



PROPOSAL PENELITIAN LKIR LIPI (STH)

**I-COLIN (IN SILICO DESIGN OF proINSULIN) PRODUCTION IN
TRANSGENIC *Aloe vera* CHLOROPLAST USING PARTICLE
BOMBARDMEN”**

Disusun Oleh :

**Aisyah Rifa Fadhilah
Muhamad Nabil Alhanif**

**Bidang Lomba Penelitian :
STH**

Nama Sekolah :

SMA Kharisma Bangsa

Kota, Provinsi :

Tangerang Selatan, Banten

Tahun 2020

Lembar Pengesahan

**Judul : I-COLIN (IN SILICO DESIGN OF proINSULIN) PRODUCTION
IN TRANSGENIC *Aloe vera* CHLOROPLAST USING PARTICLE
BOMBARDMEN”**

**Nama Penulis : -Aisyah Rifa Fadhilah
-Muhamad Nabil Alhanif**

Mengetahui,

Kepala Sekolah Kharisma Bangsa,

Imam Husnan Nugroho, S.T,M.Pd.

Pembimbing,

Dr. Satya Nugroho.
Dessy Norma Juita, M.Pd.

Kata Pengantar

Puji dan syukur kami panjatkan kepada Allah SWT atas berkat dan rahmat-Nya kami dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul **I-COLIN (IN SILICO DESIGN OF proINSULIN) PRODUCTION IN TRANSGENIC *Aloe vera* CHLOROPLAST USING PARTICLE BOMBARDMENT”**

Laporan penelitian ini dibuat dalam rangka mengikuti perlombaan LKIR LIPI -52 yang diselenggarakan oleh LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia).

Proposal makalah ilmiah ini telah kami susun dengan maksimal dan mendapatkan bantuan dari berbagai pihak sehingga dapat memperlancar pembuatan makalah ini. Untuk itu, kami menyampaikan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam pembuatan proposal ini.

Ucapan terima kasih kami berikan kepada :

- Bapak Dr.Satya Nugroho (Mentor karya ilmiah LIPI)
- Bapak Aris Setyawan S.Si (koordinator tim karya ilmiah Kharisma Bangsa)
- Ibu Dessy Norma Juita, M.Pd (guru pembimbing) atas dukungan, bimbingan dan bantuannya.
- Orang tua, guru dan teman teman yang telah memberi kami dukungan, dorongan dan bantuannya.

Akhir kata, kami menyadari proposal penelitian ini masih jauh dari sempurna, untuk itu kami mengharapkan kritik dan saran yang membangun agar proposal ini dapat diselesaikan dan direalisasikan serta dapat bermanfaat bagi masyarakat dan lingkungan.

Tangerang Selatan, 2 November 2020

Table of Contents

Kata Pengantar	3
Table of Contents	4
ABSTRAK	8
BAB 1	9
Pendahuluan	9
1.1 Latar Belakang	9
1.2 Rumusan Masalah	12
1.3 Batasan Masalah	12
1.4 Tujuan Penelitian	13
1.5 Kebaruan	13
1.6 Hipotesis	13
1.7 Manfaat Penelitian	14
BAB II	15
TINJAUAN PUSTAKA	15
2.1 Metode Penelitian	15
2.2 Diabetes	16
2.2.1 Tipe Diabetes	16
1. Diabetes Tipe 1	16
2. Diabetes Tipe 2	16
3. Gestational diabetes (GDM)	17
2.2.2 Jumlah Penderita Diabetes	17
2.3 Insulin	19
2.3.1 Sintesis Insulin	21
2.3.2 Jalur Sekresi Insulin detail	22
2.3.3 Produksi Insulin Konvensional	23
2.3.4 Produksi Insulin Rekombinan	24
Escherichia coli	24
Ragi	26
Tanaman Transgenik	27
2.3.5 Perbandingan Persentase Produksi Insulin Rekombinan	28
2.3.6 Ekstraksi Protein	28
Trichloroacetic acid (TCA)–acetone Precipitation Method	30

Phenol Extraction with methanol/ammonium acetate precipitation Method	31
2.4 Biopharming	34
2.4.1 Kenapa kami menawarkan tanaman ketimbang E.Coli:	36
Pada E. coli:	36
Keuntungan:	36
Kelemahan:	36
Pada tanaman transgenik:	36
2.4.2 Alasan menggunakan Aloe vera dibandingkan tumbuhan lain:	37
2.4.3 Alasan menggunakan particle bombardment:	37
2.5 Sistem/Platform Ekspresi	37
Tanaman sebagai biofaktori untuk ekspresi protein heterolog	39
2.6. Tipe Ekspresi	40
2.6.1 Ekspresi Kloroplas	41
Keuntungan dari Transformasi Kloroplas	41
Organisasi Genom Kloroplas : Konsep dari Transformasi Kloroplas	42
Regulasi dari Ekspresi Gen Kloroplas	44
2.7 Metode Transformasi	44
2.7.1 Metode Transformasi Tidak Langsung	44
Transformasi yang dimediasi Agrobacterium tumefaciens	44
2.7.2 Metode Transformasi Langsung	45
Transformasi yang dimediasi Particle Bombardment	45
Aplikasi	46
Keunggulan	46
2.8 Desain Konstruksi Biolistik	47
2.8.1 Promoter	47
2.8.2 Polyadenylation	49
2.8.3 Terminator :	49
2.8.4 Marker gene (Gen Penanda)	50
Selectable Marker	50
Hygromycin phosphotransferase (HPT) (hpt)	50
2.9 Memilih Tanaman Model	51
2.9.1 Aloe vera	51
Fisiologi Aloe vera	51
Metabolisme	51
Transformasi dan Rekayasa genetik	52
Kandungan Nutrisi	54
Persebaran Aloe vera	55
Manfaat Aloe vera	55
Pengobatan Tradisional	55
Produk Kesehatan	56
Produk Kosmetik	56
Budidaya Aloe vera	56

Lahan Penanaman	56
Benih, Penanaman, dan Pemeliharaan	57
Pemanenan	57
Hasil Panen	58
2.10 Substansi Genetik Aloe vera	58
2.10.1 Sekuensing dari genome Aloe vera dan transcriptome	61
2.10.2 Genome Kloroplas Aloe vera	61
2.10.3 Aloe vera Menjadi Kandidat yang Cocok untuk Penelitian Ini	62
2.11 Enzim Restriksi dan Ligase	63
2.11.1 Enzim Restriksi	63
Situs Restriksi	63
Tipe	65
Tipe IV	65
2.11.2 Enzim Ligase	66
Mekanisme Enzimatik	66
Tipe	66
E. coli	66
T4	67
2.12 RT PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)	67
Prinsip kerja:	69
Aplikasi:	69
2.13 PCR	69
2.13.1 Primer	70
Melting Temperature	71
Annealing Temperature	71
Panjang Primer	71
Kandungan GC Primer	72
Komplementasi Forward dan Reverse Primer	72
2.13.2 Langkah Langkah PCR	72
1. Denaturasi	73
2. Annealing	73
3. Elongasi	73
2.13.3 Primer3	73
Cara Penggunaan Primer3	73
2.13.4 UGENE In-Silico PCR	76
Langkah-langkah PCR In-Silico	77
2.14 Sekuensing	79
2.14.1 Maxam-Gilbert Sequencing	80
2.14.2 Sanger Sequencing	81
2.15 Elektroforesis	81
2.16 Western Blot	82

2.17 ELISA	83
BAB 3	86
METODOLOGI	86
3.1 In Silico	86
3.2 Data dan Metode Analisis	86
3.3 Prosedur	86
3.4 Mengidentifikasi dan Mengumpulkan informasi	87
3.5 Mengobservasi dan Mengumpulkan Data Konstruksi	88
3.6 Langkah-Langkah In silico	88
3.6.1 Identifikasi situs restriksi	89
3.6.2 Optimasi Kodon Proinsulin dengan dnachisel	90
3.6.3 Optimisasi PCR	93
3.6.4 Konstruksi transgen menggunakan snapgene	94
Tahap 1:	94
Tahap 2:	95
Tahap 3:	97
Bab 4	99
Hasil dan Pembahasan	99
4.1 Mengidentifikasi dan Mengumpulkan informasi	99
4.2 Mengobservasi dan Mengumpulkan Data Konstruksi	99
4.3 Desain Detail dari Eksperimen	99
4.3.1 Menyiapkan Material dari Tanaman	102
-Kultur Jaringan	102
4.3.2 Mengisolasi gen dan melakukan PCR	102
4.3.3 Optimasi kodon	103
4.3.4 Mengkonstruksi Vektor, Kloning, dan Amplifikasi	103
4.3.5 Transformasi Aloe vera	103
4.3.6 Identifikasi Organisme Transgenik	104
4.3.7 Penanaman	104
4.3.8 Mengekstraksi dan Purifikasi Protein dari sel tanaman	104
4.3.9 Analisis Immunoblot	104
4.3.10 Tes Reseptor Insulin Manusia	105
Bab 5	106
Kesimpulan dan Saran	106
5.1 Kesimpulan	106
5.2 Saran	106
Referensi	107

Aisyah Rifa Fadhilah dan Muhamad Nabil Alhanif
Sekolah Kharisma Bangsa, Tangerang Selatan, Banten, (021) 7427122
email: aisyahrifaf08@gmail.com
email: nabilalhanif03@gmail.com

ABSTRAK

Diabetes merupakan penyakit yang berpotensi tinggi menjadi pembunuh. Seiring dengan meningkatnya penderita diabetes, maka permintaan atas insulin akan meningkat. Selain itu, peneliti juga mengembangkan teknologi baru sebagai alternatif pemberian insulin untuk mengurangi rasa sakit penderita diabetes saat menyuntikkan insulin ke dalam tubuh. Salah satunya adalah oral insulin yang dimasukkan ke dalam tubuh melalui mulut. Namun sayang, cara alternatif pemberian insulin ini membutuhkan dosis yang lebih tinggi dibandingkan cara konvensional. Sehingga, diprediksikan akan terjadi peningkatan pesat permintaan insulin dan kebutuhan untuk menemukan cara produksi insulin baru yang lebih efisien dan lebih terjangkau. Keterbatasan jumlah produksi, ditambah dengan permintaan tinggi konsumen tentunya akan menaikkan harga insulin pasaran. Oleh karena itu, kami mengembangkan teknik produksi insulin baru untuk meningkatkan efisiensi serta produksi insulin, yaitu *Aloe vera* transgenik yang didesain untuk menghasilkan insulin. Dengan menggunakan teknik ini, insulin prekursor manusia rekombinan akan diekspresikan ke dalam kloroplas *Aloe vera* menggunakan teknik *particle bombardment*, yang diharapkan akan menghasilkan produk signifikan pada *Aloe vera* transgenik. Kehadiran insulin (protein) akan dianalisis menggunakan ELISA, western blot, dan lain lain. Namun pada penelitian ini, kami akan berfokus pada simulasi in-silico berupa computing, pengolahan dan analisis data, serta rancangan penelitian in-vivo yang diharapkan nantinya dapat menjadi bahan pertimbangan sebelum dan perbandingan setelah eksperimen in vivo.

Kata Kunci : In silico, computing, diabetes, insulin, *Aloe vera*, kloroplas, *particle bombardment*.

BAB 1

Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Diabetes merujuk kepada penyakit kronis akibat gangguan metabolisme gula yang mengakibatkan penderitanya memiliki kadar gula darah tinggi. Sekitar 9,3% persen populasi orang dewasa di seluruh dunia menderita diabetes. Angka ini diprediksi akan meningkat melebihi 11% pada 2045.

Diabetes dapat berujung pada berbagai komplikasi kesehatan serius seperti penyakit kardiovaskular, penyakit ginjal kronis, stroke, dan kematian. Bahkan, saat ini diabetes menempati urutan 10 besar penyebab kematian terbanyak secara global, dan merupakan penyebab kematian terbesar ketiga di Indonesia (WHO 2017) [1].

Sampai dengan saat ini, terapi insulin merupakan satu-satunya pengobatan yang efektif untuk diabetes tipe 1, dan umumnya diabetes tipe 2 apabila penyakit berlanjut. Terapi insulin memerlukan pemantauan gula darah teratur, dan injeksi insulin untuk mencegah komplikasi sekunder.

Namun, harga insulin yang tinggi, dan ketidaknyamanan pasien saat injeksi, menyebabkan beberapa pasien tidak patuh pada terapi insulin. Oleh karena itu, peneliti sedang mengembangkan teknologi teknologi baru untuk mengurangi ketidaknyamanan pasien saat terapi insulin. Contohnya adalah melalui paru-paru, mulut dan, hidung (Modi et al, 2002; Goldberg Dan Gomez-Orellana, 2003; Cefalu, 2004).

Insulin oral menggunakan kapsul untuk mencegah rusaknya insulin oleh sistem pencernaan. Adapun kapsul yang digunakan berupa alginate/chitosan, solid lipid nanoparticle, dan lain-lain. (Sarmento, Ribeiro, dkk, 2007; Sarmento, Martins, dan Souto, 2019).

Namun oral insulin, dan beberapa teknologi baru lainnya membutuhkan dosis tinggi untuk mencapai kinerja yang sama dengan insulin suntik. Masalah ini, ditambah dengan meningkatnya penderita diabetes, diprediksi akan menurunkan akses terhadap insulin. Hal lain yang ikut berperan dalam penurunan akses terhadap insulin adalah pola hidup

tidak sehat, seperti terlalu banyak mengkonsumsi junk food (Lancet Diabetes and Endocrinology, 2018).

Jumlah insulin yang dibutuhkan untuk mengobati diabetes tipe 2 diproyeksikan meningkat lebih dari 20 persen di seluruh dunia selama 12 tahun ke depan dari 406 juta botol 1000 unit saat ini menjadi 511 juta botol 1000 unit pada 2030. Pada saat yang sama, penggunaan insulin global juga diproyeksikan meningkat menjadi 634 juta botol 1000 unit pada tahun 2030 dari 526 juta botol 1000 unit saat ini. Pada 2030 mendatang, diprediksikan hanya setengah dari total jumlah penderita diabetes yang mendapatkan akses insulin, dengan kata lain insulin akan mengalami kelangkaan.

Selain itu, perawatan diabetes memakan biaya yang besar. Diperkirakan, pada tahun 2007, biaya pengobatan diabetes di Amerika mencapai \$174 miliar. \$116 miliar diantaranya adalah untuk pengeluaran medis berlebih, yang terdiri dari \$27 miliar perawatan langsung, \$58 miliar mengobati komplikasi diabetes, dan \$31 miliar pengobatan medis umum. Diperkirakan \$1 dari setiap \$10 digunakan untuk perawatan terkait diabetes (American Diabetes Association, 2008). Biaya ini diproyeksikan akan mencapai \$216 sampai \$396 pada tahun 2025 (Giannini et al., 2009).

Banyak negara berkembang yang menghabiskan lebih dari 50% biaya tahunannya untuk insulin dan pengobatan penyakit terkait diabetes, dan biaya insulin dapat mencapai lebih dari \$100 per bulannya (Raab et al., 2004).

Keterbatasan ekonomi dan kapasitas produksi tentunya akan menyebabkan masalah besar apabila tidak segera ditangani. Permintaan saat ini untuk produksi insulin sudah melampaui kapasitas industri. Industri sudah diprediksikan akan perlu meningkatkan kapasitasnya untuk mengatasinya perkiraan permintaan yang banyak di masa depan. Namun, fasilitas produksi untuk insulin mahal dan biasanya membutuhkan waktu lama untuk membuatnya. Oleh karena itu, ada kebutuhan akan metode produksi lebih murah dan dapat mengurangi waktu yang dibutuhkan untuk meningkatkan produksi.

Beberapa metode produksi insulin dari bakteri dan hewani digunakan. Namun, hal ini seringkali menimbulkan risiko kesehatan akibat dari penyakit. Risiko tersebut dapat timbul dari kontaminasi silang dengan penyakit yang dapat mempengaruhi hewan dan pengguna akhir contohnya pasien. Dengan demikian, ada kebutuhan metode produksi yang dapat mengeliminasi kemungkinan kontaminasi silang antara produksi oleh organisme dan pengguna akhir (pasien). Selain itu, metode konvensional menghasilkan

insulin dari E.coli diprediksikan tidak mencukupi peningkatan permintaan akan insulin di masa depan, sehingga diperlukan metode tambahan sebagai salah satu solusi.

Selain itu, banyak metode produksi saat ini memerlukan pemrosesan ekstensif untuk mengekstrak protein terapeutik dari hewan atau organisme lain yang lain di mana ia berada yang dapat diproduksi dan membuat senyawa tersebut berada dalam kondisi yang dapat dimanfaatkan oleh pasien. Setelah pemurnian, protein dapat digabungkan dengan bahan pembantu atau bahan pembawa lainnya untuk menstabilkan protein sehingga dapat digunakan oleh pasien. Namun, proses ekstraksi, pemurnian, resuspensi antara lain terlibat dengan proses pengolahannya protein yang rumit, tidak praktis, dan mungkin tidak kondusif untuk digunakan di negara-negara terbelakang yang membutuhkannya secara umum. Oleh karena itu, ada kebutuhan akan metode produksi yang mudah dapat mengurangi proses ekstraksi dari protein yang diinginkan.

Tanaman lidah buaya transgenik dapat memberikan alternatif yang layak secara ekonomi untuk produksi protein yang diinginkan, contohnya insulin, kosmetik, dan lain-lain. Selain itu, protein yang diinginkan mungkin di lokalisasi dan dipekatkan di dalam gel daun Aloe vera. Lokalisasi protein yang diinginkan ini dapat menyederhanakan proses ekstraksi ataupun menghilangkan protein yang tidak diinginkan. Dengan demikian, penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai Aloe vera transgenik, dimana protein yang diinginkan umumnya lebih banyak dan mudah diakses dibandingkan tanaman transgenik lainnya, seperti tembakau dan jagung. Selanjutnya, penemuan ini dapat memberikan metode yang efisien untuk isolasi protein.

Tanaman lidah buaya dapat menawarkan berbagai keunggulan dibandingkan sistem bakteri dan tanaman konvensional lainnya untuk menghasilkan protein yang diinginkan. Manfaat tanaman Aloe vera termasuk kemampuan mengolah protein dengan cara yang sederhana. Terkadang pada bakteri dan ragi ditemukan ketidaksesuaian dengan protein yang diinginkan, karena kurangnya sistem modifikasi posttranslational, dimana sistem ini terdapat pada tanaman. Proses ini dapat mencakup modifikasi kimiawi, seperti dengan glikosilasi, dan pelipatan beberapa protein. Selanjutnya, dibandingkan dengan metode produksi protein lainnya, pada sel hewan, produksi tanaman lidah buaya dapat menawarkan keuntungan biaya yang signifikan, keuntungan Skalabilitas, dan pengurangan risiko kontaminasi yang mungkin berbahaya bagi manusia. Keuntungan lainnya menggunakan Aloe vera yaitu kemudahan dalam ekstraksi, karena terdapat

lokalisasi protein yang diinginkan ke dalam gel Aloe vera, sehingga lebih ekonomis dibandingkan menggunakan tumbuhan lain.

