Ya perlu digali lagi

1. Aspek molecular Aloe
2. Kompleksitas kromosom ($2n, 3n, \text{dil}$)
3. Banyak produksinya di penelitian lain.

mengapa kami pilih tanaman dan pd hewan?

- klo hewan sbg tanaman model.
di lab perlu sterilitas ↑, kontaminasi ↑
- klo di mikroba jd banyak risk nya.

♥ Kromosom aloe brp besar?
♥ Aloe vera genome sequencing project?
SL = asam amino

♥ Aloe deket sama Alium

Aloe monokotil → kemungkinan lebih deket sama tanaman monokotil spt padi & Alium.

Insulin

1. ukuran subunitnya
2. Aktivasiya (Proinsulin - Siap)
 - Pro insulin → cleavage ges kimia
jadi insulin.
 - Pro insulin: proses downstream dari purifikasi → cleavage → lab kimia
3. Cari gen insulin manusia yg dipakai. (sequence)

Kodon Usage

- Kodon usage di hewan, plants, Insulins di optimasi disesuaikan GC kontennya.
- Beda tanaman, beda codon usage nya.
- Letakin gen human manusia (ada apps) codon optimize ke genome padi
- kodon optimize dilakukan di bioinformatics

Proses Transformasi

- klo di padi klo vektor nya agrobacterium biasanya target dr kalus padi → regenerasi → tumbuh or
- kalus dilembak pakai partikel gen.

♥ Apa yg di transformasi? Apanya?

- tmpt RNA pol mengikat di promotor RNA pol
- Perlu promoter & terminator

↑
Spesifik

- Cari promoter yg sdh dilaporkan menghasil

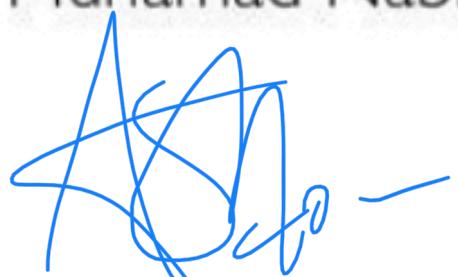
Cari % kloroplas Specific Promotor.

- mengekspresikan pro insulin ke tanaman.

* kloroplast aloe di Gen bank : China

**Mentoring dengan prof Satya melalui video conference (zoom) pada I Setember 2020**

Executor(s) :
Aisyah Rifa Fadhilah
Muhamad Nabil Alhanif



Supervisor :
Prof. Satya Nugroho

Date and time | 1 september 2020

Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia – LIPI Indonesian Institute of Sciences

Date and time	13 september 2020
---------------	-------------------

Aloe Vera

1. Fisiologi Aloe vera

1.1 Metabolisme

Dari segi fisiologi, Aloe vera termasuk dalam kelompok CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Tanaman CAM hanya membuka stomata pada malam hari untuk menyerap CO₂ dan air, berbeda dengan tumbuhan yang membuka stomatanya di siang dan malam hari. Hal ini memberikan keuntungan bagi tumbuhan CAM, karena ia dapat menutup rapat stomatanya pada siang hari dan mengurangi penguapan air. Oleh karena itu, tumbuhan CAM dapat hidup di daerah yang kering. Contoh tumbuhan CAM selain Aloe vera adalah kaktus dan nanas.

1.2 Transformasi dan Rekayasa genetik

Semenjak akhir abad 20, Aloe vera mulai mendapat perhatian untuk rekayasa genetika. Hal ini disebabkan oleh berbagai macam keuntungan yang ditawarkan Aloe vera. Komponen Aloe vera dilaporkan memiliki sifat antijamur, antiseptik, antivirus, antibakteri, anti-inflamasi, antioksidan, dan penyembuhan luka[7].

Manfaat Aloe vera

Produk kesehatan

Kandungan nutrisi yang banyak

Produk kosmetik

Budidaya Aloe bera

Aloe vera sudah mulai dibudidayakan di Indonesia semenjak 1980, terutama di daerah Siantan Hulu, Pontianak. Jenis lidah buaya yang dibudidayakan adalah Aloe chinensis Baker atau lebih dikenal dengan sebutan Lidah Buaya Pontianak.

2.5.5 Kesimpulan

Aloe vera dapat bertahan hidup dalam kekeringan, hal ini disebabkan oleh metabolisme CAM nya yang membantu mengurangi penguapan air. Oleh karena itu, Aloe vera tidak membutuhkan perawatan sebanyak tanaman tanaman lain yang

membutuhkan banyak air. Walaupun tentunya untuk mendapatkan hasil panen yang memuaskan, lebih disarankan untuk menanam Aloe vera di kondisi lingkungan ideal seperti yang tertera di bagian 2.5.4. Selain itu, Aloe vera juga memiliki berbagai macam manfaat dan khasiat, serta tidak menimbulkan kerusakan lingkungan. Kultivasi Aloe vera juga berkesempatan membuka lapangan kerja baru bagi warga Indonesia (Bank Indonesia - PPUK budidaya lidah buaya).

Di sisi lain, kesulitan transformasi Aloe vera merupakan salah satu penghambat utama. Walau begitu, beberapa uji lapangan dengan menggunakan antioksidan dan beberapa bahan lainnya menunjukkan hasil yang signifikan dalam kultivasi Aloe vera transgenik.

2. Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium tumefaciens merupakan anggota dari kingdom monera, dan berasal dari keluarga rhizobiaceae. Rhizobiaceae merupakan keluarga yang dihuni oleh berbagai macam bakteri pemfiksasi nitrogen yang bersimbiosis mutualisme dengan kacang kacangan. Berbeda dengan anggota keluarga rhizobiaceae lainnya (wikipedia). A. tumefaciens merupakan jenis bakteri phytopathogen yang dapat menyebabkan crown gall disease. Crown gall disease disebabkan TI-plasmid bakteri yang membawa T-DNA menuju tanaman melalui bacterial type IV secretion system (T4SS).

Dalam beberapa dekade terakhir, ilmuwan berhasil mengidentifikasi gen pada tanaman dan bakteri yang berperan dalam pembentukan tumor. Dengan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai interaksi A. tumefaciens dengan sel inang, ilmuwan berhasil merubah A. tumefaciens menjadi perantara transformasi tanaman[8].

2.1 Komponen dan Mekanisme A. tumefaciens

A. tumefaciens memiliki berbagai macam komponen yang memungkinkannya memindahkan sebagian DNA nya ke dalam sel tumbuhan.

TI-Plasmid

TI-Plasmid (Tumor Inducing Plasmid) terdiri

T-DNA

Konjungasi TI Plasmid

vir Genes

2.6 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens merupakan anggota dari kingdom monera, dan berasal dari keluarga rhizobiaceae. Rhizobiaceae merupakan keluarga yang dihuni oleh berbagai macam bakteri pemfiksasi nitrogen yang bersimbiosis mutualisme dengan kacang-kacangan. Berbeda dengan anggota keluarga rhizobiaceae lainnya (wikipedia). *A. tumefaciens* merupakan jenis bakteri fitopatogen yang dapat menyebabkan *crown gall disease*. *Crown gall disease* disebabkan TI-plasmid bakteri yang membawa T-DNA menuju tanaman melalui bacterial type IV secretion system (T4SS).

Dalam beberapa dekade terakhir, berbagai macam gen pada tanaman dan bakteri yang berperan dalam pembentukan tumor berhasil diidentifikasi. Penemuan ini, digabung dengan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai interaksi *A. tumefaciens* memungkinkan manusia untuk memanfaatkan *A. tumefaciens* sebagai perantara transformasi tanaman^[8].

2.6.2 Komponen dan Mekanisme *A. tumefaciens*

A. tumefaciens memiliki berbagai macam komponen dan mekanisme yang memungkinkannya mentransfer sebagian DNA nya ke dalam sel tumbuhan.

TI-Plasmid

Plasmid merupakan molekul kecil DNA ekstrakromosomal yang terpisah dari DNA kromosomal dan dapat bereplikasi sendiri. Plasmid biasanya berupa molekul DNA sirkuler rantai ganda yang ditemukan pada bakteri dan membawa gen yang menguntungkan bagi sang bakteri. Tumor Inducing (TI) Plasmid merupakan jenis plasmid yang ditemukan di spesies *Agrobacterium* dan dapat menyebabkan pembentukan tumor di tanaman yang diinfeksi^[64].

Ti plasmid berasal dari keluarga replikon yang bernama *repABC* yang dimiliki oleh berbagai spesies Alphaproteobacteria^[74]. Keluarga replicon ini terdiri dari plasmid ekstrakromosomal dan beberapa kromosom sekunder. *repABC cassette* merupakan bagian esensial dalam replikasi dan partisi *octopine-type* Ti plasmid^[75]. Cassette ini terdiri dari tiga gen (*repA*, *repB*, *repC*), situs partisi *cis* (*parS*), dan *Origin of Replication* (*oriV*).

repA dan *repB* mengkode sistem partisi, sedangkan *repC* mengkode protein inisiasi replikasi^[74, 77]. *repA* dan *repB* memiliki banyak kesamaan dengan *parA/parB* yang dimiliki oleh berbagai macam plasmid, phages, dan kromosom

Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia – LIPI Indonesian Institute of Sciences

Date and time	13 september 2020
---------------	-------------------

Aloe Vera

1. Fisiologi Aloe vera

1.1 Metabolisme

Dari segi fisiologi, Aloe vera termasuk dalam kelompok CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Tanaman CAM hanya membuka stomata pada malam hari untuk menyerap CO₂ dan air, berbeda dengan tumbuhan yang membuka stomatanya di siang dan malam hari. Hal ini memberikan keuntungan bagi tumbuhan CAM, karena ia dapat menutup rapat stomatanya pada siang hari dan mengurangi penguapan air. Oleh karena itu, tumbuhan CAM dapat hidup di daerah yang kering. Contoh tumbuhan CAM selain Aloe vera adalah kaktus dan nanas.