Aloe dianggap sebagai kandidat pertama untuk penelitian di abad baru ini, karena berpotensi secara ekonomi dan sebagai obat^[2]. Sebelumnya, kebanyakan penelitian Aloe berfokus pada analisis biochemical^[3] dan obat-obatan atau aplikasi kosmetik dari metabolit sekunder secara efektif^[4]. Selain itu, Aloe vera juga menjadi topik penelitian tanaman transgenik.

Pada penelitian ini, kami akan melakukan pendekatan in-silico, yaitu analisis komputasi data dan desain eksperimen digital untuk mengembangkan Aloe vera transgenik sebagai platform dan kloroplas sebagai sistem ekskresi dengan menggunakan teknik transformasi berupa *particle bombardment* yang diharapkan akan menghasilkan produk signifikan pada *Aloe vera* transgenik. Kehadiran insulin (protein) akan dianalisis menggunakan ELISA, western blot, dan lain lain. Namun pada penelitian ini, kami akan berfokus pada simulasi in-silico berupa computing, pengolahan dan analisis data, serta rancangan penelitian in-vivo yang diharapkan nantinya dapat menjadi bahan pertimbangan sebelum dan perbandingan setelah eksperimen in vivo.

1.2 Rumusan Masalah

Dengan mempertimbangkan latar belakang yang telah dikemukakan maka beberapa masalah yang dapat dirumuskan dari penelitian ini adalah :

1. Bagaimana potensi *Aloe vera* sebagai alat produksi insulin?
2. Bagaimana sistem produksi insulin di tanaman *Aloe vera* dapat dikembangkan?
3. Bagaimana cara mengkonstruksi desain eksperimen *Aloe vera* transgenik?
4. Bagaimana purifikasi dan pematangan insulin hasil produksi dari tanaman *Aloe vera*?
5. Apakah penelitian ini memungkinkan untuk dipelajari secara analisis komputasi?
6. Bagaimana prediksi produksi insulin di *Aloe vera*?

1.3 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Penelitian ini berupa desain in silico (komputasi) dan belum diadakan uji coba secara in vitro.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Memberikan alternatif lain produksi insulin dengan menggunakan tanaman/Aloe vera
2. Memberikan saran konstruksi plasmid binary untuk produksi insulin di Aloe vera
3. Menghasilkan data secara komputasi yang dapat dianalisis sebagai bahan pertimbangan dalam eksperimen digital.
4. Mendesain eksperimen secara digital yang efektif, efisien, ekonomis, aman, dan dapat diterima
5. Menghasilkan data analisis komputasi dan desain eksperimental digital sebagai acuan dalam melakukan penelitian lanjutan baik secara *in vivo* maupun *in vitro* yang dapat mengembangkan Aloe vera transgenic yang dapat menghasilkan insulin.
6. Diharapkan dapat menjadi salah satu solusi dalam memenuhi peningkatan permintaan insulin yang lebih aman dan ekonomis.
7. Setelah mampu memenuhi permintaan insulin, diharapkan terobosan baru dalam pengiriman insulin seperti insulin oral dapat menjadi salah satu metode terapi insulin selain injeksi, sehingga akan menghasilkan kepatuhan dalam terapi yang dapat menghindari komplikasi sekunder dari diabetes.

1.5 Kebaruan

Beberapa ilmuwan sudah meneliti produksi proinsulin pada tanaman transgenik sebelumnya, contohnya pada tembakau yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens*. Namun, pada penelitian ini kami menawarkan desain *in silico* produksi proinsulin dari Aloe vera transgenik dengan target kloroplas menggunakan metode particle bombardment (*biolistic*). Penggunaan Aloe vera dan sistem transformasi ini berdasarkan berbagai pertimbangan.

1.6 Hipotesis

1. *Aloe vera* transgenik mampu menghasilkan insulin.
2. Hasil yang diperoleh didapat dapat digunakan untuk mendesain eksperimen secara *in vivo* ataupun *in vitro* dalam menghasilkan insulin dari *Aloe vera* transgenic.

3. Desain eksperimen dapat diaplikasikan dan menghasilkan insulin yang diharapkan dapat mendukung produksi insulin sebagai bagian dari pemenuhan kebutuhan insulin yang diprediksi kian meningkat.

1.7 Manfaat Penelitian

Dapat memberikan metode alternatif seperti desain konstruksi plasmid untuk produksi insulin dengan menggunakan tanaman/Aloe vera sehingga dapat berdampak di berbagai bidang.

1. Dari segi kesehatan : - Insulin yang dihasilkan diharapkan mampu memenuhi kebutuhan penderita diabetes dan memiliki efektifitas yang sama atau bahkan lebih baik dari cara produksi konvensional.
2. Dari segi ekonomi : - Insulin dari *Aloe vera* transgenik diharapkan memiliki harga yang lebih ekonomis dibandingkan harga insulin konvensional.
3. Dari segi IPTEK. : - Terobosan terobosan baru dalam metode pemberian insulin, seperti oral insulin, membutuhkan insulin dalam dosis tinggi. Sehingga produksi insulin transgenik ini diharapkan dapat memenuhi meningkatnya permintaan insulin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Metode Penelitian

Jenis eksperimen :

1. In Vivo : (Di dalam makhluk hidup). Eksperimen dilakukan di dalam tubuh makhluk hidup.
2. In vitro : (Di dalam glass). Eksperimen meliputi sel atau biomolekul yang ada dan dikontrol oleh lingkungan luar.
3. In silico : (In silico = chips) Eksperimen yang dilakukan dengan bantuan model dan simulasi komputer^[24]



Gambar a



Gambar b



Gambar c

Gambar 2.1.1 Perbandingan (a)In vivo, (b)In vitro, dan (c)In silico

Setelah melakukan berbagai pertimbangan, kami memutuskan untuk melakukan simulasi in silico. Beberapa hal yang kami pertimbangkan meliputi:

1. In silico digunakan sebagai landasan percobaan in vivo dan in vitro, serta untuk menguji hipotesis sebelum melakukan eksperimen langsung di dunia nyata.
2. Waktu yang dibutuhkan pada in vivo dan in vitro lebih panjang daripada in silico, karena in silico berupa simulasi, sedangkan in vivo dan in vitro adalah eksperimen langsung
3. Karena hanya simulasi, maka biaya yang dibutuhkan pada eksperimen in silico relatif lebih sedikit

Tabel 2.1.1: Perbandingan in-silico, in-vitro dan in-vivo dalam penelitian sunscreen

	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in silico</i>
Purpose of use	For special claims	Development, evaluation of sunscreen formulations	Development, evaluation of sunscreen formulations
Principle	Action spectrum of PPD	Transmission measurement, possibly action spectra of MED and PPD	Transmission calculation with skin roughness model action spectra of MED and PPD
Reliability	medium	low	medium
Time	high	medium	low
Costs	high	medium	low
Diffusion	medium	high	medium
Limitations	No consideration of interaction with UV-B (as the other <i>in vivo</i> or <i>in vitro</i> methods).	Uncertainties introduced by transmission measurement (no biological substrate)	Sunscreen formulations may not behave like simulation. Not available for all types of products
Conclusion	Expensive and time consuming method. Recommended for labelling of products and information of consumers.	Medium cost method. Usefulness for industrial development and labelling of products depending on the type of <i>in vitro</i> method.	Fast and low cost method. Useful for industrial development of sunscreen products.

Comparison of *in vivo*, *in vitro* and *in silico* methods for UV-A assessment.

2.2 Diabetes

Diabetes adalah penyakit kronis yang terjadi ketika pankreas tidak lagi mampu memproduksi insulin, atau ketika tubuh tidak mampu memanfaatkan insulin yang dihasilkannya dengan baik. (International Diabetes Federation).

2.2.1 Tipe Diabetes

1. Diabetes Tipe 1

Dapat berkembang pada usia berapa pun, tetapi paling sering terjadi pada anak-anak dan remaja. Ketika Anda menderita diabetes tipe 1, tubuh Anda memproduksi sangat sedikit atau tidak ada insulin, yang berarti bahwa Anda memerlukan suntikan insulin setiap hari untuk menjaga kadar glukosa darah tetap terkendali.

2. Diabetes Tipe 2

Lebih umum pada orang dewasa dan menyumbang sekitar 90% dari semua kasus diabetes. Ketika Anda menderita diabetes tipe 2, tubuh Anda tidak menggunakan insulin yang dihasilkannya dengan baik. Landasan pengobatan diabetes tipe 2 adalah gaya hidup sehat, termasuk peningkatan aktivitas fisik dan

diet sehat. Namun, seiring waktu sebagian besar orang dengan diabetes tipe 2 akan membutuhkan obat-obatan oral dan / atau insulin untuk menjaga kadar glukosa darah mereka terkendali.

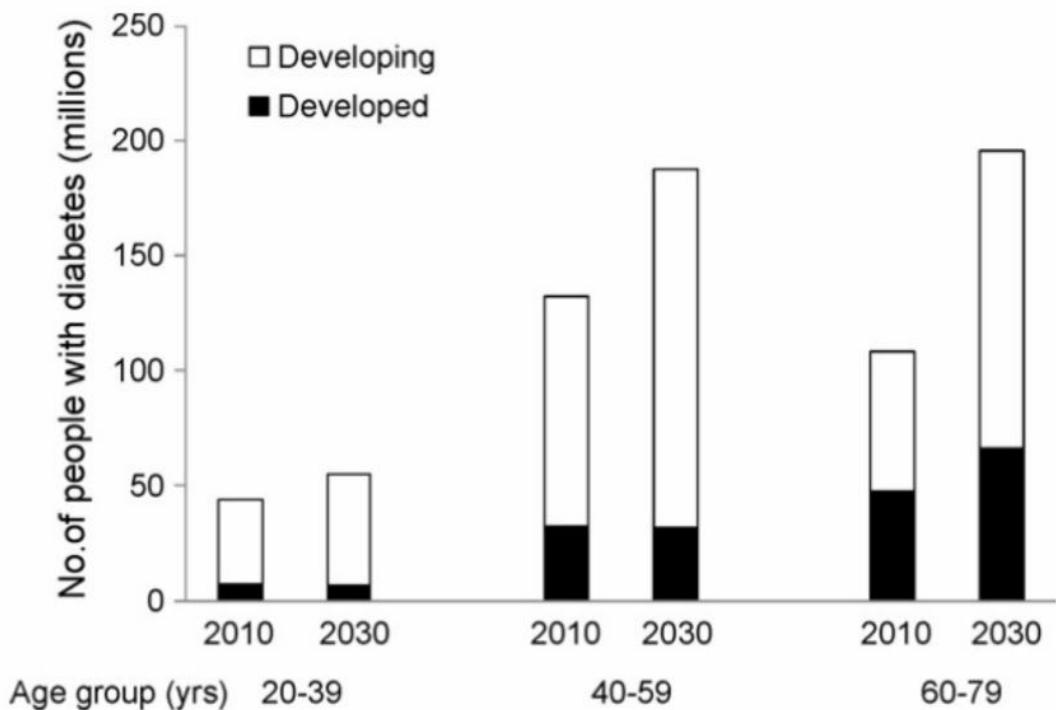
3. Gestational diabetes (GDM)

Jenis diabetes yang terdiri dari glukosa darah tinggi selama kehamilan dan dikaitkan dengan komplikasi pada ibu dan anak. GDM biasanya menghilang setelah kehamilan, tetapi wanita yang terkena dan anak-anak mereka berisiko lebih tinggi terkena diabetes tipe 2 di kemudian hari. (IDF International Diabetes).

2.2.2 Jumlah Penderita Diabetes

Secara global, diperkirakan 422 juta orang dewasa hidup dengan diabetes pada tahun 2014, dibandingkan dengan 108 juta pada tahun 1980. Prevalensi diabetes di dunia (dengan usia yang distandarisasi) telah meningkat hampir dua kali lipat sejak tahun 1980, meningkat dari 4,7% menjadi 8,5% pada populasi orang dewasa. Hal ini mencerminkan peningkatan faktor risiko terkait seperti kelebihan berat badan atau obesitas. Selama beberapa dekade terakhir, prevalensi diabetes meningkat lebih cepat di negara berpenghasilan rendah dan menengah daripada di negara berpenghasilan tinggi.

Diabetes menyebabkan 1,5 juta kematian pada tahun 2012. Gula darah yang lebih tinggi dari batas maksimum mengakibatkan tambahan 2,2 juta kematian, dengan meningkatkan risiko penyakit kardiovaskular dan lainnya. Empat puluh tiga persen (43%) dari 3,7 juta kematian ini terjadi sebelum usia 70 tahun. Persentase kematian yang disebabkan oleh diabetes yang terjadi sebelum usia 70 tahun lebih tinggi di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah daripada di negara-negara berpenghasilan tinggi. (WHO Global Report, 2016).



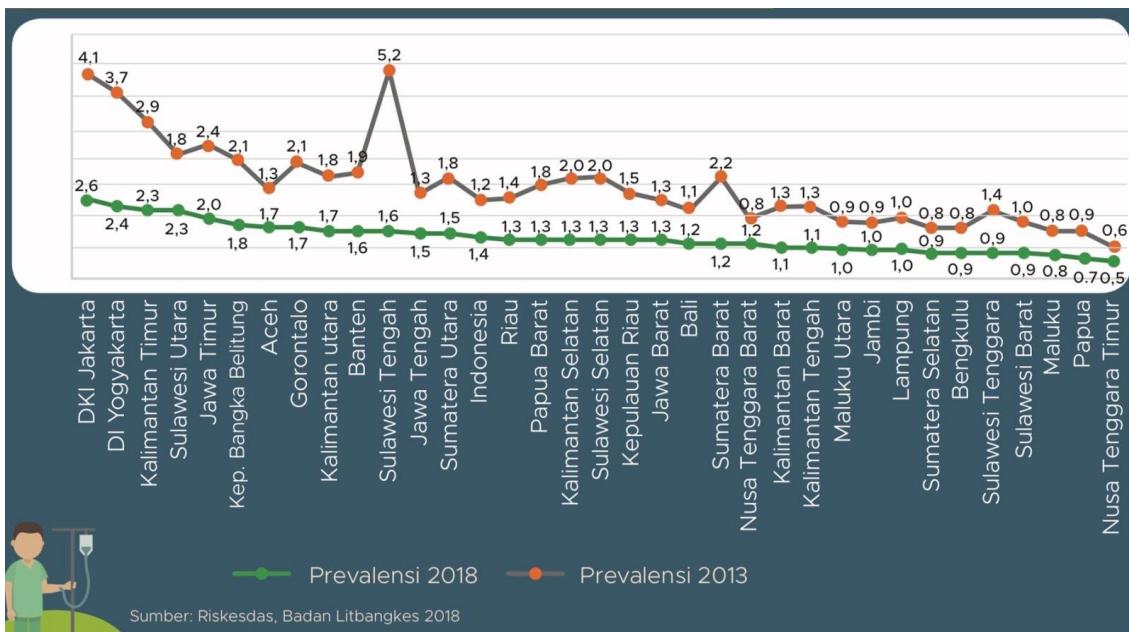
Grafik 2.2.1. Penderita diabetes pada negara maju dan berkembang pada tahun 2010 dan estimasi penderitanya di tahun 2030. (Sumber : Diabetes Research and Clinical Practice 87 (2010) 4-14)

Tabel 2.2.1: 10 negara teratas dengan penderita diabetes berusia 20-79 pada tahun 2010 dan perkiraan pada 2030.

Table 5 – Top 10 countries for numbers of people aged 20–79 years with diabetes in 2010 and 2030.				
	Country	2010	2030	
		No. of adults with diabetes (millions)	Country	No. of adults with diabetes (millions)
1	India	50.8	India	87.0
2	China	43.2	China	62.6
3	USA	26.8	USA	36.0
4	Russian Federation	9.6	Pakistan	13.8
5	Brazil	7.6	Brazil	12.7
6	Germany	7.5	Indonesia	12.0
7	Pakistan	7.1	Mexico	11.9
8	Japan	7.1	Bangladesh	10.4
9	Indonesia	7.0	Russian Federation	10.3
10	Mexico	6.8	Egypt	8.6

(Sumber : Diabetes Research and Clinical Practice 87 (2010) 4-14.)

Terlihat bahwa Indonesia menduduki peringkat ke 9 dengan penderita diabetes umur 20-79 terbanyak pada 2010 dan diperkirakan Indonesia akan menduduki peringkat ketiga 3 pada tahun 2030. Selain itu, juga terdapat estimasi peningkatan kasus diabetes di setiap negara.



Grafik 2.2.2 Prevalensi Diabetes Melitus di Indonesia Berdasarkan Diagnosis Dokter pada Penduduk Semua Umur dan Prevalensi Rutin Periksa Kadar Gula Darah (KGD) Menurut Provinsi Tahun 2013
(Sumber : Riskesdas, Badan Litbangkes 2018.)

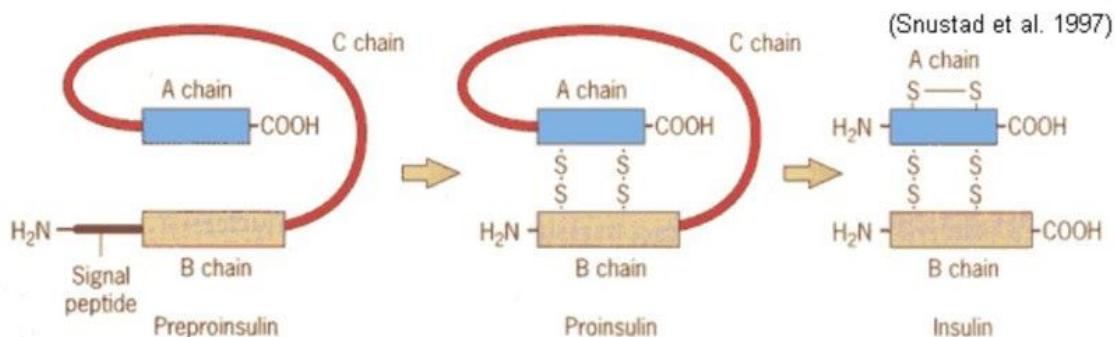
Jika dibandingkan dengan tahun 2013, prevalensi DM berdasarkan diagnosis dokter pada penduduk umur ≥ 15 tahun hasil Riskesdas 2018 meningkat menjadi 2%. Prevalensi DM berdasarkan diagnosis dokter dan usia ≥ 15 tahun yang terendah terdapat di Provinsi NTT, yaitu sebesar 0,9%, sedangkan prevalensi DM tertinggi di Provinsi DKI Jakarta sebesar 3,4%. Prevalensi DM semua umur di Indonesia pada Riskesdas 2018 sedikit lebih rendah dibandingkan prevalensi DM pada usia ≥ 15 tahun, yaitu sebesar 1,5%. Sedangkan provinsi dengan prevalensi DM tertinggi semua umur berdasarkan diagnosis dokter juga masih di DKI Jakarta dan terendah di NTT.

2.3 Insulin

Insulin merupakan hormon dari protein yang berfungsi menurunkan kadar gula darah dengan cara merubah kandungan gula dalam darah menjadi glikogen yang disimpan di hati.

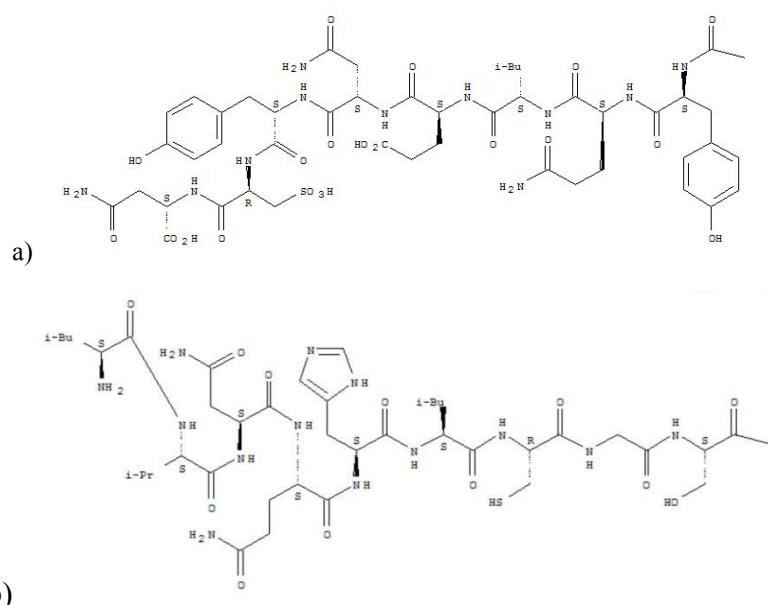
Insulin dihasilkan oleh sel beta pulau langerhans di pankreas, dan disekresikan saat kadar gula darah lebih tinggi dari biasanya. Insulin bekerja berlawanan dengan glukagon, hormon yang berfungsi untuk menaikkan gula darah dengan merubah glikogen dalam hati menjadi glukosa dan diedarkan dalam darah. Insulin pertama kali diisolasi oleh Frederick Banting dan Charles H. Best dari pankreas anjing pada 1921 (wikipedia).

Insulin pada awalnya terbentuk sebagai preproinsulin, rantai panjang yang terdiri dari 110 asam amino. Penghilangan signal peptida dari ujung preproinsulin menghasilkan proinsulin. Pembentukan ikatan disulfida antar rantai A dan B, serta dihilangkannya rantai C membentuk insulin yang aktif secara biologis. Insulin aktif terdiri dari 2 rantai asam amino, rantai A (21 asam amino), dan rantai B (30 asam amino) yang dihubungkan oleh ikatan peptida.

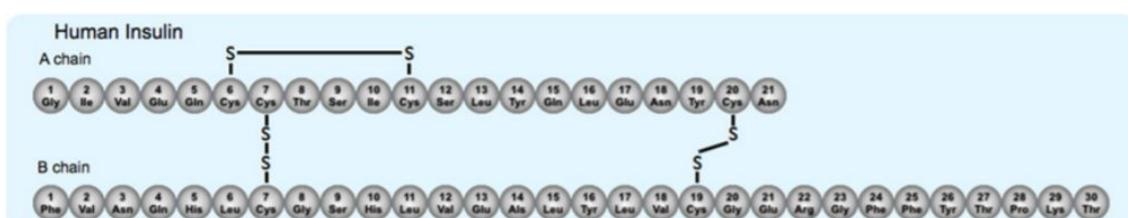


Gambar 2.3.1 Modifikasi *Post-translational* insulin

PAGE 1-A

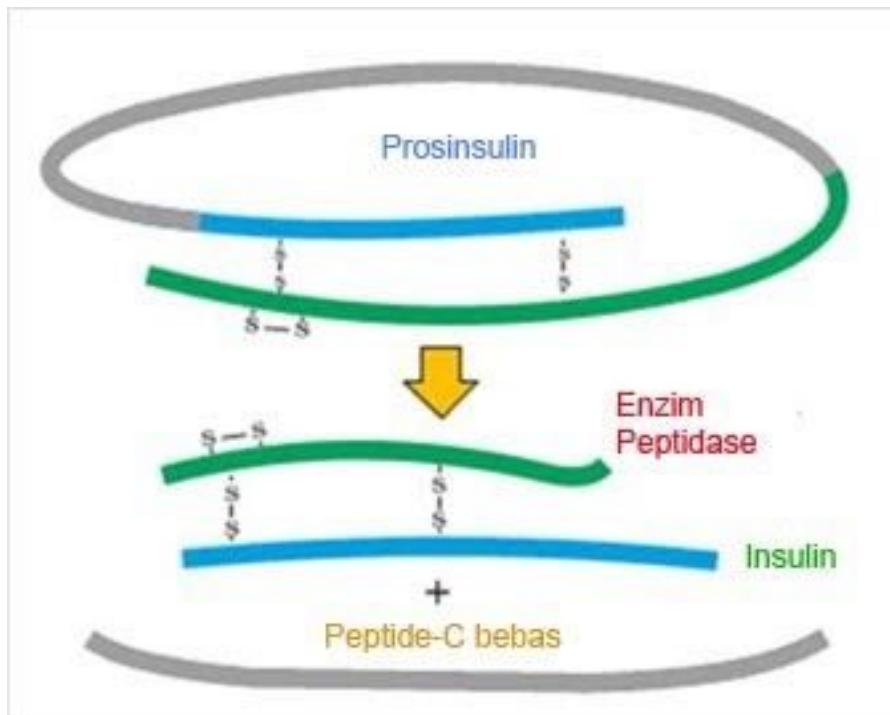


Gambar 2.3.2 a) Insulin chain A oxidized b) Insulin chain B oxidized, lookchem.com



Gambar 2.3.3 Struktur asam amino insulin^[53]

2.3.1 Sintesis Insulin

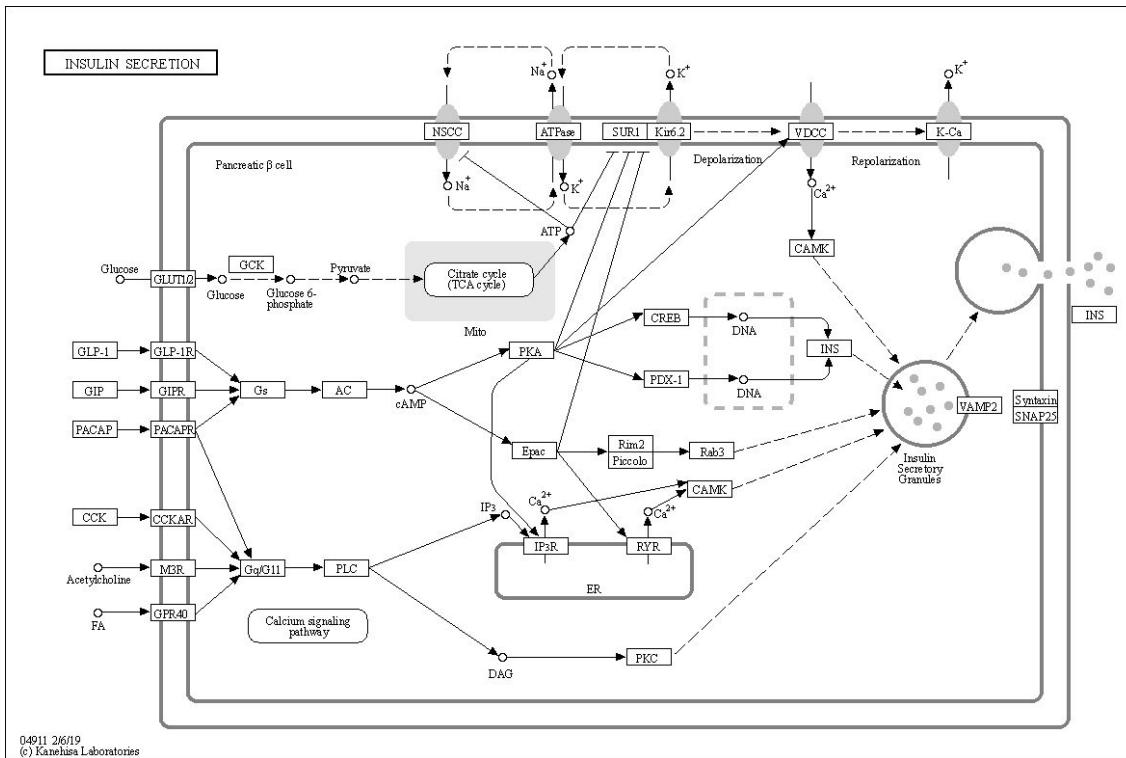


(Gambar 2.3.4 Sintesis Insulin)

Tahapan sintesis insulin adalah sebagai berikut :

1. Sintesis insulin dimulai dalam bentuk preproinsulin (precursor hormon insulin) pada retikulum endoplasma sel beta.
2. Dengan bantuan enzim peptidase, preproinsulin mengalami pemecahan sehingga terbentuk proinsulin, yang kemudian dihimpun dalam gelembung gelembung dalam sel tersebut.
3. Proinsulin kemudian diurai kembali oleh enzim peptidase menjadi insulin dan peptide-C yang keduanya sudah siap disekreksikan secara bersamaan melalui membran sel.
4. Fungsi insulin sangat dibutuhkan dalam proses utilisasi glukosa yang ada dalam darah. Kadar glukosa darah yang meningkat merupakan komponen utama yang memberi rangsangan terhadap sel beta dalam memproduksi insulin^[191, 192].

2.3.2 Jalur Sekresi Insulin detail



(Gambar 2.3.5 Jalur sekresi insulin) Sumber : KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome)

Sel beta pankreas adalah sel endokrin khusus yang terus-menerus mengatur kadar gula darah dan bahan bakar lainnya, dan sebagai respon, mengeluarkan insulin untuk mempertahankan homeostasis bahan bakar normal. Sekresi insulin yang diinduksi glukosa dan potensinya merupakan mekanisme utama pelepasan insulin. Glukosa diangkut oleh transporter glukosa (GLUT) ke dalam sel beta pankreas. Metabolisme glukosa menghasilkan ATP, yang menghambat saluran K⁺ yang sensitif terhadap ATP dan menyebabkan masuknya Ca²⁺ yang bergantung pada tegangan. Peningkatan [Ca²⁺] i memicu pelepasan butiran insulin secara eksositosis.

Sekresi insulin diatur lebih lanjut oleh beberapa hormon dan neurotransmitter. Hormon peptida, seperti glucagon-like peptide 1 (GLP-1), meningkatkan level cAMP dan dengan demikian memicu sekresi insulin melalui aksi gabungan PKA dan Epac2. Acetylcholine (ACh), neurotransmitter parasimpatis utama, mengikat reseptor Gq-coupled dan mengaktifkan fosfolipase C- (PLC-), dan efek stimulasi melibatkan aktivasi protein kinase C (PKC), yang merangsang eksositosis. Selain itu, ACh memobilisasi Ca²⁺ intraseluler dengan aktivasi reseptor IP3. (KEGG (Kyoto

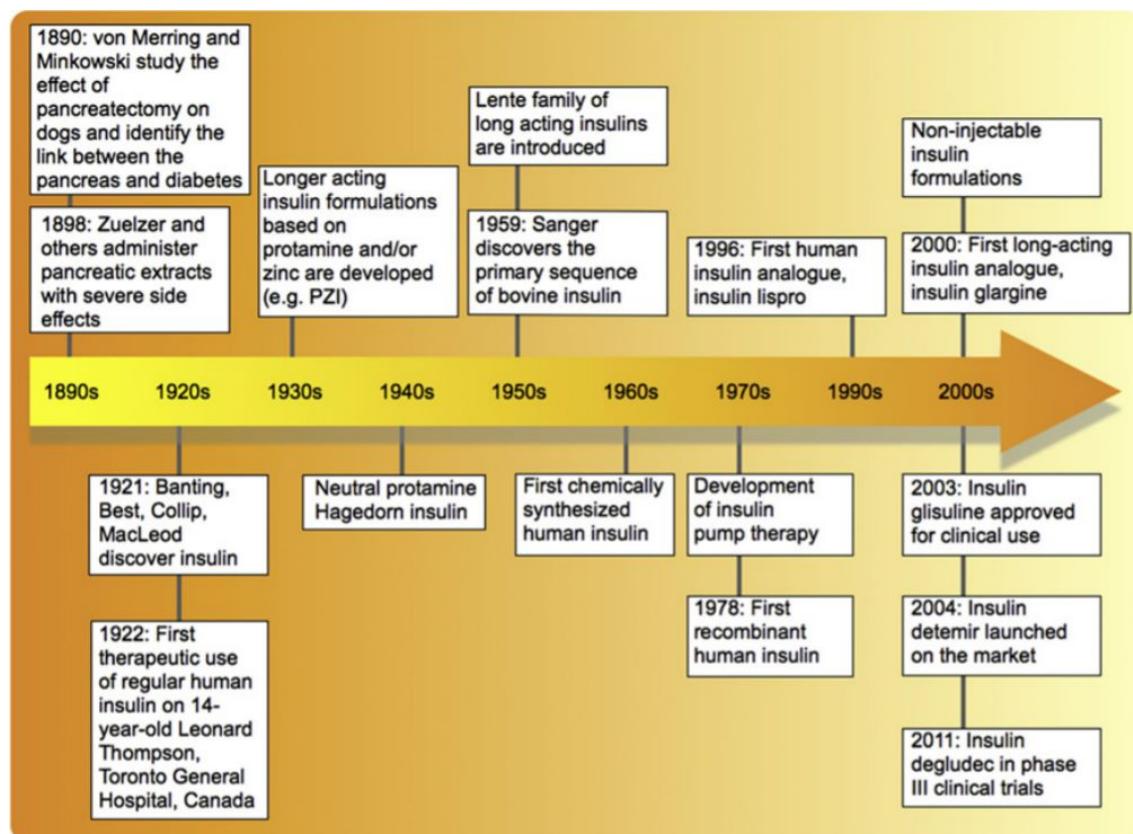
Encyclopedia of Gene and Genome)). Insulin juga merupakan senyawa protein yang bersifat mudah dicerna dan rusak saat terkena asam lambung.

2.3.3 Produksi Insulin Konvensional

Sebelum 1980-an, sebagian besar produk insulin di pasaran berasal dari pankreas babi(porcine) atau sapi(bovine). Produk insulin ini sangat tidak murni dan dapat menyebabkan komplikasi imunologis seperti alergi insulin, immune-mediated lipoatrophy di lokasi injeksi, dan resistensi insulin yang dimediasi antibodi. Produk insulin ini juga menyebabkan variasi signifikan pada pharmakokinetik dan pharmakodinamik^[54].

Seiring berjalannya waktu, perkembangan teknologi insulin menghasilkan insulin dengan kualitas yang lebih baik dan kinerja yang lebih konsisten. Selain itu, long-acting insulin mulai dikembangkan untuk memperpanjang waktu kerja insulin dan mengurangi jumlah injeksi harian. Long-acting insulin tersebut dibentuk dengan menggabungkan zinc dan/atau protamin menjadi protamine insulin dan protamine zinc insulin (PZI) dan mulai dikembangkan pada 1930-an^[54-56]. Selain itu, NPH (Isophane Neutral Protamine Hagedorn) juga mulai diproduksi pada 1940-an^[57], dan masih digunakan sampai sekarang baik digunakan sendiri maupun dicampurkan dengan produk insulin lain[59].

Pada 1950, insulin trilogi “lente” mulai diintroduksikan[58] dan Sanger berhasil mendapatkan primary structure insulin bovine(sapi). Seluruh kemajuan ini berujung pada lahirnya insulin hewan murni berkualitas tinggi (monokomponen maupun single-peak insulin) pada 1970^[61].

(Gambar 2.3.6 Sejarah insulin^[54])

2.3.4 Produksi Insulin Rekombinan

Pada 1970-an, teknologi DNA rekombinan mengalami perkembangan pesat yang berujung pada lahirnya insulin manusia rekombinan pada 1978^[62].

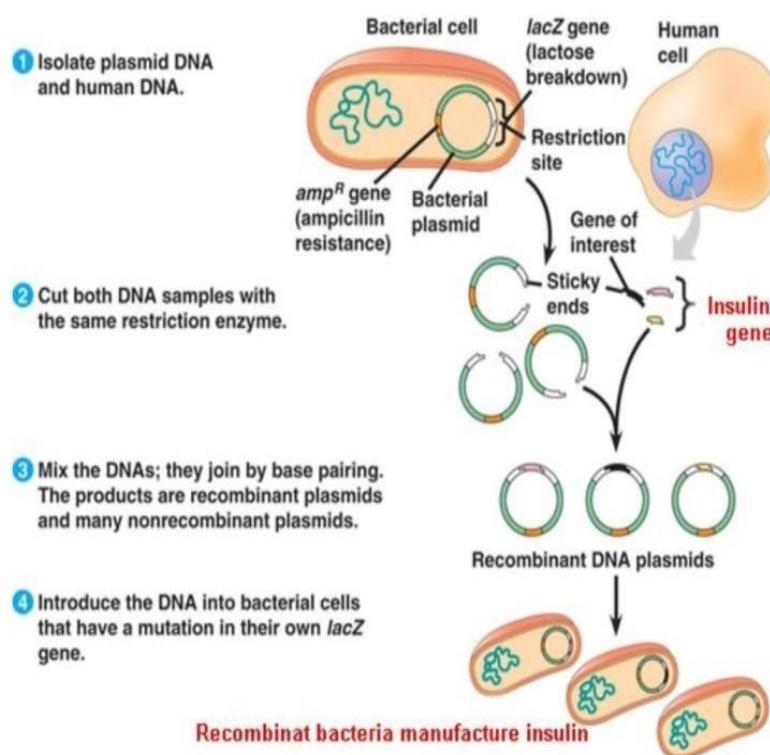
Escherichia coli

Diantara prokariota, *Escherichia coli* lebih diminati untuk produksi insulin rekombinan karena keuntungan yang ditawarkan. Beberapa keuntungan tersebut termasuk tingkat pertumbuhan tinggi, persyaratan media sederhana, kemudahan dalam penanganan, hasil produksi tinggi, dan sangat hemat biaya.

Bioengineering *E. coli* dimulai pada tahun 1978, dan dilakukan melalui penggunaan plasmid, pBR322 (Goeddel et al., 1979). Plasmid adalah bagian kecil dari DNA yang melayang di sitoplasma, dan tidak penting bagi sel (Madigan et al., 2015). Karena mereka tidak esensial dan sangat kecil, mereka sering dilepas dan diambil oleh prokariota lain melalui proses transformasi, yang memungkinkan mikroba untuk beradaptasi dengan mengekspresikan gen yang

berbeda. Fenomena ini merupakan cara bagi beberapa bakteri untuk mengembangkan resistensi genetik.