1.2 Transformasi dan Rekayasa genetik

Semenjak akhir abad 20, Aloe vera mulai mendapat perhatian untuk rekayasa genetika. Hal ini disebabkan oleh berbagai macam keuntungan yang ditawarkan Aloe vera. Komponen Aloe vera dilaporkan memiliki sifat antijamur, antiseptik, antivirus, antibakteri, anti-inflamasi, antioksidan, dan penyembuhan luka[7].

Manfaat Aloe vera

Produk kesehatan

Kandungan nutrisi yang banyak

Produk kosmetik

Budidaya Aloe vera

Aloe vera sudah mulai dibudidayakan di Indonesia semenjak 1980, terutama di daerah Siantan Hulu, Pontianak. Jenis lidah buaya yang dibudidayakan adalah Aloe chinensis Baker atau lebih dikenal dengan sebutan Lidah Buaya Pontianak.

2.5.5 Kesimpulan

Aloe vera dapat bertahan hidup dalam kekeringan, hal ini disebabkan oleh metabolisme CAM nya yang membantu mengurangi penguapan air. Oleh karena itu, Aloe vera tidak membutuhkan perawatan sebanyak tanaman lain yang

membutuhkan banyak air. Walaupun tentunya untuk mendapatkan hasil panen yang memuaskan, lebih disarankan untuk menanam Aloe vera di kondisi lingkungan ideal seperti yang tertera di bagian 2.5.4. Selain itu, Aloe vera juga memiliki berbagai macam manfaat dan khasiat, serta tidak menimbulkan kerusakan lingkungan. Kultivasi Aloe vera juga berkesempatan membuka lapangan kerja baru bagi warga Indonesia (Bank Indonesia - PPUK

budidaya lidah buaya).

Di sisi lain, kesulitan transformasi Aloe vera merupakan salah satu penghambat utama. Walau begitu, beberapa uji lapangan dengan menggunakan antioksidan dan beberapa bahan lainnya menunjukkan hasil yang signifikan dalam kultivasi Aloe vera transgenik.

2. Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium tumefaciens merupakan anggota dari kingdom monera, dan berasal dari keluarga rhizobiaceae. Rhizobiaceae merupakan keluarga yang dihuni oleh berbagai macam bakteri pemfiksasi nitrogen yang bersimbiosis mutualisme dengan kacang kacangan. Berbeda dengan anggota keluarga rhizobiaceae lainnya (wikipedia). A. tumefaciens merupakan jenis bakteri phytopathogen yang dapat menyebabkan crown gall disease. Crown gall disease disebabkan TI-plasmid bakteri yang membawa T-DNA menuju tanaman melalui bacterial type IV secretion system (T4SS).

Dalam beberapa dekade terakhir, ilmuwan berhasil mengidentifikasi gen pada tanaman dan bakteri yang berperan dalam pembentukan tumor. Dengan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai interaksi A. tumefaciens dengan sel inang, ilmuwan berhasil merubah A. tumefaciens menjadi perantara transformasi tanaman[8].

2.1 Komponen dan Mekanisme A. tumefaciens

A. tumefaciens memiliki berbagai macam komponen yang memungkinkannya memindahkan sebagian DNA nya ke dalam sel tumbuhan.

TI-Plasmid

TI-Plasmid (Tumor Inducing Plasmid) terdiri

T-DNA

Konjungasi TI Plasmid

vir Genes

Executor(s) :



Aisyah Rifa Fadhilah dan Muhammad Nabil Alhanif

Supervisor :

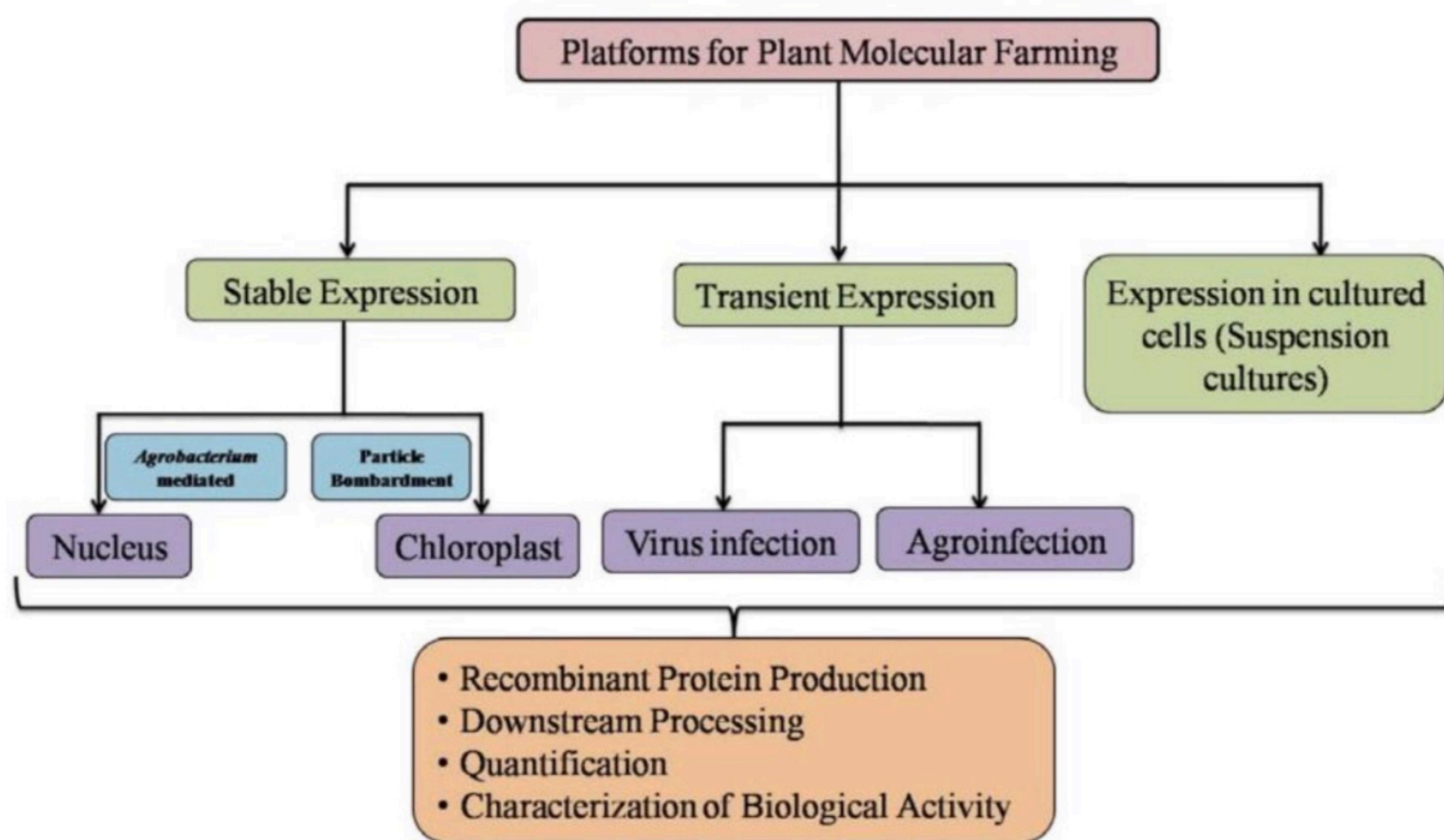
Prof. Dr Setyo Nugroho

Date and time	18 Oktober 2020
---------------	-----------------

Pada dua minggu terakhir ini sudah selesai bab 2 dan mulai mengerjakan bab 3 serta memulai komputasi dan beberapa software. Memperjelas tahapan pada bab 3.

Bab 2.

Mempertimbangkan/mengkomparasi platform ekspresi pada tumbuhan. Sehingga didapat kesepakatan menggunakan sistem ekspresi tanaman transgenik



Gambar 1. Menary, Ma, JO, PLoS ONE 2020. Ini skema umum strategi molecular pharming.

2. Mempertimbangkan tipe ekspresi yang sesuai. Sehingga kami memutuskan menggunakan sistem ekspresi kloroplas
 - Mencari visualisasi genome kloroplas Aloe vera dengan CGView
 - Mencari promoter yang sesuai. Kemungkinan menggunakan ubiquitin promoter
3. Mempertimbangkan teknik transformasi, sehingga didapatkan kesepakatan menggunakan teknik Particle Bombardment setelah melalui studi literatur, didapat bahwa penelitian sebelumnya yang menggunakan kloroplas kebanyakan menggunakan Particle bombardment daripada Agrobacterium, karena pada kloroplas terdapat double membrane, sehingga susah dintembus.
5. Mencari bagaimana langkah transformasi pada particle bombardment dimulai dair persiapan DNA yang dibaluri partikel emas.

6. Mencari penelitian lain tentang biopharming
7. Riset bagaimana kemungkinan langkah selanjutnya setelah *in silico* jika dimungkinkan *in vivo*.
8. Mencari cara untuk ekstraksi protein sehingga digunakan analisa proteomik untuk identifikasi protein yaitu insulin. Misalnya pakai metoda TCA
9. Transfer DNA Binary System sebagai alternatif
10. Studi literatur tentang Enzim Restriksi dan Ligase

Untuk pertemuan selanjutnya berfokus pada bab 3 dan 4. Tentang komputasi dan Memulai design dengan memanfaatkan softare dan database yang ada sebagai bagian dari rancangan *in silco*.