Fenomena ini membuka peluang besar bagi peneliti untuk memodifikasi bakteri menjadi pabrik produksi berbagai macam protein dan zat kimia lainnya. Salah satunya adalah tahun 1978 ketika peneliti mampu merubah strain *E. coli* untuk memproduksi insulin manusia. Dengan menggunakan plasmid pBR322, peneliti berhasil memotong urutan spesifik pasangan basa DNA insulin manusia dan plasmid vector menggunakan enzim restriksi (EcoRI), serta menyambungkan gen insulin manusia sintetis ke dalam plasmid. Ketika plasmid ditempatkan ke dalam *E. coli*, bakteri mengambil plasmid; ini memungkinkan bakteri untuk mereplikasi plasmid dan mengkode insulin manusia. Melalui model ini, bakteri terus menerus membuat plasmid baru yang mengandung gen insulin. Skema umum tentang bagaimana transformasi ini terjadi dapat dilihat pada gambar 2.6^[6].



(Gambar 2.3.7 Transformasi bakteri transgenik)

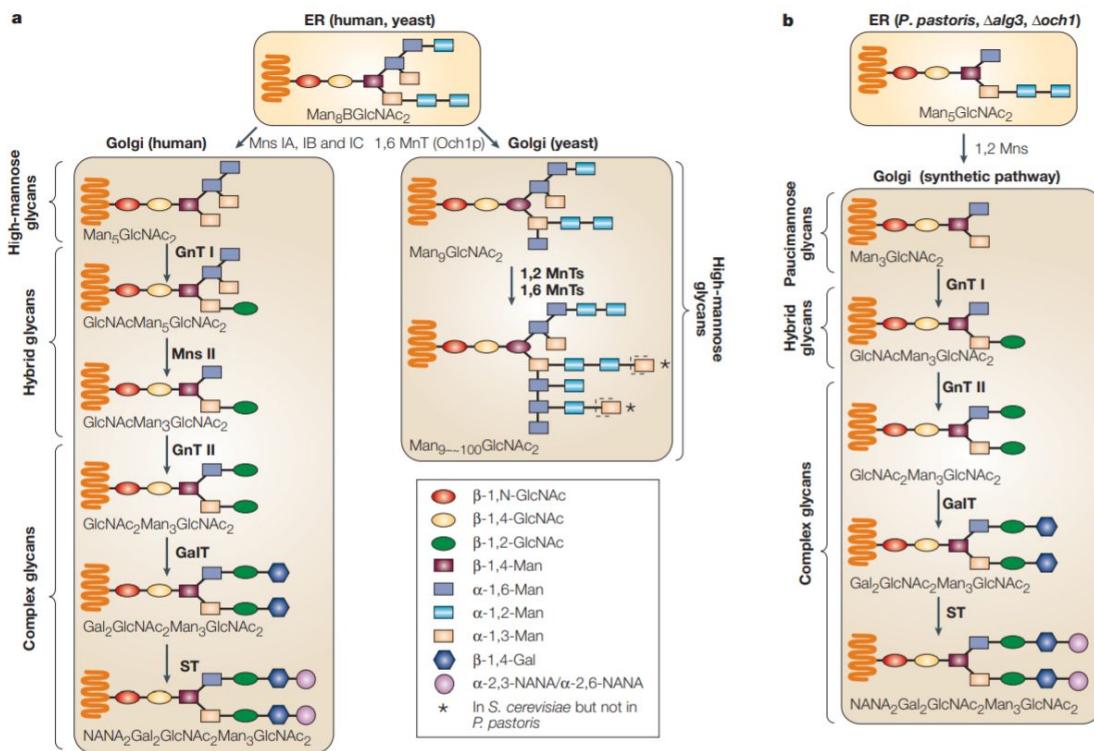
Terlepas dari segala kelebihan yang ditawarkan *E. Coli*, sistem ekspresi *E. Coli* juga memiliki kelemahan. Contohnya adalah hilangnya sifat plasmid, penginduksi yang tidak diinginkan untuk ekspresi gen, akumulasi protein intraseluler heterolog sebagai badan inklusi, refolding protein yang tidak tepat, kurangnya modifikasi

pasca translasi (termasuk pembentukan ikatan disulfida), beban metabolisme dan stress yang dimediasi protein, kontaminasi endotoksin, sekresi yang buruk, pencernaan proteolitik, serta kompleksitas pada proses hilir^[26-27].

Ragi

Ragi adalah inang yang disukai untuk ekspresi berbagai macam protein heterolog yang memerlukan modifikasi pasca-translasi untuk aktivitas biologisnya. Ragi memiliki kemampuan untuk melakukan banyak modifikasi pasca-translasi seperti fosforilasi, glikosilasi terkait-O, glikosilasi terkait-N, asetilasi dan asilasi. Protein rekombinan diekspresikan dalam bentuk larut dan terlipat dengan baik dalam bentuk aktif secara fungsional. Produksi biofarmasi menggunakan sistem ekspresi ragi juga sangat hemat biaya dan dapat ditingkatkan dengan menggunakan bioreaktor besar.

Namun, satu perhatian utama dalam produksi glikoprotein terapeutik untuk manusia adalah jalur N-glikosilasi ragi merupakan tipe manosa tinggi, yang memberikan waktu paruh pendek in vivo dan hiper imunogenisitas yang mengakibatkan glikoprotein terapeutik kurang efektif. Berbagai upaya telah dilakukan untuk merubah jalur N-glikosilasi ragi untuk menghasilkan glikoprotein terapeutik dengan struktur glikosilasi N yang sesuai dengan manusia (humanisasi)^[29, 35]. Contoh ragi yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* dan sering juga digunakan untuk menghasilkan protein rekombinan^[93-96].



(Gambar 2.3.8: Jalur utama N-glycosylation pada ragi dan manusia. **a)** Perbandingan jalur N-glycosylation manusia (kiri) dengan ragi (kanan). **b)** Jalur sintetis pada ragi yang dibuat menggunakan assembly oligosakarida mutan.)

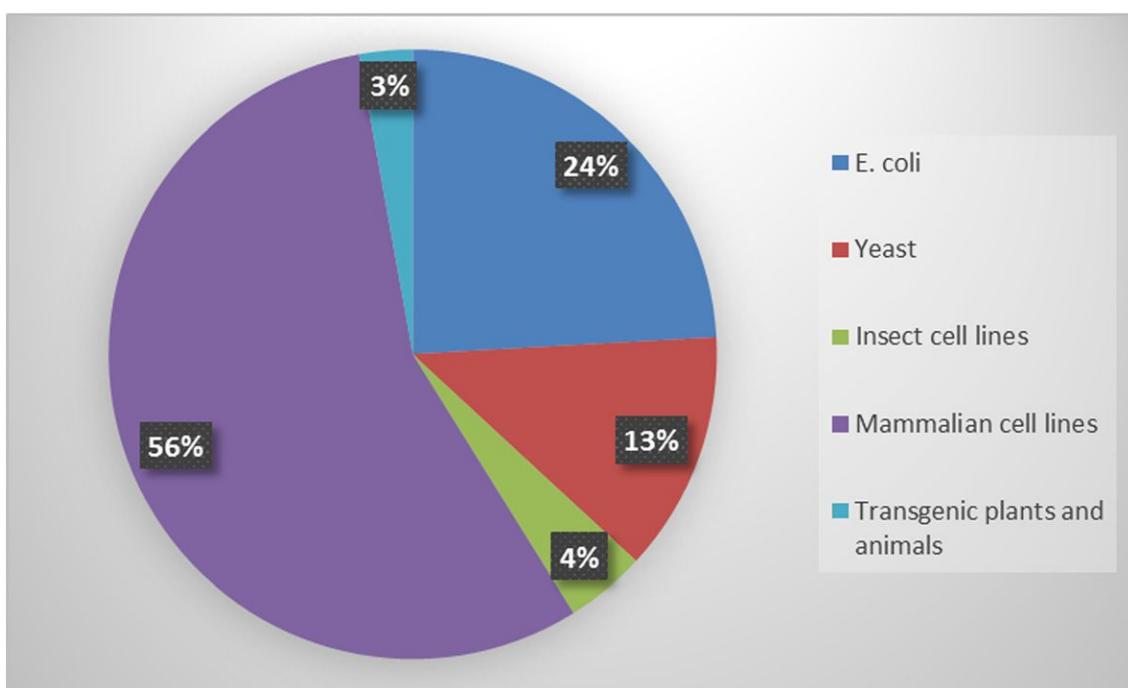
Tanaman Transgenik

Tanaman transgenik telah lama digunakan sebagai alat produksi protein rekombinan, karena kelebihan kelebihan yang mereka tawarkan. Beberapa kelebihan ini meliputi efektivitas biaya, pemrosesan protein berkualitas tinggi, ketiadaan patogen manusia, kemudahan produksi, serta adanya sistem eukaryotik untuk modifikasi post translasi. Contoh protein yang berhasil diproduksi dengan tanaman transgenik adalah: Growth hormone^[30]; Virus hepatitis-B surface antigen; antibodi; protein industri, serta beberapa protein susu.

Insulin manusia rekombinan telah berhasil diekspresikan dan diproduksi dari oil body *Arabidopsis thaliana*. Oil Body merupakan organel yang terdapat pada oilseed dan terdiri dari inti triacylglycerol hidrophobik yang dibungkus oleh membran fosfolipid dan dinding luar protein bernama oleosin. Selain itu, insulin rekombinan juga sudah berhasil diekspresikan dan dipanen dari tembakau dan selada.

Secara keseluruhan, tanaman transgenik menyimpan potensi tinggi untuk produksi insulin berkapasitas tinggi dan hemat biaya. Tingkat ekspresi proinsulin tinggi dalam daun dengan stabilitas jangka panjang menawarkan teknologi berbiaya rendah untuk injeksi maupun oral insulin. Selain itu, sel tanaman transgenik dapat digunakan sebagai tempat penyimpanan alami bagi insulin rekombinan^[36].

2.3.5 Perbandingan Persentase Produksi Insulin Rekombinan



(Gambar 2.3.9: Perbandingan sumber produksi insulin rekombinan.)

2.3.6 Ekstraksi Protein

Insulin merupakan hormon yang terbuat dari protein. Analisa berskala besar terhadap protein disebut sebagai analisa proteomik dan biasanya digunakan untuk mengidentifikasi protein^[116, 117]. Analisa proteomik pertama kali dikembangkan pada 1975 setelah ditemukannya gel dua dimensi, dan dipetakannya protein E. coli. Beberapa contoh analisis proteomik akan dijelaskan di akhir bab 2.

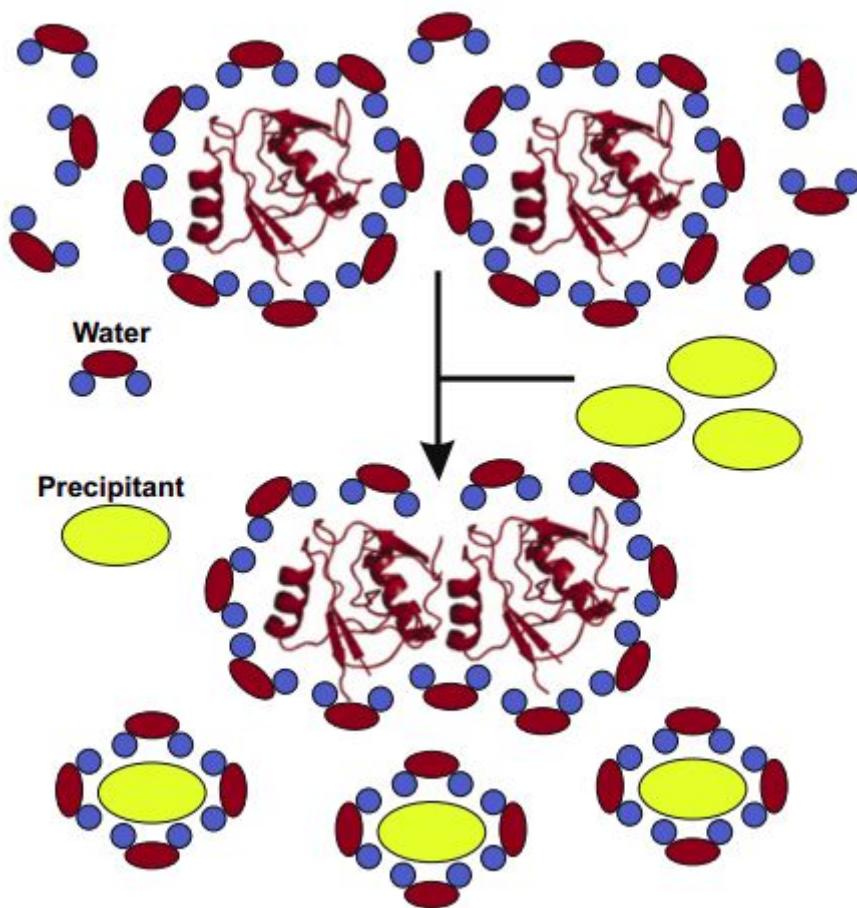
Analisis proteomik yang sukses bergantung pada sampel protein yang bagus^[108]. Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan saat mempersiapkan sampel protein untuk analisis proteomik. Dua diantaranya adalah kadar kontaminan dan kadar degradasi protein. Walaupun kontaminan dalam jumlah kecil dapat ditoleransi, beberapa protein tidak stabil, dan kontaminasi dapat mengganggu analisa

proteomik^[108]. Sedangkan degradasi protein adalah rusaknya struktur primer protein, dan menyebabkan protein terpecah menjadi satuan asam amino, atau rantai peptida yang lebih kecil.

Perlu diingat bahwa denaturasi protein tidak sama dengan degradasi protein. Denaturasi protein hanya merusak struktur sekunder, tersier, dan kuarter protein. Hal ini hanya merubah struktur tiga dimensi protein dan menjadikannya rantai peptida linear. Denaturasi tentunya menghilangkan sifat biologis protein, sehingga protein tidak dapat digunakan untuk analisis yang memerlukan sifat biologis aktifnya^[115].

Di sisi lain, degradasi protein adalah rusaknya struktur primer protein akibat terputusnya ikatan peptida antar asam amino. Karena degradasi protein memecah protein menjadi rantai peptida yang lebih kecil, analisis proteomik tidak bisa dilakukan pada protein yang telah terdenaturasi^[115].

Pada beberapa kasus, protein harus dikonsentrasi terlebih dahulu sebelum diadakannya analisis. Terdapat beberapa teknik yang tersedia untuk melakukan hal ini, seperti ultrafiltrasi, kromatografi afinitas, dan presipitasi. Dibandingkan teknik lain, presipitasi dipercaya merupakan teknik dengan ekstraksi terbanyak dan paling sesuai untuk volume dengan kadar protein rendah. Hal ini terjadi karena protein dapat menempel pada membran ultrafiltrasi, dan fase stasioner yang digunakan dalam kromatografi afinitas^[118].



(Gambar 2.3.10 Prinsip dasar presipitasi protein adalah merubah potensial pelarutan zat pelarut, dan mengurangi kelarutan zat terlarut dengan bantuan reagen yang disebut presipitan^[108])

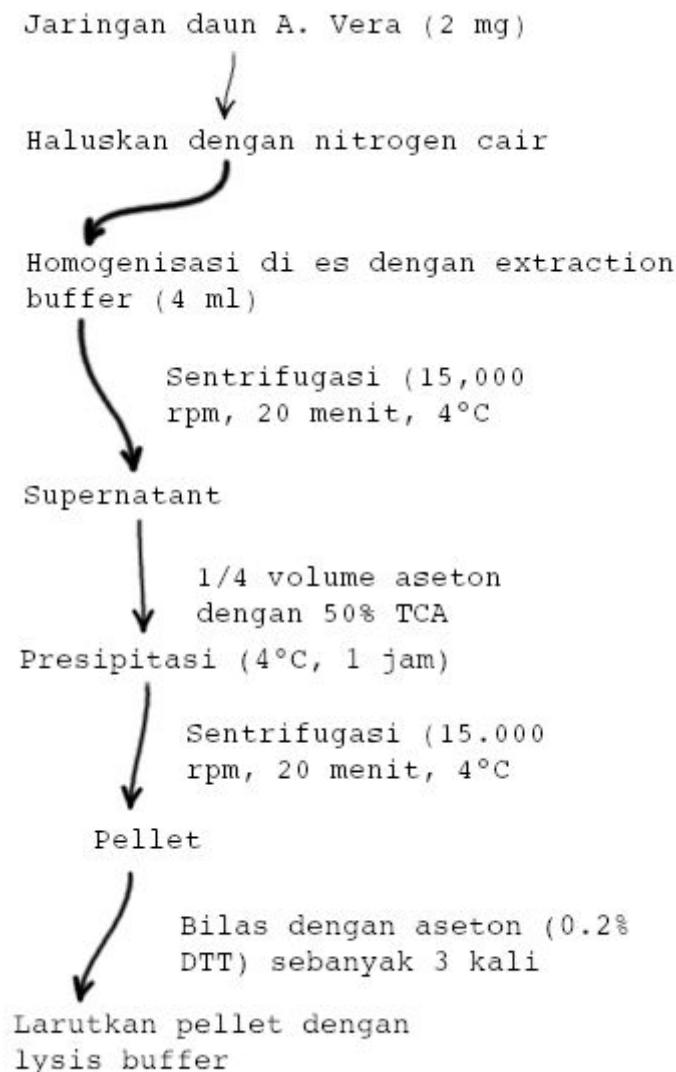
Trichloroacetic acid (TCA)-acetone Precipitation Method

Metode presipitasi trichloroacetic acid (TCA)-acetone merupakan metode yang dikembangkan oleh Damerval^[106] dan biasanya digunakan untuk menyiapkan sampel analisa proteomik. Metode ini diyakini dapat meminimalisir degradasi protein dan kadar kontaminan^[107].

Asam trikloroasetat (TCA) merupakan analog dari asam asetat dengan ketiga atom hidrogen dari gugus metil diganti dengan atom klorin (wikipedia). Penambahan TCA dalam larutan cair mengganggu ikatan hidrogen antar molekul air, sehingga memudahkan penggumpalan protein dan pengumpulan dengan sentrifugasi. Namun, karena TCA memecah ikatan hidrogen, maka TCA dapat merusak struktur sekunder protein dan menyebabkan protein terdenaturasi^[109]. Meski begitu, TCA tidak cukup kuat untuk memecah ikatan peptida antar asam

amino penyusun protein, sehingga kerusakan struktur primer dapat diminimalisir^[107].

Skema TCA/Acetone precipitation method adalah sebagai berikut:



Skema 2.3.1 TCA/Acetone Precipitation Method^[109, 110]

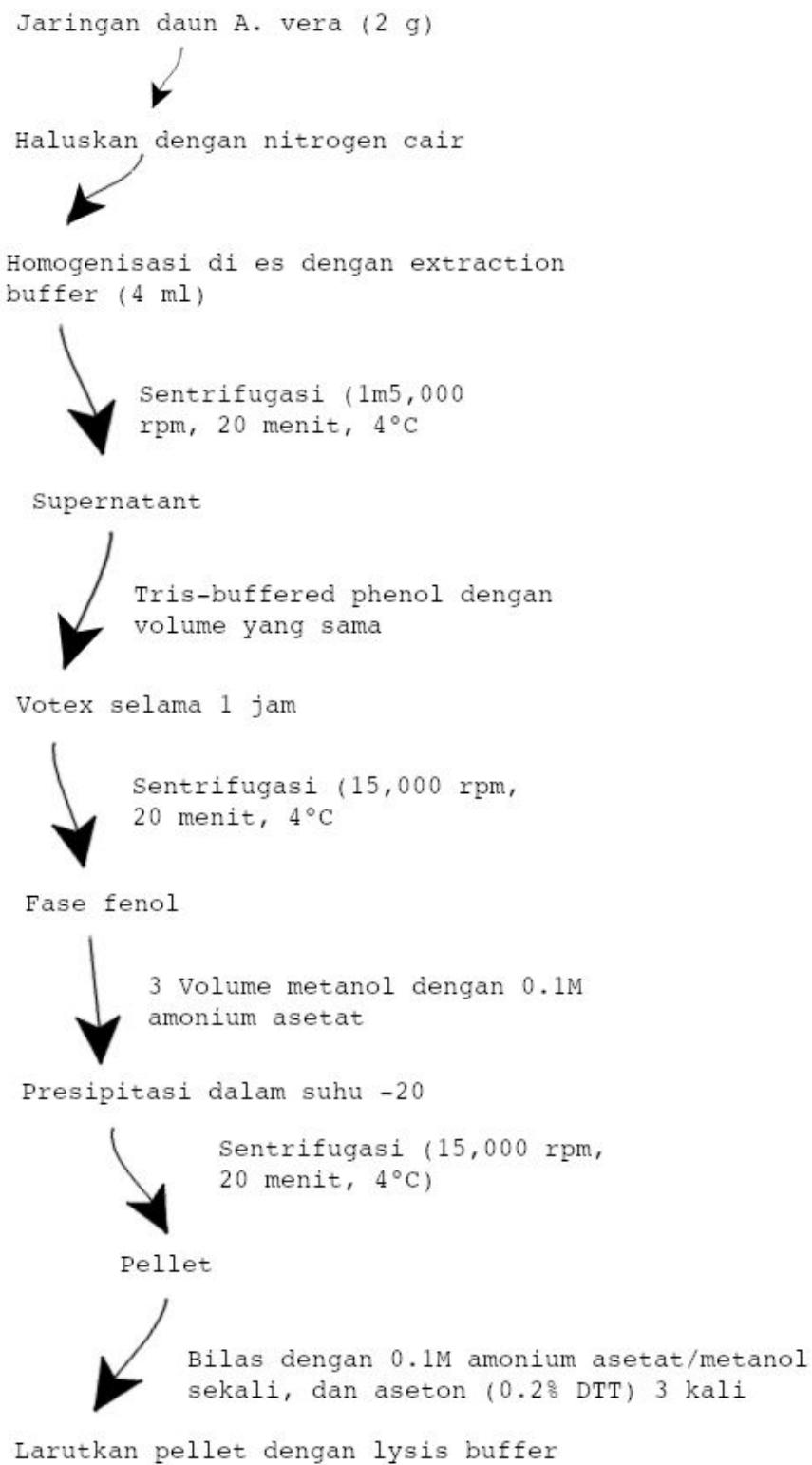
Phenol Extraction with methanol/ammonium acetate precipitation Method

Ekstraksi fenol dengan presipitasi metanol/amonium asetat merupakan cara lain yang dapat digunakan untuk ekstraksi protein. Ekstraksi ini dideskripsikan oleh Hurkman dan Tanaka untuk penyiapan sampel uji proteomik^[111]. Ekstraksi fenol pertama kali dikembangkan untuk purifikasi karbohidrat dan asam nukleat, dan kini biasa digunakan untuk menghilangkan protein dari larutan asam nukleat^[112].

Fenol merupakan alkohol aromatik paling sederhana dengan rumus kimia C_6H_5OH , dan terdiri dari gugus fenil yang berikatan dengan gugus hidroksil. Fenol memiliki sifat asam lemah, korosif, dan beracun. Fenol berinteraksi dengan ikatan hidrogen protein dan memecahnya, menyebabkan protein terdenaturasi^[112].

Perbandingan antara ekstraksi fenol dan TCA/Aseton menunjukkan bahwa keduanya merupakan metode ekstraksi yang efisien^[113, 114], dan dapat meminimalisir degradasi protein. Namun, ekstraksi fenol lebih efisien dalam menghilangkan kontaminan dan menghasilkan gel dengan kualitas terbaik untuk elektroforesis. Ekstraksi fenol juga menghasilkan glikoprotein dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan TCA^[114].

Skema phenol extraction adalah sebagai berikut:



Skema 2.3.2 Phenol Extraction with methanol/ammonium acetate precipitation Method

2.4 Biopharming

Biopharming adalah usaha tani (farming) yang memanfaatkan tanaman atau hewan ternak untuk menghasilkan protein atau senyawa metabolit tertentu yang bernilai kesehatan atau pengobatan^[64]. 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^[65,66].

Produk yang dihasilkan biopharming adalah protein rekombinan. Biopharming menawarkan kelebihan berupa rendahnya biaya karena diintegrasikannya usaha tani yang dapat menghasilkan tanpa memerlukan infrastruktur yang mahal dan kapasitas produksinya dapat diatur dengan lebih fleksibel^[67]. Kemajuan pada pendekatan plant bio/molecular pharming dalam dekade terakhir telah menjadikan tanaman sebagai sistem manufaktur yang menarik, bahkan dapat mencapai tingkat produksi yang relevan secara komersial dalam waktu singkat^[69-71]. Adapun pentingnya dan prospek dari ekspresi tanaman untuk produksi protein rekombinan yang hemat biaya. Kandidat vaksin potensial, antibodi monoklonal, dan juga enzim industri yang diekspresikan dalam tumbuhan^[68].

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^[72] telah meningkat dari waktu ke waktu dan berkembang secara signifikan dalam beberapa dekade terakhir, yang menyebabkan paradigma utama pergeseran di sektor farmasi.

Keuntungan utama dari semua plant-based system adalah budidaya yang 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 (PTM)^[73].

Pelipatan protein sangat penting untuk mempertahankan aktivitas biologis dari recombinant therapeutic proteins. Karena kurangnya kompleks pemrosesan protein dan kapasitas terbatas untuk PTM, protein yang tepat melipat tidak dapat dicapai dalam sistem ekspresi prokariotik^[75]. Tanaman memiliki kapasitas untuk merakit dan

melakukan PTM protein multimerik besar yang diperlukan untuk aktivitas fungsi biologisnya. Namun, tanaman tidak memiliki mekanisme pemrosesan N-glikosilasi manusia yang asli telah diatasi oleh pendekatan glycoengineering menuju sintesis manusia yang ditargetkan dan struktur non-manusia untuk meningkatkan homogenitas, kualitas, dan kuantitas produk^[76,77].

Tabel 2.4.1 : Contoh biofarmasi yang menggunakan sistem ekspresi tumbuhan skala besar yang diproduksi oleh berbagai perusahaan selama beberapa dekade terakhir. (Stoger et al., 2014 yang diadaptasi dari Wang, Eu Sheng 2016)

Company	Plant species	Plant organ/cells	Expression technology	Lead product
Protalix Biotherapeutics	Carrot	Suspension cells	Stable nuclear	ELELYSO® (taliglucerase alfa)
Medicago	<i>Nicotiana benthamiana</i> Alfalfa	Leaves	Proficia (transient), Stable nuclear	Vaccine for pandemic/ Seasonal flu
Kentucky BioProcessing	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Leaves	Transient, agroviral launch vector	Subunit vaccine for influenza
Fraunhofer IME	Tobacco	Leaves	Stable nuclear	Antibody for HIV (microbicide)
Ventria Biosciences	Rice	Seeds	Stable Nuclear	VEN100 (lactoferrin)
Synthon/Biolex Therapeutics	Duckweed	Leafy biomass	Stable nuclear LEX system	Antibody for non-Hodgkin's lymphoma
Planet Biotechnology	Tobacco	Leaves	Stable nuclear	CaroRx (cavity inhibiting treatment)
Icon Genetics	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Leaves	MagnICON (transient)	Vaccine for non-Hodgkin's lymphoma
VAXX	Potato	Tubers	Stable nuclear	Oral subunit vaccine for Norwalk virus (NoroVAXX)
SAFC	Tobacco	Leaves	Stable nuclear	Contract manufacturing
NAIST	Strawberry	Fruits	Stable nuclear	Canine interferon alpha
Mapp Biopharmaceutical/ LeafBio	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Leaves	MagnICON (transient)	Multiple vaccines and microbicides

Singkatan : Fraunhofer CMB, Fraunhofer Centre for Molecular Biotechnology; Fraunhofer IME, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology; NAIST, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology; SAFC, Sigma-Aldrich Fine Chemicals.

2.4.1 Kenapa kami menawarkan tanaman ketimbang E.Coli:

Pada E. coli:

Tabel 2.4.2 Permasalahan pada E.Coli sebagai sistem ekspresi dan strateginya

Issue Addressed	Engineering Strategy	Example Reference
Lack of posttranslational modifications in <i>E. coli</i>	Glycosylation	Expression without the glycosylation (only if the biological activity is not impaired)
		Mutation of residues on the surface to create more soluble protein
		Mutation of glycosylation sites to cysteines to allow subsequent glycosylation <i>in vitro</i>
	Proteolytic maturation	Expression in two separate strains or cleavage of the precursor <i>in vitro</i>
	Disulfide bridge formation	Expression in the periplasmic space
		hGH [8], proinsulin [9]
Protein stability		Decreasing number of free cysteine residues by mutation to alanine
		Deletion of the hydrophobic region
Modulation of protein activity		Design of the rapid-acting or long-acting protein version
		Enhanced activity by improved affinity to the target molecule
		Design of protein consisting of a consensus sequence
		IL-2 [10], IFN- β -1b [11]
		KGF [12]
		insulin [13-17]
		DNaseI [18]
		IFN- α -con [19, 20]

Sumber : J. Shanmugaraj, B.; Malla, A.; Phoolcharoen, W. Emergence of novel coronavirus 2019-nCoV: Need for rapid vaccine and biologics development. *Pathogens* 2020, 9, 148. [CrossRef]

Keuntungan:

tingkat pertumbuhan tinggi, persyaratan media sederhana, kemudahan dalam penanganan, hasil produksi tinggi, dan sangat hemat biaya.

Kelemahan:

hilangnya sifat plasmid, penginduksi yang tidak diinginkan untuk ekspresi gen, akumulasi protein intraseluler heterolog sebagai badan inklusi, refolding protein yang tidak tepat, kurangnya modifikasi pasca translasi (termasuk glikosilasi, maturasi proteolitik, pembentukan ikatan disulfida), beban metabolisme dan stress yang dimediasi protein, kontaminasi endotoksin, sekresi yang buruk, pencernaan proteolitik, serta kompleksitas pada proses hilir^[26-27].

Pada tanaman transgenik:

Pada E.coli (prokariotik) tidak terdapat post translational modification (glikosilasi, maturasi proteolitik, dan pembentukan jembatan disulfida) sehingga diperlukan strategi dengan pendekatan yang berbeda untuk menghasilkan insulin yang fungsional. Sedangkan pada eukariotik memiliki mekanisme post

translational modification yang mana akan meningkatkan efisiensi dari produksi insulin dibandingkan dengan menggunakan E.Coli sebagai platform ekspresi.

Alasan dalam penelitian ini menggunakan tanaman sebagai platform ekspresi karena tumbuhan menawarkan berbagai keuntungan diantaranya lebih ekonomis, skalabilitas yang tinggi, skala produksi yang sudah mendunia, dan tingginya hasil protein, dengan kualitas produk yang tinggi. Selain itu, tumbuhan menawarkan akurasi pelipatan protein yang tinggi dibandingkan bakteri, terdapat modifikasi post translational seperti glikosilasi, jembatan disulfida dan lain lain, dimana pada bakteri tidak dapat mekanisme tersebut. Sedangkan post translational modification sangat dibutuhkan dalam pembentukan protein, terutama pada struktur tersier yang mempengaruhi fungsionalitas dari insulin tersebut.

2.4.2 Alasan menggunakan Aloe vera dibandingkan tumbuhan lain:

1. Menawarkan kemudahan dalam ekstraksi karena protein yang diinginkan terlokalisasi di gel pusat.
2. Hasil produksi yang banyak
3. Mudah dibudidayakan di iklim tropis seperti Indonesia

2.4.3 Alasan menggunakan particle bombardment:

1. Sudah ada beberapa paten tentang produksi protein transgenik pada tumbuhan menggunakan metode ini
2. Karena kloroplas terdapat double membrane, sehingga akan lebih efisien jika menggunakan sistem particle bombardment daripada infeksi oleh Agrobacterium tumefaciens.
3. Lebih praktis dan efisien daripada sistem lain.

2.5 Sistem/Platform Ekspresi

Terdapat berbagai sistem/platform transformasi diantaranya bakteri, sel mamalia, ragi, sel serangga, dan tumbuhan yang memiliki keuntungan masing-masing. Untuk lebih jelasnya pada tabel di bawah ini.

Tabel 2.5.1. Keuntungan dan kerugian berbagai platform ekspresi [78]

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 2.5.2. Perbandingan lain dari berbagai sistem ekspresi untuk protein farmasi rekombinan (diadaptasi dari 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

Meskipun sistem ekspresi berbasis sel mamalia memiliki keuntungan dalam memproduksi antigen vaksin yang secara umum identik dengan inang alaminya, kultur sel mamalia membutuhkan biaya yang besar sehingga menghambat produksi skala besar.

Sistem ekspresi berbasis bakteri atau ragi memungkinkan produksi protein transgenik berskala besar, namun menghasilkan produk yang mana berbeda dari bentuk aslinya (Daniell et al., 2001). Contohnya, protein yang biasanya mengalami glikosilasi

pada hewan tidak mengalami proses tersebut pada bakteri dan kemungkinan akan mengalami hiperglikosilasi pada jamur, yang akan menghasilkan ekspresi protein yang sedikit pada kedua sistem (Harashima, 1994).

Sistem ekspresi berbasis tumbuhan menawarkan beberapa keuntungan, diantaranya adalah skalabilitas cepat tanpa membutuhkan fermentor rumit atau bioreaktor, relatif lebih ekonomis, ekspresi protein yang tinggi, risiko minimal kontaminasi dari patogen mamalia atau racun bakteri, heat stable, serta, teknologi yang tersedia untuk panen dan pengolahan tanaman dan produk tanaman dalam skala besar (Daniell et al., 2001) dibandingkan dengan produksi konvensional. Oleh karena itu, maka kami memilih tumbuhan sebagai platform yang ideal untuk ekspresi protein transgenik.

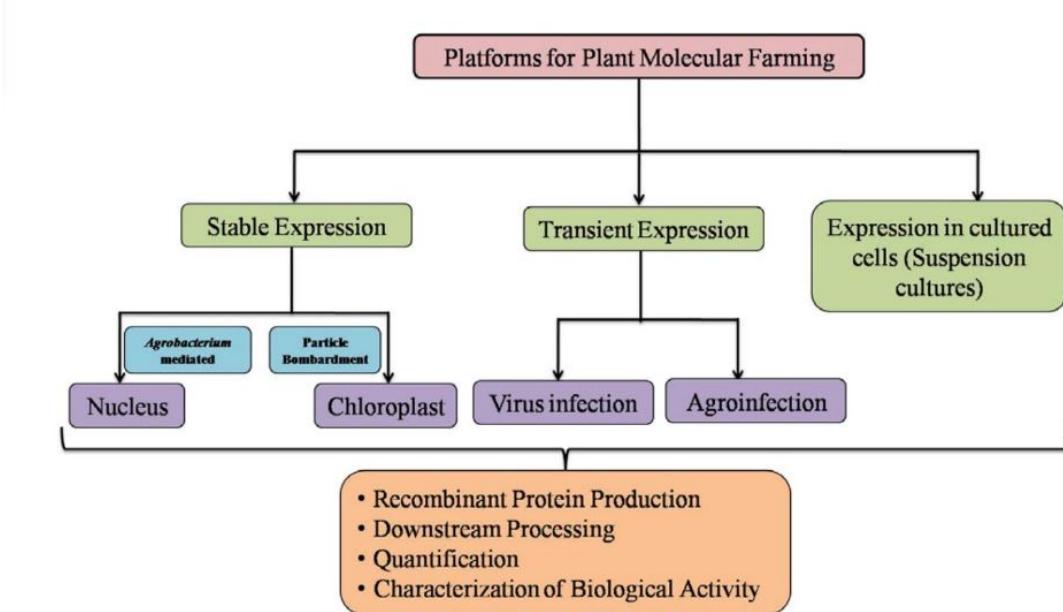
Secara umum, metode transformasi yang efisien harus hemat biaya, tidak memerlukan penggunaan bahan kimia berbahaya atau karsinogenik, memiliki prosedur langsung, memungkinkan pengenalan transgen yang tepat ke dalam host yang dituju, memungkinkan integrasi transgen pada jumlah salinan rendah; dan memungkinkan regenerasi tanaman yang nyaman pasca-transformasi.

Metode transformasi dibagi menjadi langsung atau kategori tidak langsung tergantung pada mode tindakan mereka. Metode tidak langsung biasanya membutuhkan agen biologis seperti bakteri untuk pengiriman transgen ke dalam Tanaman inang sedangkan metode langsung biasanya bersifat fisik, melibatkan langsung penetrasi DNA ke dalam sel inang yang dituju.

Tanaman sebagai biofaktori untuk ekspresi protein heterolog

Kemajuan signifikan dalam dekade terakhir yang mengarah ke produksi protein yang diturunkan dari biofarmasi tumbuhan, seperti vaksin, antibodi, regulator pertumbuhan manusia, produksi hormon dan darah yang mengarah pada munculnya molecular pharming. (Fischer and Emans, 2000; Giddings, 2001).

2.6. Tipe Ekspresi



(Gambar 2.6.1. Skema strategi pendekatan tanaman transgenik untuk memproduksi protein pada tumbuhan^[79].)

Kunci utama dalam menghasilkan level transkripsi yang tinggi adalah regulatory genetic elements, terutama promoter dan sisi poliadensilasi. Level ekspresi bergantung pada tingginya level translasi, pelipatan yang benar, target yang tepat, dan stabilitas protein.

Tabel 2.6.1. perbandingan tipe ekspresi manipulasi genetik^[80].

Ekspresi Transient	Ekspresi Nuclear	Ekspresi Kloroplas
Manipulasi yang mudah pada vektor virus dan bakteri	Banyak metode manipulasi genetik yang sesuai untuk sistem ini.	Manipulasi yang mudah, resisten terhadap silencing gen
Hasil ekspresi yang tinggi	Membutuhkan waktu yang relatif lama untuk manipulasi genetik	Hasil ekspresi yang tinggi karena banyaknya kloroplas per sel
Resiko kontaminasi yang tinggi dari transfer gen ke lingkungan		Resiko kontaminasi yang rendah dari transfer gen ke lingkungan
Ekspresi yang cepat		Metode transformasi yang terbatas
		Tidak terdapat jalur glikosilasi yang tetap

2.6.1 Ekspresi Kloroplas

Ekspresi kloroplas melibatkan pengenalan transgen ke dalam genom kloroplas menggunakan gene gun. Mentransformasi gen rekombinan ke dalam genome kloroplas memiliki banyak keuntungan dibandingkan transformasi nuclear. Genom kloroplas lebih mudah untuk dimanipulasi. Jika genom kloroplas telah di urutkan, kaset transgen dapat dibuat untuk memasukkan gen asing ke daerah spacer antara kloroplas fungsional gen, menggunakan dua urutan flanking sequences pada genom kloroplas, melalui rekombinasi homolog (Daniell, Lin, Yu, & Chang, 2016; Danielly, Streatfield, Streatfield, & Wycoff, 2001).