Executor(s) : Aisyah dan Nabil 						Supervisor : Prof. Dr. Satya Nugroho
Date and time 3 Oktober 2020						

1. Biopharming

Biopharming adalah usaha tani (farming) yang memanfaatkan tanaman atau hewan ternak untuk menghasilkan protein atau senyawa metabolit tertentu yang bernilai kesehatan atau pengobatan[10]. Biopharming tidak terlepas dari produk rekayasa genetika yang diterapkan pada hewan atau tumbuhan untuk menyisipkan gen dari organisme lain, sehingga hewan atau tumbuhan itu mengekspresikan senyawa tertentu, yang kemudian dapat dipanen hasilnya[11][12].

Produk yang dihasilkan biopharming adalah protein rekombinan ("baru") atau hasil metabolismenya. Bakteri atau cendawan yang menghasilkan protein rekombinan memerlukan bioreaktor untuk dapat digunakan secara komersial sehingga memerlukan investasi yang tinggi. Biopharming menawarkan kelebihan berupa rendahnya biaya karena diintegrasikannya usaha tani sebagai cara menghasilkan tanpa memerlukan infrastruktur yang mahal dan kapasitas produksinya dapat diatur dengan lebih fleksibel.[13]. Permasalahan keamanan lingkungan menjadi isu yang perlu diperhatikan dalam pelaksanaan biopharming.

Tabel 1

2. Platform Ekspresi

Comparison of various expression systems for recombinant pharmaceutical proteins (combined from Schillberg et al., 2003; Ma et al., 2003)

Features	Bacteria	Yeast	Plant cell cultures	Transgenic plants	Mammalian cell cultures	Transgenic animals
Production cost	Low	Medium	Medium	Low	High	High
Timescale for production	Short	Medium	Medium	Short	Long	Very long
Propagation	Easy	Easy	Easy	Very easy	Medium	Medium
Distribution	Difficult	Difficult	Difficult	Easy	Very difficult	Easy
Quality	Low	Medium	High	High	High	High
Safety	Low	High	High	High	Low	Low
Glycosylation	Incorrect ^a	Incorrect	Differences	Differences	Minor differences	Minor differences
Ease of glycosylation modification	Very difficult	Medium	Easy	Easy	Difficult	Very difficult

^a See references, Benz and Schmidt (2002) and Szymanski et al. (2003).

Table 2 Comparison of various expression systems for recombinant pharmaceutical proteins (combined from Schillberg et al., 2003; Ma et al., 2003)

Comparisons	Transgenic Plant	Plant Cell Culture	Bacteria	Yeast	Mammalian Cell Culture	Transgenic Animals
Overall cost	Very low	Medium	Low	Medium	High	High
Scale-up capacity	Very high	Medium	High	High	Very low	Low
Production scale	Worldwide	Limited	Limited	Limited	Limited	Limited
Protein yield	High	High	Medium	High	Medium-High	High
Protein folding accuracy	High	High	Low	Medium	High	High
Glycosylation	Minor differences	Minor differences	None	Incorrect	Correct	Correct
Product quality	High	High	Low	Medium	High	High
Contamination risks	Low	Low	Endotoxins	Low	Virus, Prions, oncogenic DNA	Virus, Prions, oncogenic DNA
Safety	High	Non-specific	Low	Unknown	Medium	High
Storage cost	Inexpensive	Moderate	Moderate	Moderate	Expensive	Expensive

Comparison of different expression platforms for the production of pharmaceuticals (modified from Spök and Karner 2008 [41], European Communities).

Expression System	Advantages	Disadvantages
Bacteria	Easy to manipulate Low cost High expression Ease of scale up Short turnaround time Established regulatory procedures and approval	Improper folding Lack of post-translational modifications which may affect the protein function Endotoxin accumulation
Mammalian Cells	Proper folding and authentic post-translational modifications Existing regulatory approval	High production cost Expensive media and culture condition requirements
Yeast	Rapid growth and scalable Easy to manipulate Simple and inexpensive media requirements and culture conditions Post-translational modifications of recombinant proteins	Difficulty in cell disruption due to the thick and hard cell walls Hyperglycosylation of proteins Limited glycosylation capacity
Insect cells	High expression levels Ability to produce complex proteins including secreted, membrane, and intracellular proteins Proper folding and post-translational modifications	High cost and time consuming Expensive media and culture condition requirements
Plant	Rapid and affordable Optimized growth conditions Free from pathogen and bacterial toxin contaminants Economical Post-translational modification somewhat similar like mammalian system	Regulatory compliance Limited glycosylation capacity

Tabel...(Keuntungan dan kerugian platform ekspresi)

Tanaman adalah sumber biomassa yang murah dan dengan demikian merupakan alternatif menarik sebagai inang ekspresi konvensional untuk Menghasilkan produk biologis dengan klinis, industri, dan penelitian aplikasi (Faye dan Gomord, 2010; Fischer et al., 2012).

Praktik penggunaan tumbuhan untuk produksi protein rekombinan yang bernilai tinggi mulai dari terapi farmasi untuk produk non farmasi seperti antibodi, antigen vaksin, enzim, faktor pertumbuhan, penelitian atau reagen diagnostik, dan bahan kosmetik [14] telah meningkat dari waktu ke waktu dan berkembang secara signifikan dalam beberapa dekade terakhir, yang pada gilirannya menyebabkan paradigma utama pergeseran di sektor farmasi. Teknologi telah berkembang pesat, dan potensi kekurangannya terkait dengan pertanian molekuler tanaman selama tahap awal perkembangan mereka, termasuk kebutuhan untuk tingkat ekspresi protein yang tinggi dan pemrosesan hilir yang efisien, kini telah tercapai. Keuntungan dari platform ekspresi tanaman dikutip dalam beberapa laporan sebelumnya yang menunjukkan head-to-head

perbandingan dengan platform lain yang ada (Tabel 1) [10-18]. Keuntungan utama dari semua nabati sistem budidaya mudah, biaya rendah, beban patogen rendah atau tidak ada, produksi massal cepat protein rekombinan, dan kemampuan tumbuhan untuk menyusun protein kompleks yang mirip eukariotik modifikasi pasca-translasi (PTMs) [24].

Pelipatan protein sangat penting untuk mempertahankan aktivitas biologis terapeutik rekombinan protein. Karena kurangnya kompleks pemrosesan protein dan kapasitas terbatas untuk PTM, protein yang tepat melipat tidak dapat dicapai dalam sistem ekspresi prokariotik [25]. Tanaman memiliki kapasitas untuk merakit dan melakukan PTM protein multimerik besar yang diperlukan untuk fungsi biologisnya aktivitas. Namun, tanaman kekurangan mekanisme pemrosesan N-glikosilasi manusia asli yang dimilikinya

telah diatasi oleh pendekatan *glycoengineering* menuju sintesis manusia yang ditargetkan dan struktur non-manusia untuk meningkatkan homogenitas, kualitas, dan kuantitas produk [26,27].

2.1 Stable Expression

2.1.2 Transformasi inti yang stabil (*Nuclear Stable Transformation/Nuclear Expression*)

Transformasi inti merupakan strategi tradisional manipulasi genetika pada tumbuhan untuk memproduksi protein rekombinan. Transgen dalam vektor ekspresi tumbuhan dapat dimasukkan ke dalam planlet yang ditanam secara *in vitro* baik dengan transformasi yang dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens* atau Penembakan partikel (*particle bombardment/biolostik*). Ekspresi inti melibatkan transkripsi dalam inti dan translasi di dalam sitoplasma. Ini melibatkan ekspresi antigen asing dari genom inti dan garis transgenik yang stabil dapat dikembangkan (Shadid & Daniell 2016). Garis transgenik terbaik untuk memproduksi protein selanjutnya akan diseleksi dari kumpulan garis transgenik yang ada. Dengan metode ini, protein rekombinan dapat diproduksi dalam beberapa generasi berturut-turut, karena transgen telah stabil diintegrasikan ke dalam genom tumbuhan. Model tanaman seperti *Arabidopsis thaliana* dan tembakau lebih banyak digunakan selama tahap awal transformasi genetik untuk mengembangkan transforman yang stabil [29].

Kekurangan dari sistem ini yaitu pembungkaman gen (gene silencing), risiko kontaminasi transgen melalui jaringan reproduktif, dan tingkat ekspresi rendah (Shadid & Daniell, 2016). Kerugian lebih lanjut yaitu perlunya manipulasi genetik yang memakan waktu

prosedur yang membutuhkan *silangan balik (backcrosses)* dan pemuliaan tanaman untuk ekspresi beberapa gen dan integrasi acak dari gen yang dapat mempengaruhi ekspresi secara negatif. Ini bisa diatasi dengan teknik pengeditan gen seperti CRISPR - Cas9 (Gomes, Oliveira, Vieira, & Duque, 2019; Jaganathan, Ramasamy, Sellamuthu, Jayabalan, & Venkataraman, 2018; Miki, Zhang, Zeng, Feng, & Zhu 2018).

Promotor paling populer untuk digunakan pada dikotil adalah CaMV 35S dari virus mosaik kembang kol (Ma et al., 2003), promotor konstitutif yang kuat yang dapat ditingkatkan dengan menduplikasi *enhancer region* (Kay, Chan, Daly, & McPherson, 1987). Promotor alternatif seperti maize ubiquitin - 1 promoters digunakan secara efektif pada monokotil (Ma et al., 2003; Twyman, Stoger, Schillberg, Christou, & Fischer, 2003). Beragam urutan poliadenilasi dapat digunakan, transkrip *Agrobacterium tumefaciens nos* gen, gen pea ssu dan cauliflower mosaic virus 35s merupakan contoh yang banyak digunakan (Ma et al, 2003).