Transformasi ke dalam genom kloroplas lebih susah daripada transformasi ke dalam genom nuclear dikarenakan halangan membran double pada kloroplas dan kurang diketahuinya virus yang dapat menginfeksi kloroplas. Tetapi, transformasi yang efektif telah didapatkan dengan menggunakan metode gene gun dengan menembak jaringan tumbuhan muda dengan emas dan partikel tungsten yang dilapisi DNA (Verma, Samson, Koya, & Daniell, 2008). Terdapat ribuan kopie pada genom kloroplas di setiap sel daun, telah didapatkan hasil yang tinggi (lebih dari 70% protein yang larut pada daun tanaman) (Daniell et al., 2016). Keuntungan lainnya yaitu resiko yang rendah gen terkontaminasi ke lingkungan karena kloroplas maternally inherited.

Keuntungan dari Transformasi Kloroplas

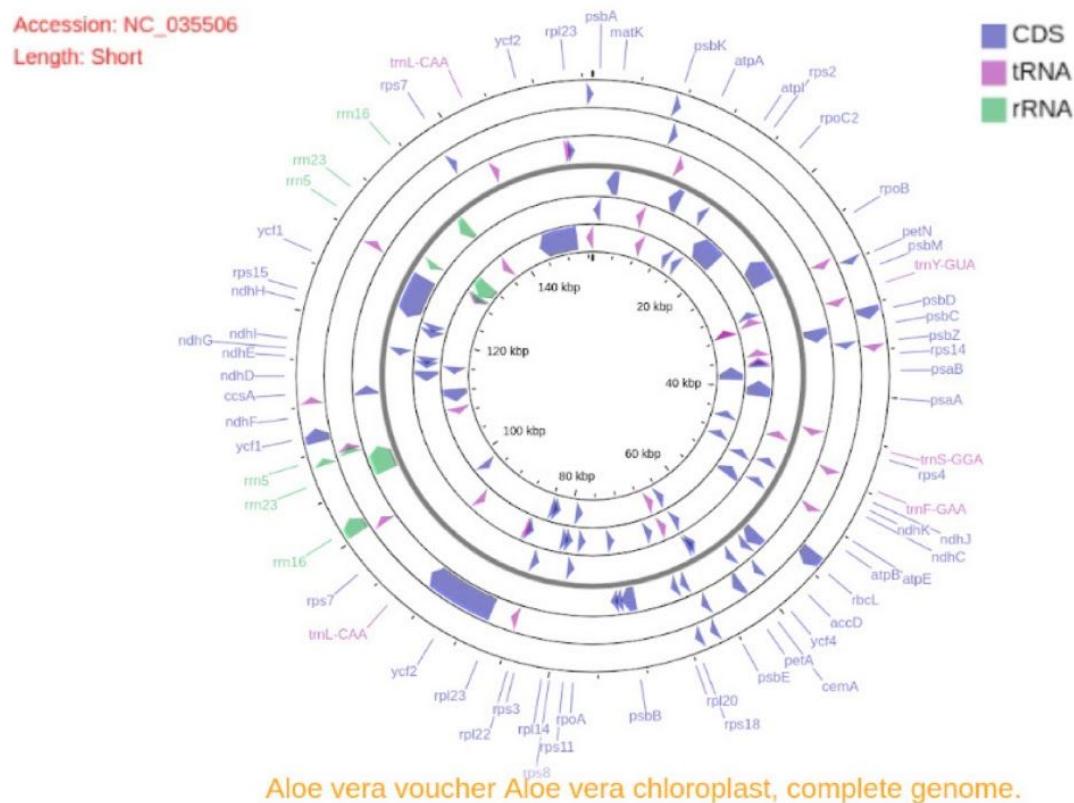
Kloroplas juga mampu mengakumulasi protein transgenik dalam jumlah besar hingga 46% dari total protein pada daun yang diikuti dengan ekspresi dan integrasi transgene yang stabil (De Cosa et al., 2001). Hal ini terutama disebabkan oleh sifat poliploid dari genom kloroplas di mana hingga 100 genom salinan bisa ada dalam satu kloroplas. Sebuah sel tumbuhan yang aktif secara fotosintesis bisa mengandung hingga 100 kloroplas yang berjumlah sekitar 10.000 salinan genom per sel yang fungsional (Verma dan Daniell, 2007).

Selain itu, transgen ke dalam genom kloroplas terjadi di situs secara spesifik melalui dua peristiwa rekombinasi homolog. Berbeda dengan transformasi inti, pada transformasi kloroplas terdapat jumlah salinan yang tinggi karena tidak terdapat mekanisme silencing gene. Keuntungan lainnya dari sistem ekspresi

berbasis kloroplas adalah kapasitas dari ekspresi polisistronik yang menyebabkan vaksin atau antibodi multivalen yang akan diekspresikan dari transkrip mRNA tunggal (Quesada-Vargas et al., 2005). Modifikasi post translational seperti pembentukan ikatan disulfida (Staub et al., 2000; Ruhlman et al., 2007), modifikasi lipid (Glenz et al., 2006) juga terjadi di kloroplas yang mengakibatkan pelipatan yang benar dan dari ekspresi protein kloroplas.

Organisasi Genom Kloroplas : Konsep dari Transformasi Kloroplas

Genom kloroplas tumbuhan tingkat tinggi terdiri dari unit dasarDNA untai ganda sekitar 120 hingga 220kb dan dapat ditemukan di beberapa konfigurasi yang berbeda seperti bentuk multimerik, monomerik atau linier (Palmer, 1985; Lilly et al., 2001).



(Gambar 2.6.2. Visualisasi genome kloroplas *Aloe vera* dengan CGView)

DNA asing dapat dimasukkan ke dalam kloroplas dengan cara pengiriman melalui bombardemen partikel (Daniell et al., 1990; Sanford et al., 1993) atau melalui permeasi PEG (Golds et al., 1993; O'Neill et al., 1993). DNA asing itu kemudian diintegrasikan ke dalam genom kloroplas melalui two site-directed

homologous recombination diantara homologous flanking sequences pada vektor transformasi dan sekuens endogenous pada genom. Proses ini difasilitasi oleh mekanisme RecA-type yang sama dengan mekanisme E.coli DNA repair (Cerutti et al., 1992). Oleh karena itu, flanking homologous recombination pada vektor transformasi kloroplas harus didesain secara spesifik sesuai dengan urutan genom yang dipilih sebagai transgene insertion (gambar di atas desain nya). Selain itu, sekuens 1kb lebih sering dipilih agar lebih spesifik dan mencegah penggabungan dari transgen di situs non-spesifik (Verma and Daniell, 2007).

Transformasi dicapai ketika transgen berhasil dimasukkan ke dalam beberapa salinan genom kloroplas, diikuti oleh 25 hingga 30 siklus pembelahan sel di bawah tekanan seleksi antibiotik untuk menghilangkan yang tidak ditransformasi kloroplas. Akibatnya, populasi kloroplas menjadi homogen dengan genom yang ditransformasikan tercapai, disebut sebagai populasi homoplastomik.

Dalam percobaan transformasi kloroplas awal, transgen ditargetkan ke daerah spacer transcriptionally silent untuk mencegah segala kemungkinan untuk gangguan gen kloroplas endogen (Svab dan Maliga, 1993). Meskipun ekspresi transgen berhasil mencapai integrasi transgen ke dalam daerah spacer transkripsi aktif terbukti lebih efektif dan menawarkan sejumlah keunggulan unik seperti mengurangi

ketergantungan pada elemen regulasi (UTR) 5' dan 3' yang tidak diterjemahkan atau promotor untuk regulasi ekspresi transgen (Verma dan Daniell, 2007). Sejauh ini, wilayah spacer transkripsi aktif antara gen trnI dan trnA di dalamnya operon rrn yang terletak di kedua ujung wilayah IR yang paling dekat dengan SSC dari genom kloroplas adalah situs yang paling umum digunakan untuk integrasi dari transgen. Transgen yang terintegrasi dan diekspresikan dari situs ini telah mencatat tingkat ekspresi tertinggi dibandingkan dengan situs integrasi lainnya pada genom kloroplas tembakau (De Cosa et al., 2001). Sehingga, berdasarkan hasil studi literatur dapat diambil kesimpulan bahwa integrasi transgen ke dalam daerah spacer daerah transkripsi aktif mungkin terbukti sangat bermanfaat untuk tingkat ekspresi transgen yang tinggi.

Regulasi dari Ekspresi Gen Kloroplas

Aspek fundamental dari ekspresi gen kloroplas meliputi transkripsi gen, post-transcriptional mRNA processing, modulasi stabilitas mRNA, dan translasi mRNA telah ditinjau secara ekstensif oleh Gillham et al., 1994; Mayfield et al., 1995; Rochaix, 1996; Sugita dan Sugiura, 1996; Barkan dan Goldschmidt-Clermont, 2000; Monde dkk., 2000; Zerges, 2000.

2.7 Metode Transformasi

Semua metode transformasi terutama bertujuan untuk mencapai satu tujuan bersama yaitu, transfer molekul asam deoksiribonukleat (DNA) ke dalam sel target.

2.7.1 Metode Transformasi Tidak Langsung

Transformasi yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens*

Metode transformasi tidak langsung yang sering digunakan melibatkan penggunaan *Agrobacterium tumefaciens* dan *Agrobacterium rhizogenes* untuk transfer transgen dalam bentuk plasmid ke dalam genom inti tanaman. Baik *Agrobacterium tumefaciens* dan *Agrobacterium rhizogenes* adalah bakteri tanah secara alami yang berhubungan dengan neoplastik penyakit mahkota empedu dan akar yang berbulu, yang terdapat pada spesies malus (Gelvin, 1990).

Ukuran plasmid yang digunakan untuk transformasi agrobacterium umumnya antara 5 dan 12kb termasuk backbone plasmid yang sangat penting untuk replikasi plasmid. Plasmid untuk transformasi agrobacterium terutama didasarkan pada tumor-inducing (Ti) plasmid yang menyebabkan pembentukan tumor dan sintesis opine melalui transfer gen yang terlibat dalam sintesis auksin dan sitokinin dan sintase nopalit ke dalam genom inti tanaman yang terinfeksi (Gelvin, 1990).

Transformasi gen yang dimediasi *Agrobacterium* pengiriman gen biasanya dikaitkan dengan jumlah salinan yang rendah dan integrasi transgen yang stabil ke dalam genom inti inang (Newell, 2000). Kerugian umum termasuk efisiensi transformasi yang rendah, integrasi transgen yang acak, ketergantungan spesies dan persyaratan pengoptimalan yang ketat untuk protokol transformasi.

2.7.2 Metode Transformasi Langsung

Transformasi yang dimediasi Particle Bombardment

Dalam rekayasa genetika, gene gun atau sistem pengiriman partikel biolistic/particle bombardment adalah alat yang digunakan untuk mengirimkan DNA eksogen (transgen), RNA, atau protein ke sel. Dengan melapisi partikel logam berat dengan gen yang diinginkan dan menembakkan mikro-proyektil ini ke dalam sel menggunakan kekuatan mekanis, integrasi informasi genetik yang diinginkan dapat diinduksi ke dalam sel. Teknik yang terlibat dengan pengiriman mikro-proyektil DNA sering disebut sebagai biolistik^[177].

Particle Bombardment juga dikenal sebagai gene gun, dikembangkan untuk memungkinkan penetrasi dinding sel sehingga materi genetik yang mengandung gen yang diinginkan dapat ditransfer ke dalam sel. Sistem ini juga dapat mentransformasi hampir semua tipe sel dan tidak hanya terbatas pada nukleus, namun juga dapat untuk transformasi organel, meliputi plastid (kloroplas) dan mitokondria^[233].

Penembakan partikel (Particle bombardment atau biolistik) adalah metode yang paling banyak digunakan pada transformasi tanaman langsung. Materi DNA yang bisa berupa DNA, dalam bentuk plasmid atau dalam vektor virus atau bakteri yang terikat pada mikron inert hingga sub microcarrier berukuran mikron dari emas atau tungsten dan dibombardir ke dalam jaringan tanaman (Stanford, 1988; Klein et al., 1988).

Metode bombardir partikel dimulai dengan melapisi partikel tungsten atau emas (mikro proyeksi) dengan DNA plasmid. Partikel yang dilapisi dilapisi pada proyektil makro, yang dipercepat dengan tekanan udara dan ditembakkan ke jaringan tanaman pada cawan petri (Gan, 1989), seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.7.1. Pelat berlubang digunakan untuk menghentikan proyektil makro, sambil membiarkan mikro proyeksi melewati sel di sisi lain. Saat mikro proyeksi memasuki sel, transgen dilepaskan dari permukaan partikel dan dapat bergabung ke dalam DNA kromosom sel. Selectable marker digunakan untuk mengidentifikasi sel yang mengambil transgen. Sel tumbuhan yang telah diubah kemudian beregenerasi menjadi tumbuhan utuh menggunakan kultur jaringan^[181].

Aplikasi

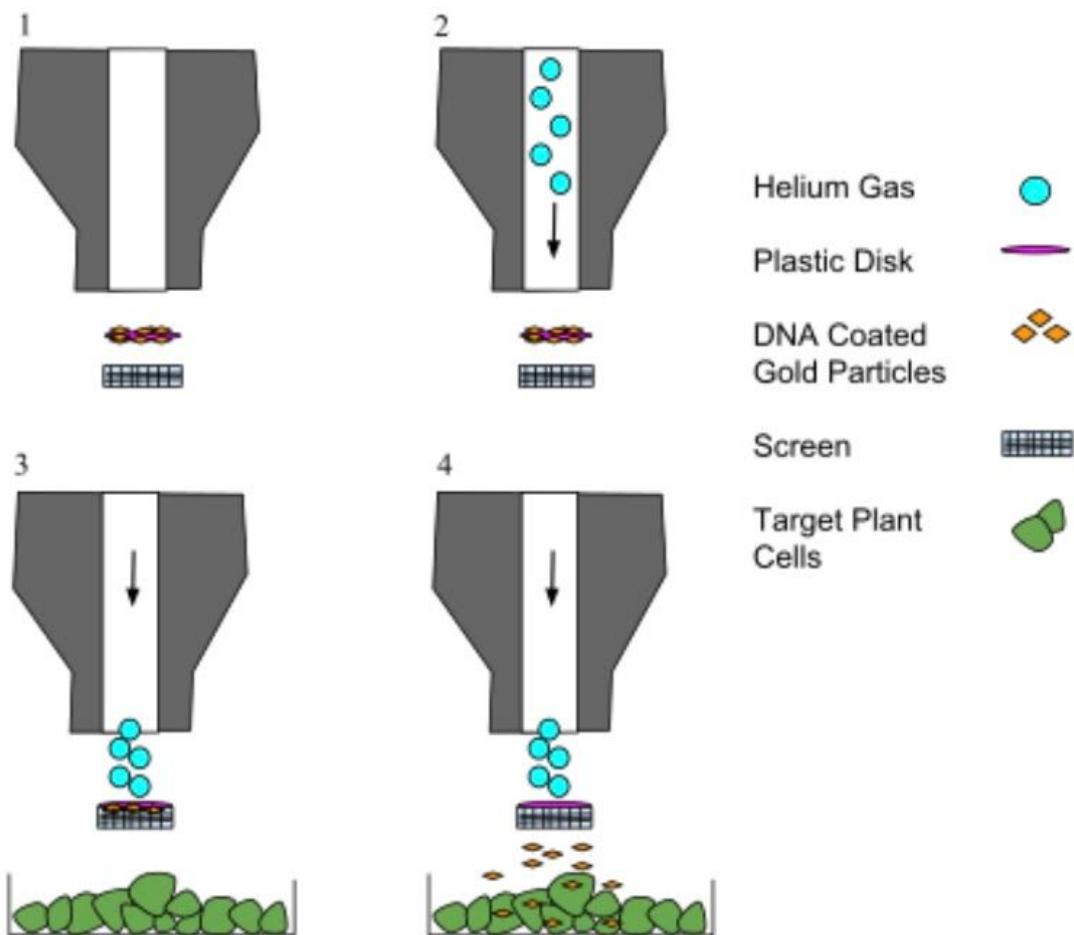
Teknik particle Bombardment kebanyakan digunakan pada tanaman. Namun, juga dapat diaplikasikan pada manusia dan hewan. Target dari gene gun biasanya berupa kalus dari sel tumbuhan. Setelah partikel emas berlapis DNA dikirim ke sel, DNA digunakan sebagai template untuk transkripsi (ekspresi transien) dan terkadang terintegrasi ke dalam kromosom tumbuhan (transformasi 'stabil')^[178].

Partikel logam yang sudah ditempeli gen target dimasukkan ke dalam senjata gen (Gene Gun) dan kemudian ditembakkan pada sel tanaman. Partikel akan mempenetrasi dinding sel tanaman sehingga masuk ke dalam sitoplasma. Partikel akan tercuci oleh cairan sel sehingga gen target yang menempel akan lepas dan kemudian masuk ke dalam nukleus dan menyisip pada kromosom sel tanaman^[178].

Keunggulan

Biolistik telah terbukti menjadi metode modifikasi genetik yang serbaguna dan banyak digunakan pada rekayasa genetika tanaman^[179]. Transformasi plastid dimediasi particle bombardment mengalami kesuksesan besar dibandingkan dengan teknik lain, seperti transformasi yang dimediasi Agrobacterium, yang mengalami kesulitan menargetkan vektor dan mengekspresikan secara stabil di kloroplas^[178,179]. Selain itu, kloroplas tidak membungkam transgen yang dimasukkan dengan gene gun^[181]. Dan, hanya dengan satu tembakan, seorang teknisi yang terampil dapat menghasilkan dua organisme transgenik^[180].

Keuntungan particle bombardment termasuk species independency, kemampuan untuk meregenerasi garis transgenik yang stabil, transformasi yang cepat dan kemungkinan transformasi pada nuclear dan genom plastida. Kekurangan dari metode ini termasuk kecenderungan menghasilkan jumlah salinan yang tinggi, kemungkinan kerusakan pada sel, dan biaya yang relatif tinggi dibandingkan dengan transformasi yang dimediasi Agrobacterium.



Gambar 2.7.1 Gene gun. (Sumber : AP_Biology_Bapst_2015)

2.8 Desain Konstruksi Biolistik

Transformasi biolistik melibatkan integrasi fragmen fungsional DNA yang dikenal sebagai konstruksi DNA ke dalam sel target. Sebuah konstruksi gen adalah kaset DNA yang berisi semua elemen pengaturan yang diperlukan untuk ekspresi yang tepat dalam organisme target^[179]. Sementara konstruksi gen dapat bervariasi dalam desainnya tergantung pada hasil yang diinginkan dari prosedur transformasi, semua konstruksi biasanya mengandung kombinasi urutan promotor, urutan terminator, gen yang diinginkan, dan gen reporter.

2.8.1 Promoter

Promoter mengontrol lokasi dan magnitude dari ekspresi gen dan berfungsi sebagai “roda pedal dan pedal gas” dari sebuah gen^[179]. Promoter adalah faktor utama yang mempengaruhi level dan stabilitas dari ekspresi transgenik (Curtis et al.

1994). Promotor mendahului gen yang diinginkan dalam konstruksi DNA dan dapat diubah melalui desain laboratorium untuk menyempurnakan ekspresi transgen.

Promoter yang sering digunakan pada tanaman dikotil adalah CaMV 35S dari Cauliflower mosaic virus (Ma et al., 2003), promoter konstitutif kuat yang dapat ditingkatkan dengan duplikasi enhancer (Kay, Chan, Daly, & McPherson, 1987).

Pada penelitian ini kami menggunakan 2 promoter :

- **psbA Promoter (Sebagai promoter untuk gene of interest ke dalam Kloroplas)**

Promotor psbA kloroplas telah ditemukan sebagai promotor terkuat untuk ekspresi gen asing dalam kloroplas (Daniell dan McFadden, 1987; Daniell, 1993). Ekspresi gen asing biasanya diperiksa pada *E. coli* sebelum melanjutkan transformasi kloroplas karena mesin transkripsi dan translasi pada *E. coli* mirip dengan kloroplas tanaman (Daniell, 1993).

Promotor psbA efektif dalam transkripsi gen asing pada *E. coli* dan tidak memerlukan induksi IPTG. Telah dibuktikan bahwa promotor kacang psbA mengandung urutan 10 dan 35 bp hulu dari situs inisiasi transkripsi yang homolog dengan urutan promotor prokariotik dan bahwa transkrip yang dihasilkan secara *in vivo*, *in vitro*, dan di *E. coli* serupa (Boyer dan Mullet, 1986). Promotor ini juga berisi sekuens konsensus kotak CAAT dan TATA eukariotik yang diperlukan untuk inisiasi transkripsi dalam inti eukariotik (Cornelissen dan Vandewiele, 1989).

Kebanyakan promotor plastida yang dikenali oleh RNA polimerase (PEP) mirip bakteri mirip dengan promotor tipe *E. coli* σ 70 yang terdiri dari elemen “-35” dan “-10”. Di antara mereka, promotor psbA unik dalam membawa elemen tambahan antara elemen -35 dan -10 yang dikonservasi. Aktivitas promotor psbA dipertahankan secara berbeda di kloroplas dewasa dimana aktivitas sebagian besar promotor PEP menurun.

Sudah terdapat penelitian dua jenis kegiatan PEP pada bibit gandum [Satoh et al. (1999) Tanaman J. 18: 407]; PEP yang ada dalam kloroplas matang dari ujung daun (PEP tipe ujung) dapat memulai transkripsi dari promotor psbA yang rusak -35, tetapi elemen -35 penting untuk transkripsi oleh PEP yang ada dalam kloroplas yang belum matang dari pangkal daun (basis- ketik PEP). Unsur

promotor -35 penting untuk inisiasi transkripsi pada promotor psbA pada semua jenis plastida, termasuk kloroplas pada daun dewasa, leukoplas pada akar, etioplas pada kotiledon yang mengalami etiolasi^[149].

- **CamV 35s promoter (*Sebagai promoter selectable marker*)**

Promotor 35S, yang berasal dari virus mosaik kembang kol (CaMV), adalah komponen konstruksi transgenik lebih dari 80% tumbuhan hasil rekayasa genetika (GM). Promotor RNA 35S adalah promotor konstitutif yang sangat kuat yang bertanggung jawab atas transkripsi seluruh genom CaMV. Ini terkenal karena penggunaannya dalam transformasi tanaman. Studi terbaru menunjukkan bahwa promoter CaMV 35S juga berfungsi pada beberapa sel hewan, meskipun elemen promotor yang digunakan berbeda dengan yang ada pada tumbuhan.

Struktur :

CaMV mengandung molekul DNA untai ganda melingkar sekitar 8,0 kilobase, terganggu oleh torehan yang dihasilkan dari tindakan RNase H selama transkripsi balik. Torehan ini berasal dari Met-tRNA, dan dua primer RNA yang digunakan dalam transkripsi terbalik. Setelah memasuki sel inang, "torehan" untai tunggal dalam DNA virus ini diperbaiki, membentuk molekul superkoil yang mengikat histon.

2.8.2 Polyadenilation

Salah satu faktor yang menentukan level ekspresi dan juga penting untuk export mRNA dari nukleus dan pada translasi, dan menjadi kunci pada stabilitas mRNA (Ma et al., 2003).

2.8.3 Terminator :

Urutan terminator diperlukan untuk ekspresi gen yang tepat dan ditempatkan setelah wilayah pengkodean gen yang diinginkan dalam konstruksi DNA. Terminator umum untuk transformasi biolistik adalah terminator NOS yang diturunkan dari Agrobacterium tumefaciens. Karena tingginya frekuensi penggunaan terminator ini pada tanaman rekayasa genetika, strategi telah dikembangkan untuk mendeteksi keberadaannya dalam pasokan makanan untuk memantau tanaman RG yang tidak sah^[110].

Metode ini memiliki keunggulan kemudahan dan kecepatan dalam penyusunan konstruk, karena gen yang diinginkan dapat dimasukkan ke dalam vektor biner yang sudah berisi promotor dan domain inverted nos dalam satu langkah kloning, dan tidak memerlukan pengetahuan apapun tentang urutan DNA^[97].

2.8.4 Marker gene (Gen Penanda)

Dalam biologi nuklear dan biologi molekuler, gen penanda adalah gen yang digunakan untuk menentukan apakah urutan asam nukleat telah berhasil dimasukkan ke dalam DNA suatu organisme. Secara khusus, ada dua subtipe dari gen penanda ini: *selectable marker* dan *screenable marker*.

Selectable Marker

Selectable marker memungkinkan pemilihan sel yang telah mengalami transformasi. Umumnya, penanda ini memberikan resistensi terhadap senyawa fototoksik seperti antibiotik dan herbisida. Merupakan gen dominan yang stabil dan merupakan bagian integral dari vektor transformasi. Kriterianya adalah seleksi positif untuk gen resisten yang tanpanya sel yang tidak ditransformasi akan mati saat agen seleksi diterapkan. Idealnya, agen seleksi tidak boleh mempengaruhi sel yang ditransformasikan dan harus efisien bahkan pada konsentrasi yang lebih rendah. Contoh selectable marker adalah cat, nptII (resisten terhadap kanamycin, hpt (resisten terhadap hygromycin), bar, manA, dan lain-lain^[98].

Hygromycin phosphotransferase (HPT) (hpt)

hpt (atau aph IV) adalah gen dari Escherichia coli yang mengkode enzim HPT (E.C. 2.7.1.119) dan resisten terhadap antibiotik hygromycin B (Waldronet al., 1985). Ketika higromisin menempati tempat pengikatan ribosomal dari faktor elongasi 2 (EF-2) dalam sel prokariotik, akibatnya elongasi rantai polipeptida terhambat dan sintesis protein terputus, menyebabkan gejala yang sama yang dijelaskan untuk antibiotik aminoglikosida lainnya.

Dalam sel tumbuhan, antibiotik ini mengerahkan pengaruhnya pada mitokondria dan kloroplas, bekerja dengan cara yang sama dengan merusak sintesis protein. Organel ini memiliki ribosom yang mirip dengan yang

ditemukan pada bakteri dan juga rentan terhadap antibiotik aminoglikosida. Oleh karena itu, dengan adanya antibiotik, jaringan tanaman akan menunjukkan klorosis, yang disebabkan oleh kurangnya sintesis klorofil dan terhambatnya pertumbuhan.

2.9 Memilih Tanaman Model

Tabel 2.9.1 Perbandingan beberapa tanaman model (diadaptasi dari Spok and Karner 2008, European Communities and other sources).

Features/Crop	Organ	Yield	Storage/Protein stability	Transformation	Production Costs	Specialty
Tobacco	Leaf	High	Limited	Well established	Good	Nonfood/feed
Alfalfa	Leaf	High	Limited	Established	Good	Homogenous N glycosylation, use atmospheric N ₂
Wheat	Seed	Good	Optimal	Inefficient	Optimal	
Maize	Seed	High	Optimal	Established	Optimal	
Pea	Seed	Good	Optimal	Limited	Good	
Rapeseed	Seed	Good	Optimal	Established	Optimal	Fusion with oleosin for easy purification
Potato	Tuber	Good	Good	Well established	Good	
Banana	Fruit	Good	Good	Inefficient	Good	Can be eaten raw
Aloe vera	Leave	High	Good	Efficient	Optimal	As a food, medicine cosmetic plant

2.9.1 Aloe vera

Aloe vera adalah tanaman sukulen yang berasal dari Jazirah Arab. Saat ini, Aloe vera telah menyebar ke berbagai belahan dunia. Menurut Dowling (1985), hanya 3 jenis lidah buaya yang dibudidayakan secara komersial di dunia, yakni: Curacao aloe (*Aloe barbadensis* Miller), Cape aloe (*Aloe ferox* Miller), dan Socotrine (*Aloe perryi* Baker).

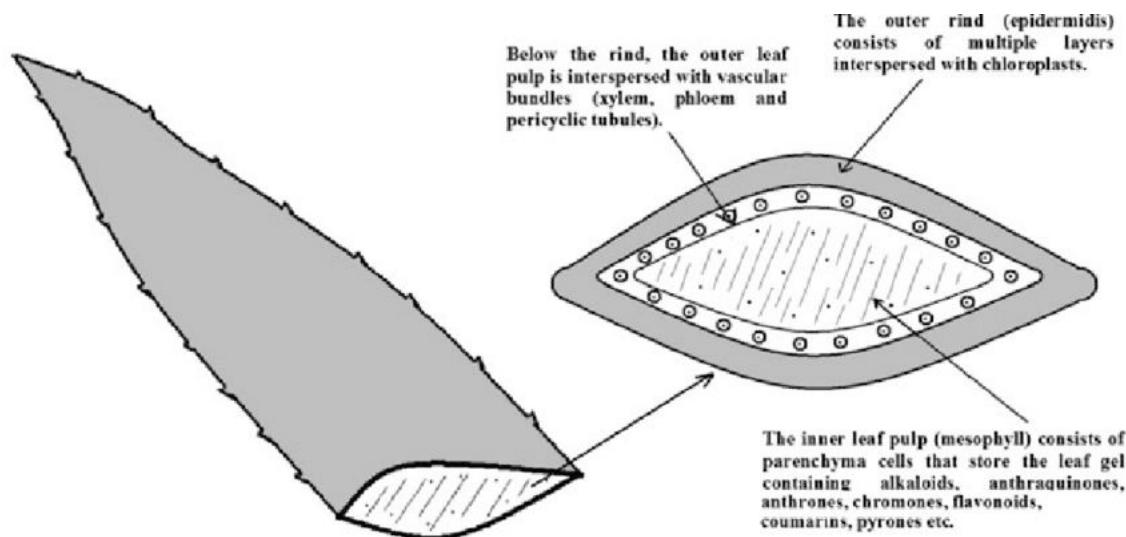
Jenis yang paling banyak dibudidayakan adalah *Aloe barbadensis* Miller, sedangkan di Indonesia yang paling banyak dikembangkan adalah *Aloe chinensis* Baker. Jenis ini dikembangkan di Kalimantan dan lebih dikenal dengan nama Lidah Buaya Pontianak. Ciri-ciri tanaman ini adalah bunga berwarna oranye, pelepas berwarna hijau muda, pelepas bagian atas agak cekung dan mempunyai totol putih di pelepasnya ketika tanaman masih muda^[46].

Fisiologi Aloe vera

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.



(Gambar 2.9.1 Skema daun *Aloe vera* (Cock 2015))

Transformasi dan Rekayasa genetik

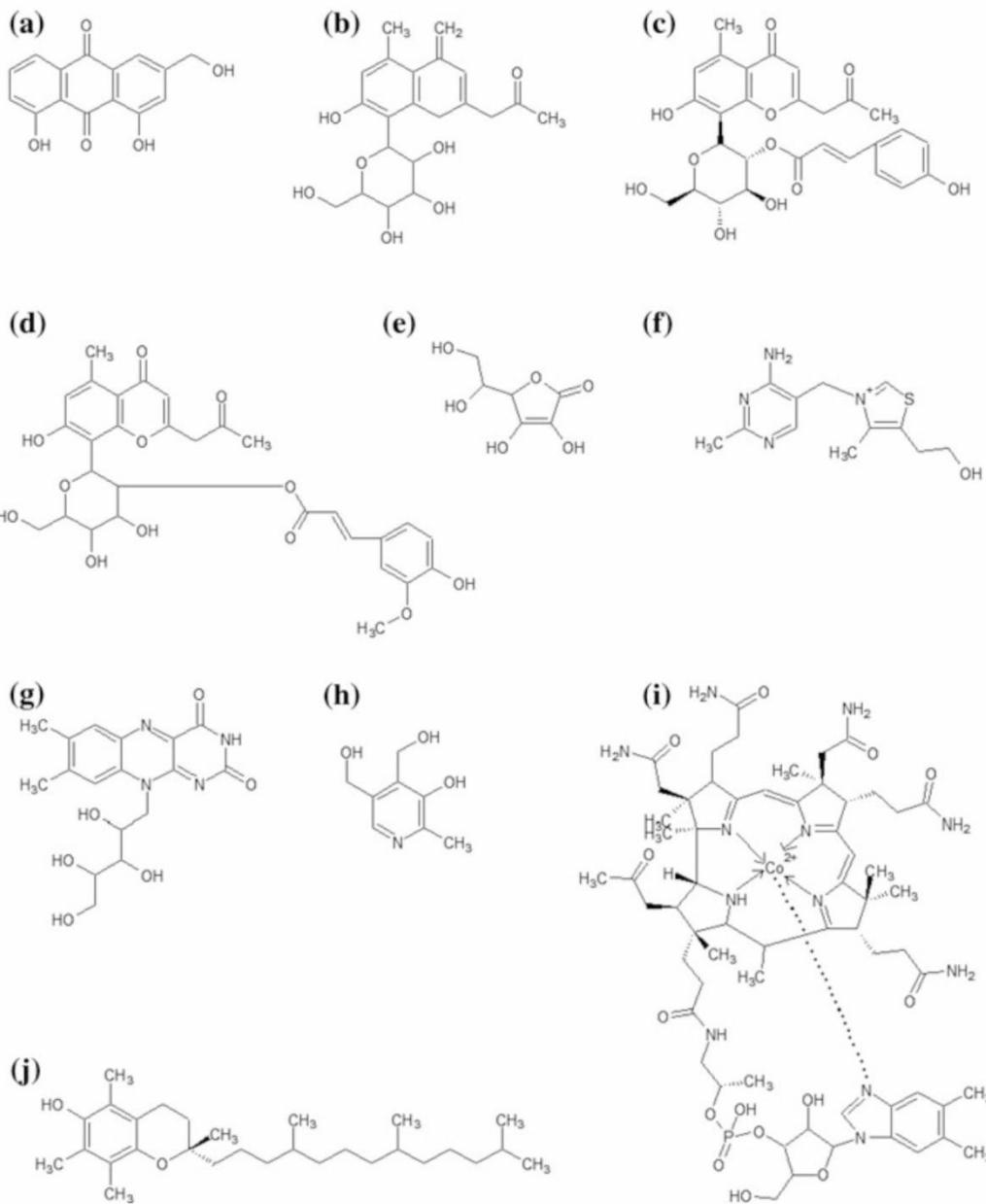
Semenjak akhir abad 20, *Aloe vera* mulai mendapat perhatian untuk rekayasa genetika. Hal ini disebabkan oleh berbagai macam keuntungan yang ditawarkan *Aloe vera*. Komponen *Aloe vera* dilaporkan memiliki sifat antijamur, antisепtik, antivirus, antibakteri, anti-inflamasi, antioksidan, dan penyembuhan luka^[7]. Namun, terdapat beberapa halangan dalam kultur *Aloe vera* transgenik. Halangan tersebut berupa:

1. browning dan letupan oksidatif terutama pada kultur bermedium cair sering menyebabkan kematian eksplan *Aloe* (Natali et al, 1990);
2. sitokinin, yang biasanya digunakan untuk mempromosikan regenerasi, telah dilaporkan dapat menyebabkan peningkatan sekresi fenol dalam sel *Aloe* (Natali et al. 1990; Meyer dan van Staden 1991; Roy dan Sarkar 1991);

3. *Agrobacterium* yang merupakan faktor tambahan terjadinya nekrosis pada eksplan setelah kultivasi.
4. Ekskresi polyphenol sebelumnya telah dilaporkan menjadi pembatas transformasi tanaman pada spesies lainnya (Lagrimini 1992; Perl et al.1996; Dan 2008)^[63].

Pretreatment dengan antioksidan menunjukkan pengurangan letupan oksidatif dan nekrosis pada eksplan (Enriquez-Obregon et al. 1999; Dan 2008). Selain itu, dithiothreitol (DTT) dilaporkan lebih efektif dibandingkan jenis antioksidan lainnya (Apostol et al. 1989)^[63].

Kandungan Nutrisi



(Gambar 2.9.2 Struktur kimia molekul dengan antioksidan teridentifikasi pada *Aloe* spp. gel daun: a) Aloe emodin, b) Aloesin, c) 2'-Op-Coumaroylaloesin, d) 2'-O-Feruloylaloesin, e) Asam askorbat (vitamin C), f) Vitamin B1 (tiamin), g) Vitamin B2 (riboflavin), h) Vitamin B6 (pyridoxal phosphate), i) Vitamin B12, j) α -Tocopherol (vitamin E) (Cock 2015).)

Berbagai macam kandungan nutrisi dalam pelepasan lidah buaya antara lain adalah^[46]:

1. Vitamin, yaitu A, B1, B2, B3, B12, C, E, Choline, Inositol, Folic Acid

2. Mineral, yaitu Kalsium, Magnesium, Potassium, Sodium, Iron, Seng, Chromium
3. Enzim, yaitu Amylase, Catalase, Cellulose, Carboxy Epilase, Carboxy Cellulose, Bradykinase
4. Asam Amino, yaitu Arginin, Asparagin, Aspartat Acid, Alanine, Serine, Glutamate, Threonine, Glycine, Phenylalanine, Histidine, Isoleucine

Persebaran *Aloe vera*

Aloe vera merupakan tanaman asli dari Jazirah Arab, namun, semenjak abad 17, *Aloe vera* mulai dikembang biakan di Cina dan Eropa. Kini *Aloe vera* tersebar luas di daerah beriklim tropis, subtropis, dan kawasan kering di benua Amerika, Asia, dan Australia (wikipedia).