2.13 Transformasi Kloroplast yang Stabil (Chloroplast Stable Transformation/Chloroplast Expression)

Ekspresi kloroplas melibatkan transformasi transgene ke dalam genom kloroplas menggunakan particle gun. Metode ini memiliki beberapa keuntungan daripada transformasi inti. Genom kloroplas lebih mudah dimanipulasi. Jika genom kloroplas sudah diurutkan, *transgene cassette* dapat dibuat untuk menyisipkan gen asing ke dalam *spacer region* diantara gen kloroplas yang fungsional, menggunakan dua *flanking sequences* pada gen kloroplas melalui rekombinasi homolog (Daniell, Lin, Yu, & Chang, 2016; Daniell, Streatfield, Streatfield, & Wycoff, 2001). Target yang presisi ini akan mencegah penempatan gen ke dalam bagian genom yang akan menghasilkan sedikit transkrip, untuk memastikan diperolehnya tingkat ekspresi yang tinggi.

Transformasi ke dalam genom kloroplas lebih sulit daripada transformasi ke inti sel, karena pada kloroplas terdapat dua membran dan kurangnya jumlah virus yang diketahui menginfeksi kloroplas. Sehingga pada transformasi kloroplas lebih lazim digunakan *gene gun* daripada menggunakan infeksi *Agrobacterium tumefaciens*.

Gene gun merupakan teknik bombardir jaringan tanaman muda dengan partikel emas atau tungsten dilapisi dengan DNA (Verma, Samson, Koya, & Daniell, 2008).

2.1 Trasient Expression

Dengan menggunakan platform ekspresi transien, produksi protein rekombinan dalam tanaman dapat ditingkatkan meningkat dengan cepat, dan jumlah miligram protein dapat diproduksi dalam jangka waktu kurang dari 4 minggu setelah menerima konstruksi gen yang sesuai [5,59,127].

2. Keunggulan Tanaman Transgenik

Kemampuan untuk meningkatkan biomassa dengan perawatan dan biaya rendah membuat tanaman transgenik menjadi sarana produksi yang menarik untuk molkules seperti karbohidrat, asam lemak, enzim industri, plastik biodegradable, dan obat-obatan. Untuk produksi

obat-obatan, tanaman memiliki keuntungan tambahan dari minimisasi mencari kontaminan virus potensial seperti human immunodeficiency virus dan hepatitis B (ref. 1–4). Contoh terbaru misalnya produksi antibodi monoklonal pada tanaman transgenik^{5,6} dan antigen manusia pada tanaman pangan transgenik yang digunakan untuk imunisasi oral [5]. Kelayakan transformasi kloroplas (transplastomic) teknologi dengan beberapa keuntungan potensial dibandingkan sistem transgenik nuklir yang ada untuk produksi protein terapeutik manusia dalam tanaman non-pangan, tembakau. Lebih lanjut, kami menunjukkan bahwa protein manusia yang disekresikan secara normal dapat diekspresikan dengan baik dalam bentuk yang aktif secara biologis pada tanaman transplastomik.

Untuk transformasi kloroplas pada tumbuhan tingkat tinggi, partikel bombardir (gene gun) digunakan untuk memasukkan transgen ke dalam kloroplas daun dimana integrasi DNA asing diarahkan secara homolog [6-9]. Sehingga lokasi penyisipan transgen dapat diprediksi dan ekspresi gen seragam. Selain itu juga mengurangi kemungkinan efek silencing dan menjaga gen tetap stabil beberapa generasi. Tanaman transplastomik juga memiliki potensi ekspresi protein rekombinan yang sangat tinggi. Selain itu manajemen transplastomik mungkin lebih sederhana daripada nuclear expression. Dalam sistem nuclear transgenic, seringkali memerlukan ekspresi protein yang kompleks dan skema penargetan untuk membatasi konsentrasi ekspresi dan mencegah modifikasi pasca- translasi yang tidak diinginkan oleh protein heterolog. Selain itu, ekspresi nuclear transgenic biasanya melibatkan penyisipan kromosomal acak, yang memerlukan screening sejumlah besar transgenik untuk menemukan garis yang dapat digunakan. Beberapa protein bakteri telah berhasil diekspresikan dalam kloroplas.

Executor(s) : Aisyah Rifa F dan Muhamad Nabil Alhanif 	Supervisor : Prof. Satya Nugroho
Date and time	15 Oktober 2020

1. Revisi makalah bab 1 dan 2.

Bab 1 : Perkuat background

Bab 2.: Revisi makalah, hanya cantumkan yang digunakan pada penelitian ini. Tidak usah melebar tinjauan pustakanya. Fokus pada sistem ekspresi yang digunakan saja.

2. Fix metode

-Target ekspresinya di chloroplast *Aloe vera*. Karena *Aloe vera* double membrane, sehingga lebih cocok jika digunakan metode particle bombardment untuk proses transformasinya.

3. Revisi makalah dari crosscheck prof.

4. Mulai mencoba bab 3 dan menyusun metodologinya

METHODOLOGY

Slide n+1:

Data:

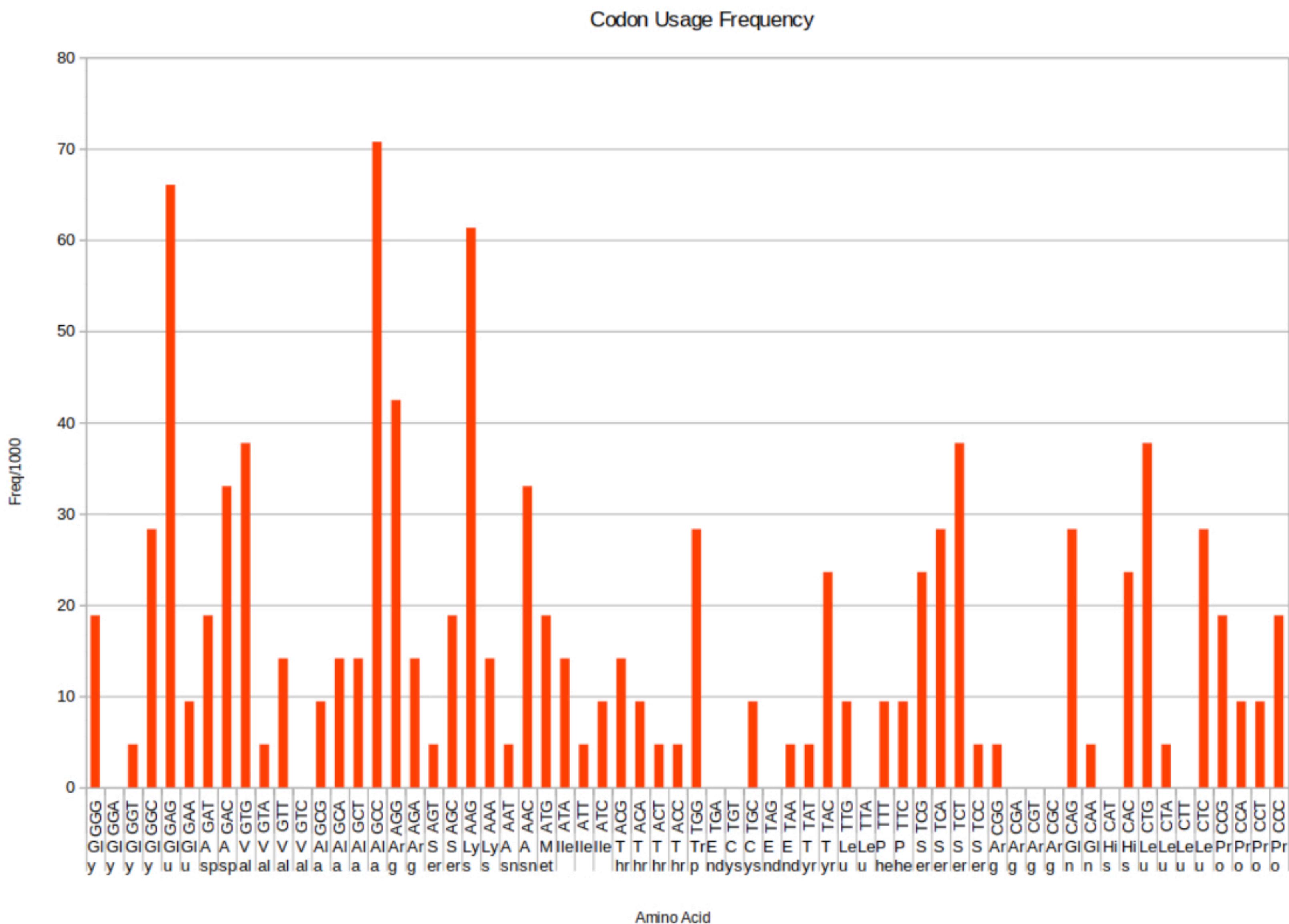
NCBI, genbank, ucsc genome browser, addgene, uniprot, kazusa

1. Genbank, UCSC Genome
 - Database genome
2. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
 - Sifat molekul, jalur metabolisme *Aloe vera*
3. Restriction Mapper 3.0
 - Pemetaan situs restriksi
4. Snapgene
 - Konstruksi vektor, PCR
5. Benchling
 - Virtual electroforesis
6. Python dnachisel
 - Optimasi kodon
7. Python biopython
 - Modul bioinformatika python
8. Jupyter Notebook
 - Modul python untuk data science

Slide n+2

Tabel 3.6.1 Codon kloroplas *Aloe vera* (gbpln) 1 CDS's (516 kodon), kazusa spesies 34199.chloroplast

chloroplast <i>Aloe vera</i> [gbpln]: 1 CDS's (516 codons)											
fields: [triplet] [amino acid] [fraction] [frequency: per thousand] ([number])											
UUU F 0.69 65.9 (34)	UCU S 0.35 34.9 (18)	UAU Y 0.91 58.1 (30)	UGU C 0.88 13.6 (7)				
UUC F 0.31 29.1 (15)	UCC S 0.08 7.8 (4)	UAC Y 0.09 5.8 (3)	UGC C 0.12 1.9 (1)				
UUA L 0.33 38.8 (20)	UCA S 0.31 31.0 (16)	UAA * 0.00 0.0 (0)	UGA * 1.00 1.9 (1)				
UUG L 0.18 21.3 (11)	UCG S 0.10 9.7 (5)	UAG * 0.00 0.0 (0)	UGG W 1.00 11.6 (6)				
CUU L 0.28 32.9 (17)	CCU P 0.36 9.7 (5)	CAU H 0.89 46.5 (24)	CGU R 0.15 11.6 (6)				
CUC L 0.05 5.8 (3)	CCC P 0.14 3.9 (2)	CAC H 0.11 5.8 (3)	CGC R 0.05 3.9 (2)				
CUA L 0.15 17.4 (9)	CCA P 0.29 7.8 (4)	CAA Q 0.74 27.1 (14)	CGA R 0.38 29.1 (15)				
CUG L 0.02 1.9 (1)	CCG P 0.21 5.8 (3)	CAG Q 0.26 9.7 (5)	CGG R 0.08 5.8 (3)				
AUU I 0.58 50.4 (26)	ACU T 0.44 15.5 (8)	AAU N 0.80 38.8 (20)	AGU S 0.14 13.6 (7)				
AUC I 0.16 13.6 (7)	ACC T 0.22 7.8 (4)	AAC N 0.20 9.7 (5)	AGC S 0.02 1.9 (1)				
AUA I 0.27 23.3 (12)	ACA T 0.22 7.8 (4)	AAA K 0.81 40.7 (21)	AGA R 0.28 21.3 (11)				
AUG M 1.00 11.6 (6)	ACG T 0.11 3.9 (2)	AAG K 0.19 9.7 (5)	AGG R 0.05 3.9 (2)				
GUU V 0.48 19.4 (10)	GCU A 0.50 13.6 (7)	GAU D 0.87 25.2 (13)	GGU G 0.45 9.7 (5)				
GUC V 0.10 3.9 (2)	GCC A 0.07 1.9 (1)	GAC D 0.13 3.9 (2)	GGC G 0.09 1.9 (1)				
GUA V 0.38 15.5 (8)	GCA A 0.29 7.8 (4)	GAA E 0.85 44.6 (23)	GGA G 0.18 3.9 (2)				
GUG V 0.05 1.9 (1)	GCG A 0.14 3.9 (2)	GAG E 0.15 7.8 (4)	GGG G 0.27 5.8 (3)				



Grafik 3.6.1 Frekuensi Codon Usage kazusa spesies 34199.chloroplast

Slide n+3

Sequence proinsulin yang kami inginkan berada dalam dua exon berbeda, yang pertama pada basa 239..425, dan yang kedua pada basa 1213..1358, yang dipisahkan oleh intron sepanjang 787 bp. Untuk mendapatkan sequence proinsulin yang tidak terpisah oleh intron, kami memutuskan untuk melakukan langkah langkah berikut:

1. Transkripsi ke RNA
 2. Splicing
 3. Reverse Transcriptase PCR ke DNA

Setelah langkah-langkah diatas selesai, akan didapatkan sequence berikut:

239 at

241 ggccctgtgg atgcgcctcc tgcccctgct ggcgctgctg gccctctggg gacctgaccc

301 agccgcagcc tttgtgaacc aacacctgtg cggctcacac ctggtggaag ctctctacct

361 agtgtgcggg gaacgaggct ttttctacac acccaagacc cgccgggagg caga

421 gcaggtggggcag gtggagctgg gcgggggccc tggtgcaggc agcctgcagc

1261 ccttggccct ggaggggtcc ctgcagaagc gtggcat

1321 tctgctccct ctaccagctg gagaactact gcaactag

Hasil optimasi berdasarkan codon usage table diatas adalah sebagai berikut:

ATGGCCCTGTGGATGAGGCTGCTGCCCTGCTGGCCCTGCTGGCCCTGT
GGGGCCC GGACCC CGCCGC CTT GTGAACCAGCAC CTGT GCGGCTC
TCACCTGGTGGAGGCCCTGTACCTGGTGTGCGGCGAGAGGGGCTCTTC
TACACGCCAAGACGAGGAGGGAGGCCGAGGACCTGCAGGTGGCCA
GGTGGAGCTGGCGGCCGCCGGCGCCGGCTCTGCAGCCCCTGGC
CCTGGAGGGCTCTGCAGAACAGAGGGCATAGTGGAGCAGTGCTGCAC
GTCTATATGCTCTGTACCAAGCTGGAGAACTACTGCAACTAA

slide n+4

Alignment sequence sebelum dan sesudah sequence:

NP_001278826.	1	ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTGT 	50
NP_001278826.	1	ATGGCCCTGTGGATGAGGCTGCTGCCCTGCTGGCCCTGCTGGCCCTGTG	50
NP_001278826.	51	GGGACCTGACCCAGCCGCAGCCTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCAC 	100
NP_001278826.	51	GGGCCGGACCCCGCCGCCCTTGTGAACCAGCACCTGTGCGGCTCTC	100
NP_001278826.	101	ACCTGGTGGAAAGCTCTACCTAGTGTGCGGGAACGAGGCTTCTTCTAC 	150
NP_001278826.	101	ACCTGGTGGAGGCCCTGTACCTGGTGTGCGGCGAGAGGGGCTTCTTCTAC	150
NP_001278826.	151	ACACCCAAAGACCCGCCGGAGGCAGAGGACCTGCAGGTGGGGCAGGTGGA 	200
NP_001278826.	151	ACGCCCAAGACGAGGAGGGAGGCCGAGGACCTGCAGGTGGGCCAGGTGGA	200
NP_001278826.	201	GCTGGCGGGGGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCCTGGCCCTGGAGG 	250
NP_001278826.	201	GCTGGCGGCCGCCGGCGCCGGCTCTGCAGCCCTGGCCCTGGAGG	250
NP_001278826.	251	GGTCCCTGCAGAACGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTACAGCATCTGC 	300
NP_001278826.	251	GCTCTCTGCAGAACAGAGGGCATAGTGGAGCAGTGCTGCACGTCTATATGC	300
NP_001278826.	301	TCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG	333
NP_001278826.	301	TCTCTGTACCAAGCTGGAGAACTACTGCAACTAA	333

Gambar 3.6.12 Pairwise alignment sequence proinsulin sebelum dan sesudah optimasi kodon

Alignment hasil translasi sebelum dan sesudah optimasi:

NP_001278826.	1	MALWMRLLPPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFY	50
NP_001278826.	1	MALWMRLLPPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFY	50
NP_001278826.	51	TPKTRREAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALE GSLQKRGIVEQCCTSIC	100
NP_001278826.	51	TPKTRREAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALE GSLQKRGIVEQCCTSIC	100
NP_001278826.	101	SLYQLENYCN*	111
NP_001278826.	101	SLYQLENYCN*	111

Gambar 3.6.3 Pairwise alignment hasil translasi sebelum dan sesudah optimasi kodon

slide n+5

Tahap tahap yang kami lakukan adalah sebagai berikut:

1. Menambahkan restriction site pada kedua ujung gene of interest dengan PCR;
2. Elektroforesis virtual hasil PCR dengan benchling;
3. Melakukan insertion cloning.

Tahap 1:

Kami melakukan PCR virtual dalam snapgene untuk menghasilkan gen yang diapit oleh enzim restriksi. Primer yang kami gunakan didesain otomatis oleh snapgene.

Berikut adalah list primer yang kami gunakan:

1. psbA Promoter
 - a. Forward: 5'-(KpnI)ATGACCGCGATTCTGGAACG-3'
 - b. Reverse: 5'-(BamHI)GCCGTTGGTGCTCGGC-3'
2. Proinsulin
 - a. Forward: 5'-(BamHI)ATGGCCCTGTGGATGAGGC-3'
 - b. Reverse: 5'-(SphI)TTAGTTGCAGTAGTTCTCCAGCTGGT-3'
3. NOS Terminator
 - a. Forward:
5'-(SphI)GATCGTTCAACATTTGGCAATAAGTTCTTAAGA-3'
 - b. Reverse: 5'-(HindIII)GATCTAGAACATAGATGACACCGCGC-3'

Tahap 2:

Setelah PCR selesai, kami melakukan elektroforesis dan virtual digest dengan bantuan benchling. Hasil dari virtual digest adalah sebagai berikut:

Enzymes	Cuts	Temp.	1.1	2.1	3.1	4/CS
BamHI	1	37°C	75*	100*	100	100*
KpnI	1	37°C	100	75	10	50*

Start	End	Length	Left Cutter	Left Overhang	Right Cutter	Right Overhang
1	5	5	None	blunt	KpnI	3'
6	1066	1061	KpnI	3'	BamHI	5'
1067	1071	5	BamHI	5'	None	blunt

Gambar 3.6.3 Virtual digest psbA Promoter dengan enzim BamHI dan Kpn I (Benchling)

Enzymes	Cuts	Temp.	1.1	2.1	3.1	4/CS
BamHI	1	37°C	75*	100*	100	100*
SphI	1	37°C	100	100	50	100

Start	End	Length	Left Cutter	Left Overhang	Right Cutter	Right Overhang
1	1	1	None	blunt	BamHI	5'
2	344	343	BamHI	5'	SphI	3'
345	345	1	SphI	3'	None	blunt

Gambar 3.6.4 Virtual digest Proinsulin dengan enzim BamHI dan SphI (Benchling)

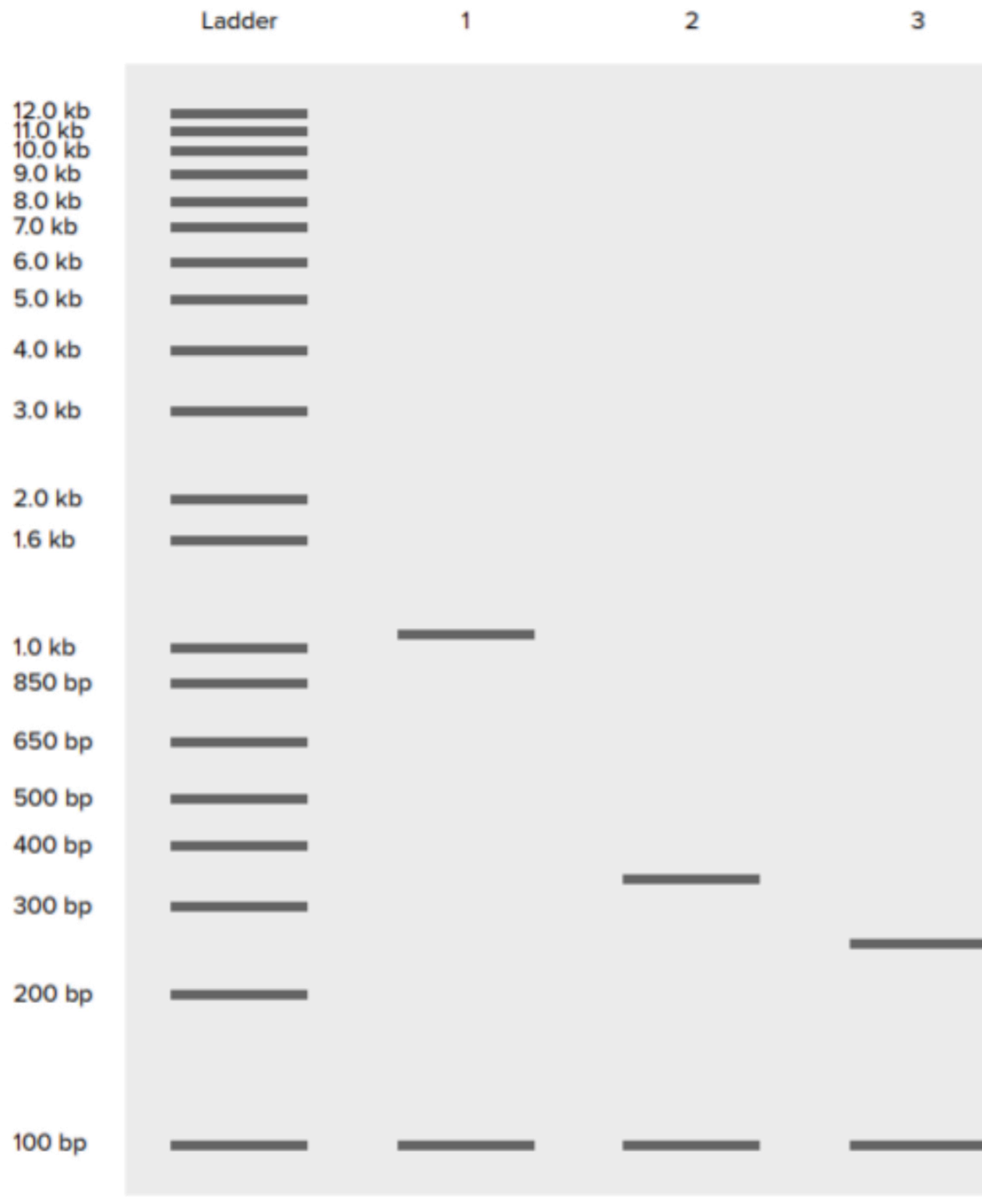
Enzymes	Cuts	Temp.	1.1	2.1	3.1	4/CS
HindIII	1	37°C	25	100	50	50
SphI	1	37°C	100	100	50	100

Start	End	Length	Left Cutter	Left Overhang	Right Cutter	Right Overhang
1	5	5	None	blunt	SphI	3'
6	260	255	SphI	3'	HindIII	5'
261	265	5	HindIII	5'	None	blunt

Gambar 3.6.5 Virtual digest NOS Terminator dengan enzim HindIII dan SphI (Benchling)

Hasil dari elektroforesis virtual:

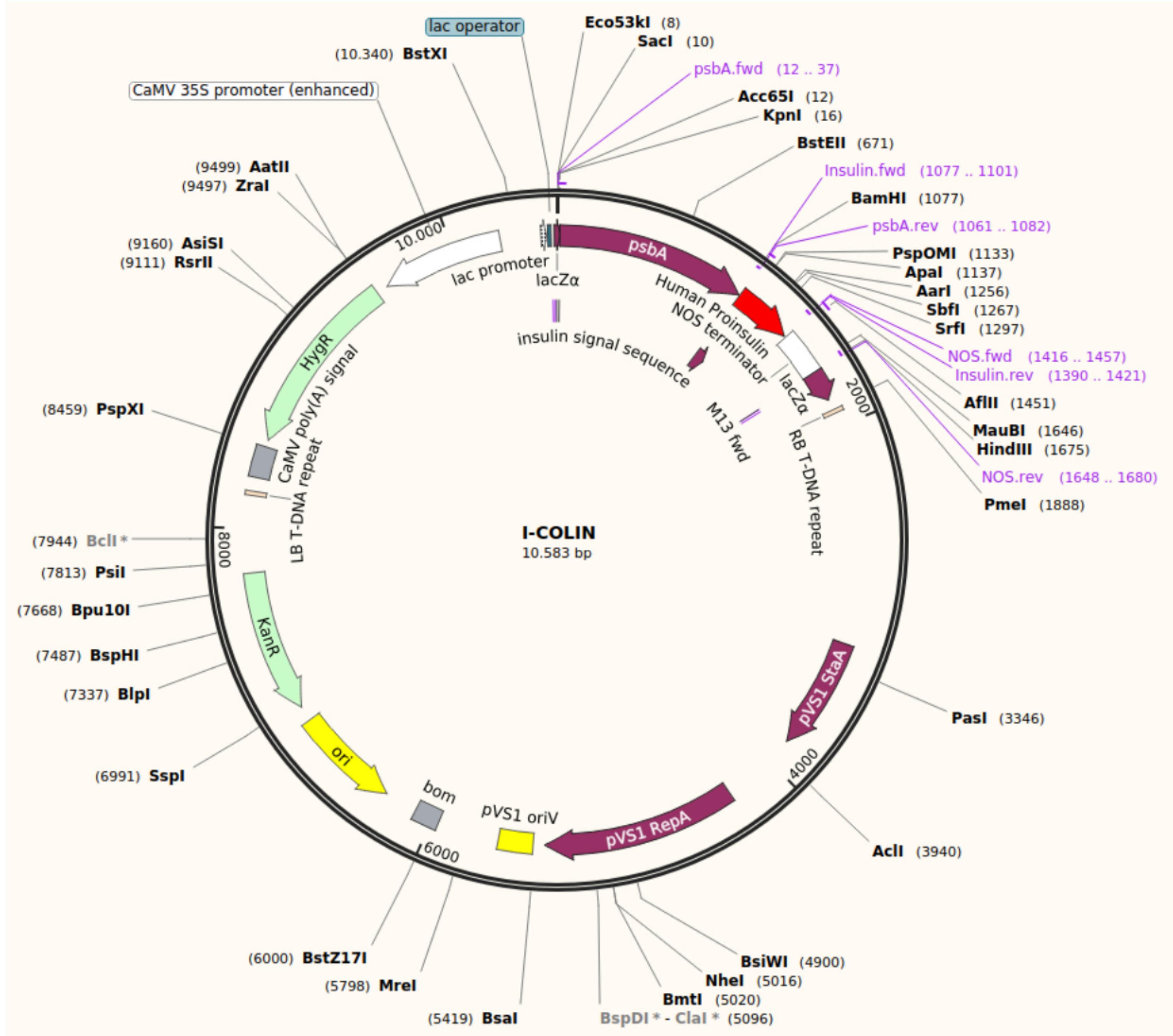
Ladder	Life 1 kb Plus
1	psbA Promoter - BamHI KpnI
2	Optimized Human Insulin - BamHI SphI
3	NOS Terminator - HindIII SphI



Gambar 3.6.6 Elektroforesis virtual promoter psbA, insulin, NOS (benchling)

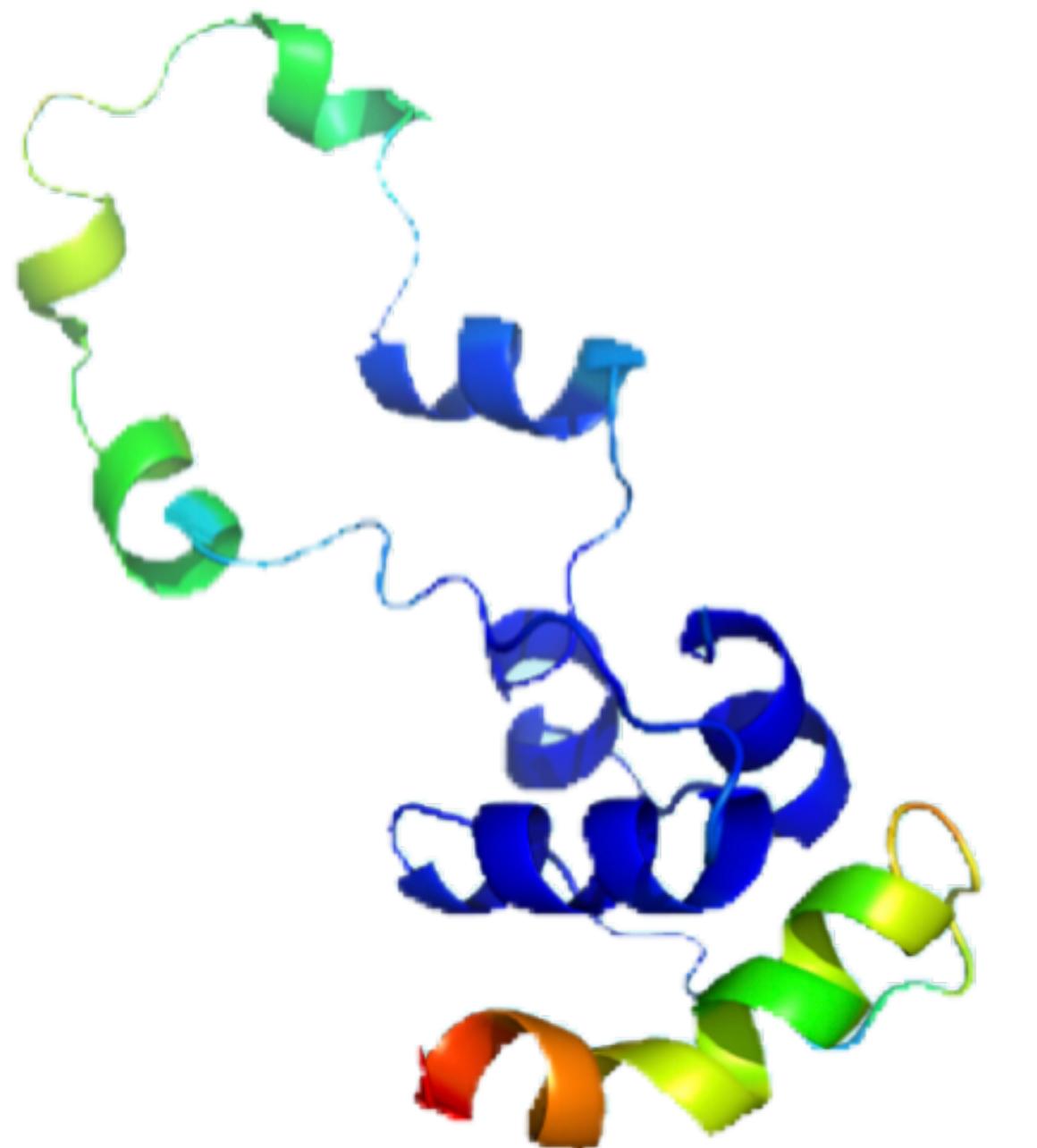
Tahap 3:

Setelah virtual digest dan elektroforesis selesai, kami menggabungkan ketiga sequence dengan pCAMBIA menggunakan insertion cloning dengan bantuan software snapgene.

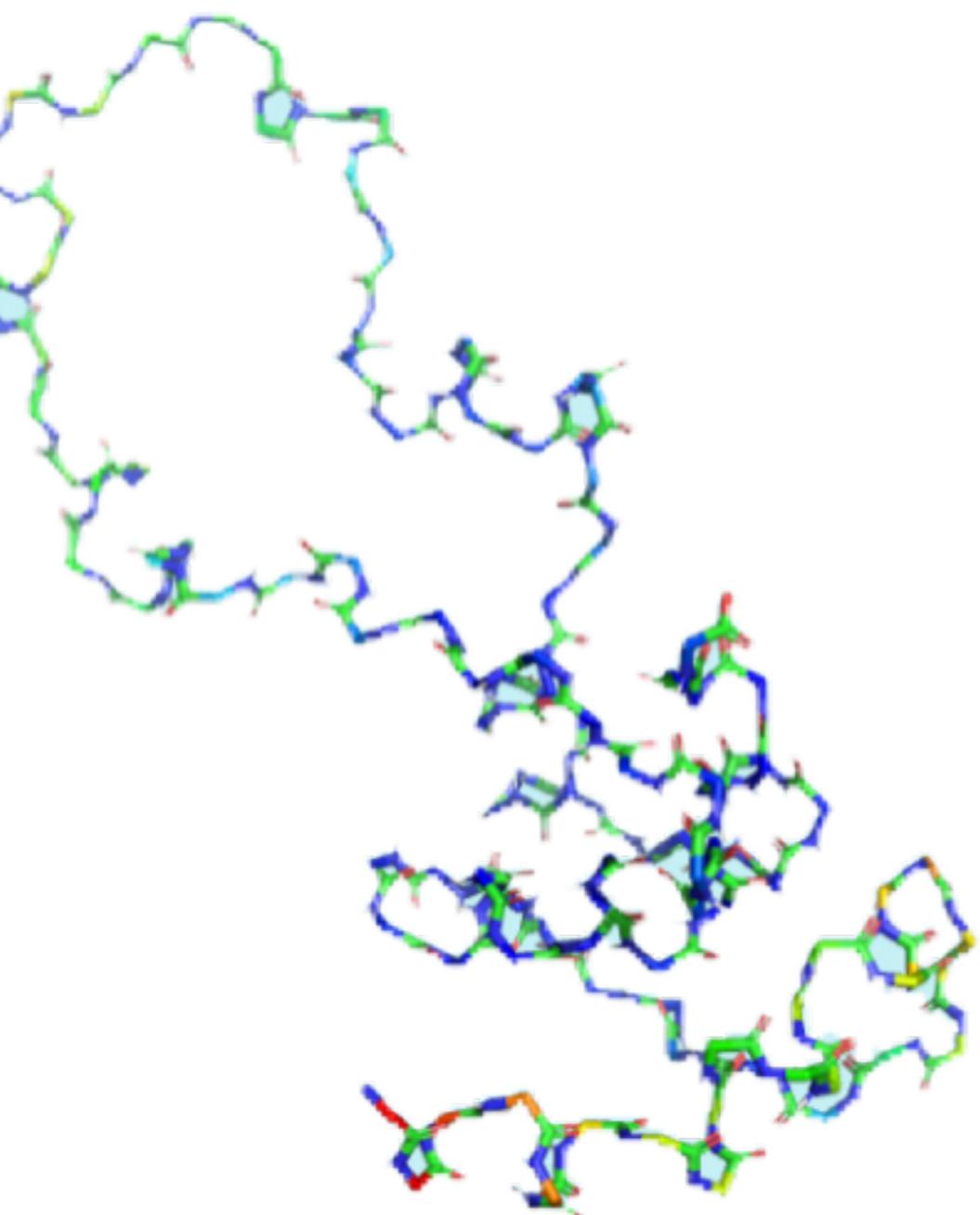


Gambar 3.6.7 Plasmid akhir hasil insertion cloning (Benchling)

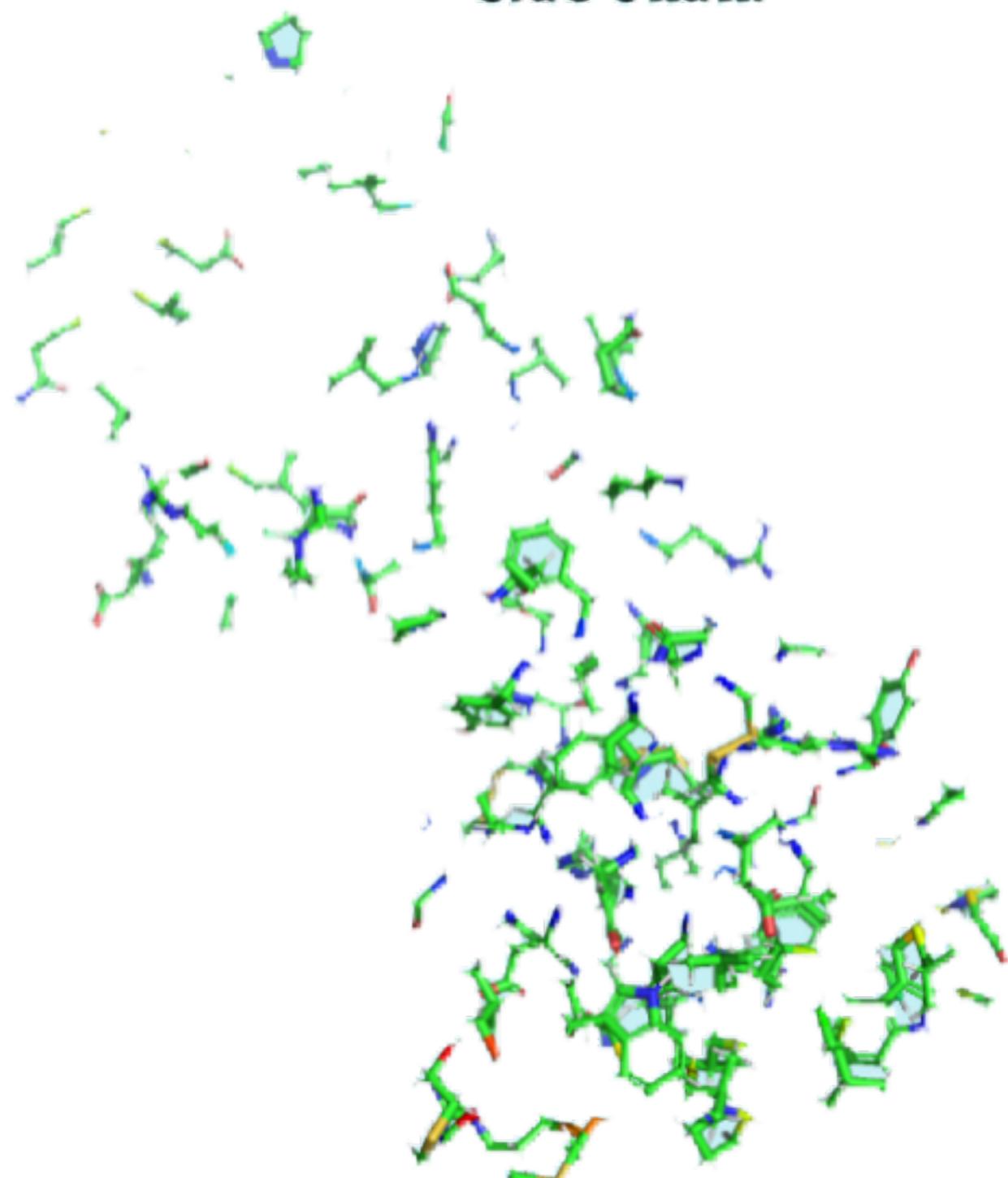
Transgenic Proinsulin



Main Chain



Side Chain



Executor(s) : Aisyah Rifa F dan Muhamad Nabil Alhanif 	Supervisor : Prof. Satya Nugroho
Date and time	15 Oktober 2020

1. Revisi makalah bab 1 dan 2.

Bab 1 : Perkuat background

Bab 2.: Revisi makalah, hanya cantumkan yang digunakan pada penelitian ini. Tidak usah melebar tinjauan pustakanya.

Fokus pada sistem ekspresi yang digunakan saja.

2. Fix metode

-Target ekspresinya di chloroplast *Aloe vera*. Karena *Aloe vera* double membrane, sehingga lebih cocok jika digunakan metode particle bombardment untuk proses transformasinya.

3. Revisi makalah dari crosscheck prof.

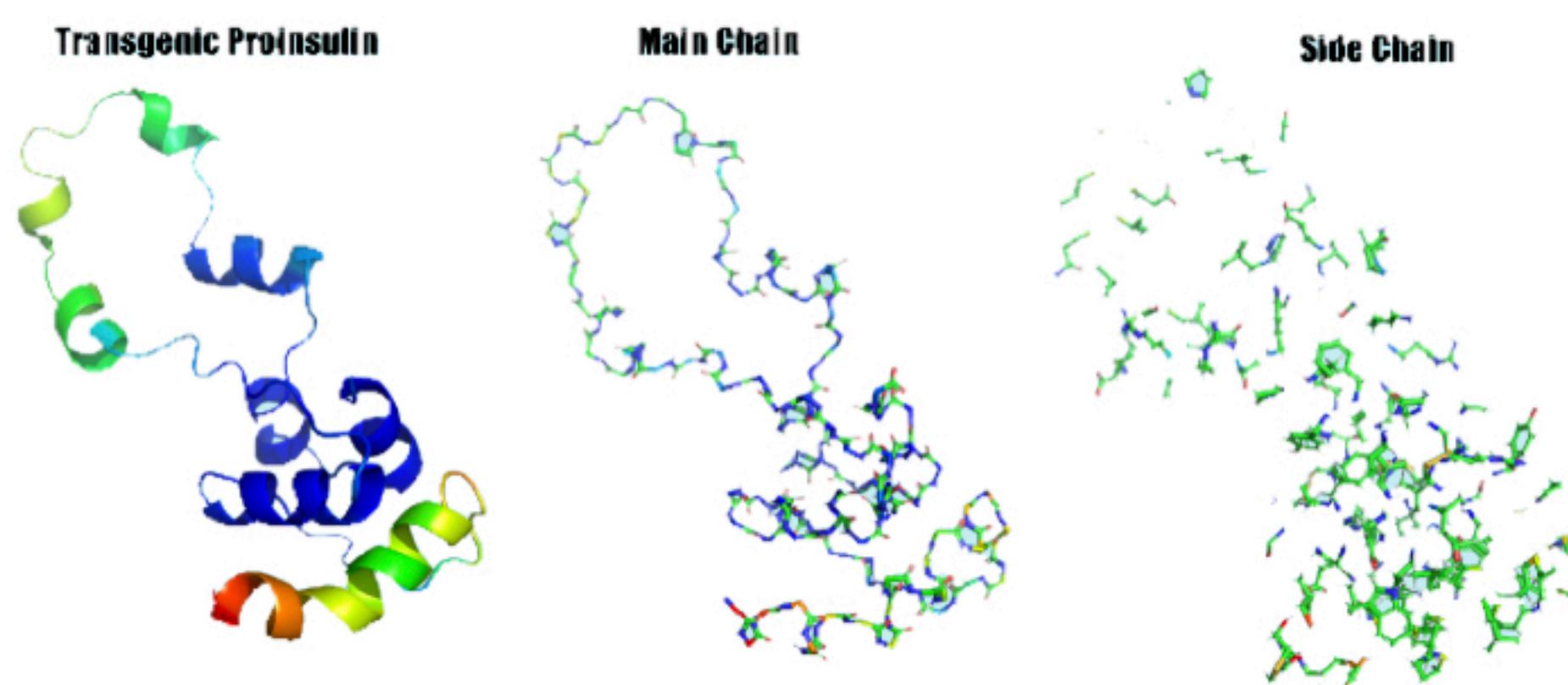
4. Mulai mencoba bab 3 dan menyusun metodologinya

5. Mengumpulkan banyak data dari berbagai sumber

6. Searching software yang cocok digunakan sebagai simulasi

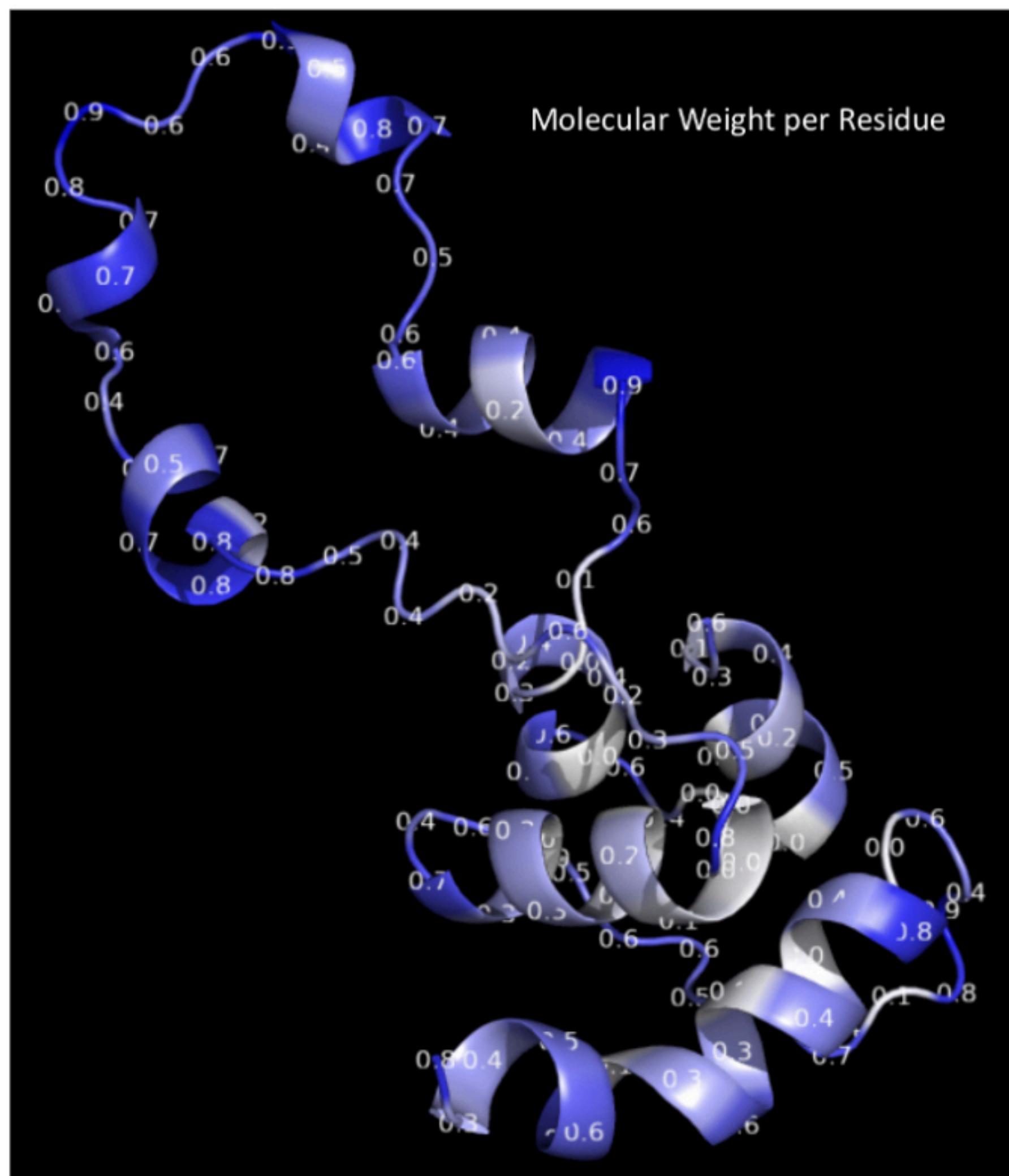
|

1. Sudah fix bab 1 dan 2
2. Fokus ke metodologi
 - Mengumpulkan dari sumber data
 - Mencoba berbagai software
 - promoter : psbA
 - Nos terminator
3. Hasil analisis software di atas
4. Analisis data dan 3D picture nya



3D model made with pymol and robbetta.bakerlab.org
The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4 Schrödinger, LLC.

Analisis Data



- ❖ 1671 Atoms
- ❖ Formal Charges: -4
- ❖ Partial Charges: 0.0000
- ❖ 12442.948 Angstroms² Molecular Surface Area
- ❖ 8148.517 Angstroms² Solvent Accessible Surface Area
- ❖ Explicit Molecular Weight: 11971.7169 u
- ❖ Molecular Weight with Missing Hydrogen: 11972.7248 u