(Gambar 2.9.3 Peta persebaran *Aloe vera* www.discoverlife.org)

Manfaat *Aloe vera*

Pengobatan Tradisional

Aloe vera telah dikenal sebagai tanaman obat sejak puluhan abad silam. Catatan sejarah terawal penggunaan lidah buaya terdapat di Papyrus Ebers dari Mesir 16 abad sebelum masehi^[48]. Abad ke-1 M, penggunaannya dicatat dalam De Materia Medica karya tabib Yunani [Pedanius Dioscorides](#), dan [Naturalis Historia](#) karya penulis Romawi [Plinius Tua](#)^[48]. Di [Bizantium](#) abad ke-6 M, penggunaan tanaman ini dicatat dalam [Juliana Anicia Codex](#)^[47]. Dalam

pengobatan [Ayurveda](#) tumbuhan ini disebut kadhala (sama dengan tumbuhan [agave](#))^[49].

Produk Kesehatan

Terdapat dua zat dari lidah buaya yang sering digunakan, yaitu gel (berwarna bening) dan latex (berwarna kuning). Gel lidah buaya digunakan untuk obat oles untuk berbagai gejala kulit, seperti luka bakar, luka, [radang](#), [radang dingin](#), [psoriasis](#), [Herpes labialis](#), atau kulit terlalu kering. Lateks lidah buaya dijadikan produk (baik bahan itu sendiri maupun digabungkan dengan bahan lain) untuk obat yang ditelan untuk menyembuhkan [sembelit](#)^[50,51].

Produk Kosmetik

Seperti yang tertera di atas, lidah buaya memiliki banyak khasiat bagi kulit. Oleh sebab itu, banyak penelitian yang dilakukan untuk mencari tahu khasiat lidah buaya dan memproduksinya. Selain itu, sudah ada beberapa penelitian mengenai Aloe vera transgenik untuk produksi protein protein yang dapat dimanfaatkan untuk keperluan kosmetik^[52].

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. Keterlibatan pemerintah dan industri menengah dalam budidaya lidah buaya menjadikannya “ikon” Kota Pontianak^[46]. Data data yang tertera di bawah berasal dari website Dinas Pangan, Pertanian, dan Perikanan Pontianak serta SOP penanaman lidah buaya direktorat sayuran dan tanaman obat direktorat jenderal hortikultura kementerian pertanian 2019

Lahan Penanaman

Lahan penanaman lidah buaya yang ideal memenuhi persyaratan berikut: Ketinggian 0-10 m dpl; Curah hujan 2500-4000 mm/tahun; Suhu udara 24 - 36°C; pH tanah 3.5-5.5; Jenis tanah podsolik, organosol dengan drainase yang baik; Dataran rendah dengan penyinaran matahari yang baik; Tanah yang subur, gembur, dan mengandung materi organik.

Benih, Penanaman, dan Pemeliharaan

Benih yang digunakan memiliki tinggi 25-30 cm, dengan pelepah 3-4 helai. Benih ditanam dalam barisan 70-80 cm, dengan jarak 100-150 cm antar barisnya. Pemupukan pra-tanam dilakukan 3-4 hari sebelum penanaman, kemudian dilanjutkan saat tanaman berusia 1-2 bulan, dan pemupukan lanjutan dapat dilakukan 2-3 bulan sekali.

Pemanenan

Panen dapat dilakukan setelah tanaman berusia 8-12 bulan, atau setelah memiliki 15 pelepah. Pemanenan dapat dilakukan sampai tanaman berusia 2-3 tahun, setelahnya dilakukan peremajaan untuk memperpanjang usia tanaman.

Hasil Panen

No.	Tahun	Luas	Luas Panen	Produktivitas	Produksi	Keterangan
		Tanam (Ha)	(Ha)	(Kw/Ha)	(Ton)	
1.	2007	70	20	51	2.458	1 Tahun = 24 X Panen/Ha
2.	2008	67	45	51	5.530	Produktivitas 1 X Panen
3.	2009	44	43	51	5.284	
4.	2010	37	37	51	4.546	
5.	2011	46	46	51	5.652	
6.	2012	79	46	58	6.359	
7.	2013	84	84	40	7.879	

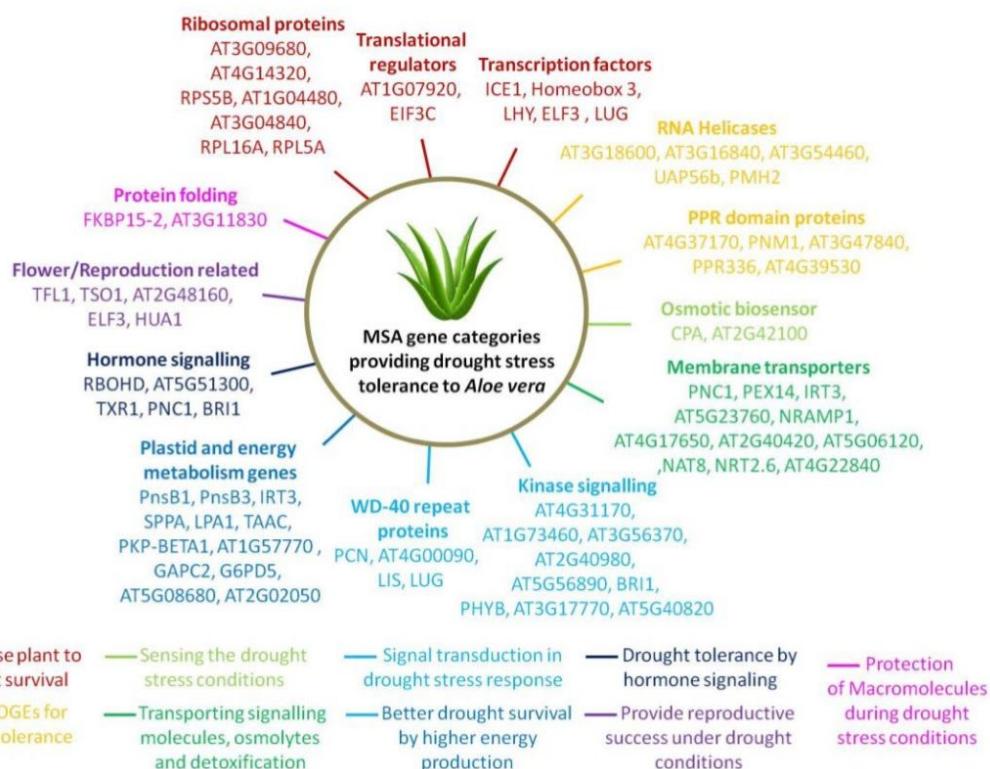
(Tabel 2.5.1 Data hasil panen lidah buaya Kota Pontianak,
<https://pertanian.pontianakkota.go.id/produk-unggulan-detil/4-lidah-buaya.html>)

2.10 Substansi Genetik Aloe vera

Aloe vera adalah tanaman sukulen dan tahan kekeringan yang termasuk dalam genus family Aloe Asphodelaceae^[81]. Lebih dari 400 spesies dikenal dalam genus Aloe, empat di antaranya memiliki obat properti dengan lidah buaya sebagai spesies yang paling kuat^[82]. Lidah buaya adalah tanaman tropis abadi dengan daun sukulen dan memanjang yang terdiri dari jaringan mucilaginous transparan sel parenkim di bagian tengah disebut gel Aloe vera^[83]. Tanaman ini banyak digunakan sebagai ramuan dalam praktik

tradisional di beberapa negara, dan dalam kosmetik dan produk perawatan kulit karena itu sifat farmakologis termasuk anti inflamasi, anti tumor, anti virus, anti bisul, fungisida, dll^[84,85]. Aloe vera juga mengandung bahan kimia seperti antrakuinon, vitamin, mineral, enzim, sterol, asam amino, asam salisilat, dan karbohidrat^[86,87]. Properti ini menjadikannya penting secara komersial, dengan pasar global senilai 1,6 miliar^[88].

Aloe vera (L.) (*Aloe barbadensis* Miller) adalah xerophyte sukulen abadi, yang mengembangkan jaringan penyimpanan air di daun untuk bertahan dalam kondisi lingkungan kering. Beberapa Gen yang dikenal luas untuk toleransi stres diisolasi dari genom *Aloe vera* dan terbukti juga mengekspresikan DREB1. HVA22 adalah gen yang dapat diinduksi stres yang diisolasi dari lapisan aleuron *Hordeum vulgare*. Homolog HVA22 telah ditemukan pada 354 spesies tumbuhan. Ekspresi HVA22 pada jaringan vegetatif dapat diinduksi oleh ABA dan tekanan lingkungan, seperti dingin dan kekeringan. Lidah buaya diketahui dapat bertahan hidup tanpa air dalam jangka waktu yang lama. Selain itu, gen penyebab stres dari *Aloe vera* ini dapat diisolasi. Planlet *Aloe vera* yang diberi ABA digunakan untuk mengisolasi cDNA pool. Homolog HVA22 diperoleh dengan menggunakan RT-PCR yang diverifikasi dengan sekvensing dan bioinformatika.



(Gambar.2.10.1 Gen MSA pada Aloe vera yang menyebabkan respon terhadap stress kekeringan^[89].)

Beberapa penelitian tentang Aloe vera transgenik dan beberapa pencapaian di bidang modifikasi genetik.

Tabel 1.

a)

Plants	Target	Transformation method	Product	References
Aloe vera	Apoplast	Biostatic/gene gun	Active human interferon alpha 2	https://doi.org/10.1007/s11248-012-9616-0
Aloe vera	Chloroplast	Biostatic/gene gun	Polisakarida (karbohidrat) pada AP-2 dan AP-3	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6515206/
Aloe vera	Chloroplast	Biostatic or infection with Agrobacterium t.	Some transgenic protein	https://patents.google.com/patent/US8008546B2/en Paten no : US8.008.546 B2
Aloe vera	Chloroplast	Agrobacterium t.	Introduced TaDREB gene isolated from wheat into Aloe by Agrobacterium.	Zhao et al. (2009)
Aloe vera	Chloroplast	Agrobacterium	Transformed with otsA gene mediated by Agrobacterium t.	Chen et al. (2007)
Aloe vera	Chloroplast	Biostatic	To improve the resistance to cold stress of Aloe plant by introduced otsA gene into its genome via microprojectile bombardment	Chen et al. (2005)

b)

Plants	Achievements in Genetic Engineering	References

Aloe vera	Assessment of genetic stability and instability of tissue culture propagated plantlets	Rathore et al. (2011)
Aloe vera	Assessments of genetic fidelity of micropropagated plants	Gantait et al. (2010)
Aloe vera	Assessments of genetic similarity of micropropagated plantlets with their mother plant	Gantait et al. (2011)

Tabel 1. a) Beberapa penelitian tentang Aloe vera transgenik. b). Beberapa pencapaian pada Aloe vera transgenik.

2.10.1 Sekuensing dari genome Aloe vera dan transcriptome

Perkiraan ukuran genom lidah buaya adalah 16,04 Gbp dengan level diploid pliodi yang mengandung 14 ($2n$) kromosom[2229], dan untuk menutupi ukuran genom yang besar ini, total 506,4 Gbp (~ 32X) data bacaan pendek dan 123,5 Gbp (~ 7,7X) data bacaan panjang dihasilkan menggunakan platform Illumina dan nanopore, masing-masing [90, 59]. Untuk transkriptom, total data RNA-seq 6,6 Gbp dan 7,3 Gbp dihasilkan masing-masing dari daun dan root. Data transkriptom dari penelitian ini dan RNA-seq yang tersedia untuk data umum dari penelitian sebelumnya [91] digabungkan bersama, menghasilkan total 37,1 Gbp RNA- seq data untuk Aloe vera, yang digunakan untuk analisis. Semua genomik dan data pembacaan RNA-seq dipangkas dan disaring menggunakan Trimmomatic, dan hanya data berkualitas tinggi yang digunakan untuk membangun kumpulan genom dan transkriptom akhir.

2.10.2 Genome Kloroplas *Aloe vera*

Banyak penelitian menunjukkan bahwa jumlah kromosom untuk sel somatik sebagian besar lidah buaya adalah $2n = 14$, dan set genom haploidnya terdiri dari tiga kromosom pendek dan empat yang panjang (Brandham dan Doherty, 1998; Ji et al., 2002; Alam dan Khanam, 2005). Banyak penelitian menunjukkan

bahwa sebagian besar tumbuhan memiliki telomer tipe *Arabidopsis* terdiri dari banyak salinan berulang dari urutan 5'-TTTAGGG-3' (Adams et al., 2000a), namun, jenis telomer ini tidak ditemukan di *Aloe*, mirip dengan *Allium*,

Nothoscordum dan Tulbaghia. Aloe kekurangan tipe telomerik berulang Arabidopsis, tetapi memiliki telomer seperti vertebrata urutan (T2AG3) dan menurut laporan oleh Weiss dan Scherthan (2002). Tetraploid dan hexaploid Aloe bisa diinduksi dari diploid Aloe (Ren et al., 2007). Dalam laporan oleh Wang et al. (2001), laju induksi tertinggi meningkat hingga 50% setelah pemaparan dengan 0,06% kolkisin selama 12 jam.

Genom kloroplas memiliki struktur quadripartite tipikal yang berisi daerah salinan tunggal (LSC) besar 83.505bp, wilayah salinan tunggal kecil (SSC) 16.178bp dan sepasang daerah berulang terbalik (IR) dari 26.596 bp. Komposisi nukleotida genom kloroplas secara keseluruhan adalah: 47,185bp A (30,8%), 48,123bp T (31,5%), 29,326bp C (19,2%), 28,241bp G (18,5%) dan kandungan G þ C total 37,7%. Kemudian, 131 gen ditemukan yang mencakup 85 gen penyandi protein (PCG), 38 RNA transfer (tRNA) dan 8 RNA ribosom (rRNA). Analisis filogenetik menunjukkan bahwa *A. vera* berkerabat dekat dengan *A. maculata* dalam hubungan filogenetik famili Asphodelaceae dengan metode Maximum-Likelihood (ML)^[92].

2.10.3 *Aloe vera* Menjadi Kandidat yang Cocok untuk Penelitian Ini

Aloe menawarkan sistem produksi protein yang menarik yang memiliki keuntungan menghasilkan protein yang aktif secara biologis serta terkait dengan kosmetik. Protein dapat disekresikan ke dalam pulp yang mudah diakses sehingga meningkatkan efisiensi isolasi dan menawarkan potensi untuk aplikasi topikal langsung dari ekstrak pulp yang diproses secara minimal. Komponen asli dari pulp membuat lidah buaya menjadi sarana pengiriman yang sangat baik yang sangat cocok untuk aplikasi topikal dan penyerapan melalui kulit.

Sistem transformasi yang kami gambarkan juga dapat digunakan untuk mengekspresikan protein nabati untuk meningkatkan atau mengembangkan sifat lidah buaya tertentu. *Aloe vera* adalah tanaman yang kuat dan mudah tumbuh yang dapat diproses hingga empat kali setahun, memasok 3-4 daun dengan berat masing-masing 1 kg (total 12-16 daun per tanaman per tahun). Ini setara dengan kira-kira 6–8 kg pulp per tahun, yang menunjukkan bahwa potensi produksi lidah buaya tinggi.

Aksesibilitas protein yang disekresikan dan biomassa yang melekat membuat Aloe vera menjadi platform produksi yang menarik untuk molecular pharming. Lebih jauh lagi, lidah buaya bukanlah tanaman pangan tradisional dan tidak seperti beberapa model tanaman lain yang digunakan untuk modifikasi genetik, tidak ada risiko genetik yang melekat dari penyerbukan silang ke tanaman pangan terkait

Hal ini menjadi salah satu keuntungan menggunakan Aloe vera. Daun tanaman aloe transgenik dapat memudahkan ekstraksi karbohidrat, protein, dan air yang terkandung di dalam gel yang terutama berasal dari empulur yang pada umumnya terletak di bagian tengah Aloe vera. Berbagai senyawa dalam gel telah terbukti mengobati berbagai penyakit. Selain itu, gel/empulur membantu menstabilkan protein transgenik yang diproduksi oleh Aloe vera transgenik dan dilokalisasi dalam gel dan / atau empulur^[150].

2.11 Enzim Restriksi dan Ligase

Enzim restriksi dan ligase merupakan dua komponen penting dalam transformasi tanaman. Alasan dari hal tersebut telah dijelaskan pada bab 2.7 Transfer DNA Binary System. Namun untuk mengulas, enzim restriksi dan ligasi bertugas untuk memotong dan menyambungkan kembali fragmen fragmen DNA. Hal ini memungkinkan sebagian atau keseluruhan DNA untuk diganti dengan DNA lainnya, dengan syarat keduanya memiliki situs restriksi yang sama.

2.11.1 Enzim Restriksi

Enzim restriksi, disebut juga sebagai restriksi endonuklease atau restriktase, merupakan enzim yang bertugas memotong DNA menjadi fragmen pada situs pengenalan spesifik yang disebut sebagai situs restriksi^[165-167]. Enzim restriksi merupakan salah satu kelas dari grup enzim lebih besar yang disebut sebagai enzim endonuklease. Enzim restriksi terbagi empat tipe berdasarkan struktur dan lokasi pemotongan. Untuk memotong DNA, enzim restriksi melakukan dua kali pemotongan, sekali pada setiap *sugar-phosphate backbone* DNA untai ganda.

Situs Restriksi

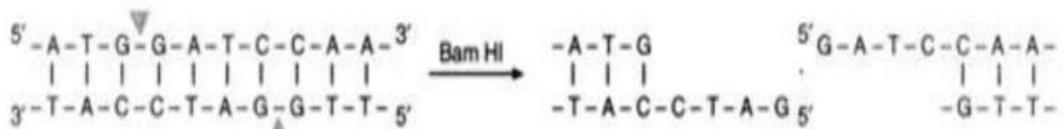
Enzim restriksi mengenali sequence nukleotida spesifik^[166] dan menghasilkan potongan untai ganda pada DNA. Sequence pengenalan dapat diklasifikasi berdasarkan jumlah basa pada situs restriksi, biasanya antara 4 sampai 8 basa.

Selain itu, jumlah basa pada situs restriksi juga ikut menentukan seberapa besar kemungkinan situs restriksi yang sama akan muncul kembali. Sebagai contoh, sequence sebesar 4 bp secara teori akan muncul setiap 4^4 bp yaitu 256 bp, sedangkan sequence sebesar 6 bp akan muncul setiap 4^6 bp yaitu 4.096 bp, dan sequence sebesar 8 bp akan muncul setiap 48 bp yaitu 65.536 bp.

Banyak sequence pengenalan enzim restriksi merupakan palindrom, yaitu sequence basa yang dapat dibaca sama dari depan maupun belakang^[175]. Secara teori, terdapat dua tipe palindrom yang dapat muncul pada DNA. Tipe pertama adalah mirror-like palindrome, yaitu sequence yang dibaca sama dari depan maupun belakang dan berada pada satu strand tunggal. Sedangkan yang kedua adalah inverted repeat palindrome, yaitu segmen yang dibaca sama dari depan maupun belakang namun berada pada strand komplementer DNA untai ganda. Sebagai contoh, GTATAC merupakan sequence komplemen dari CATATG^[176]. Di antara keduanya, inverted repeat palindrome lebih umum dan memiliki efek biologis yang lebih besar,

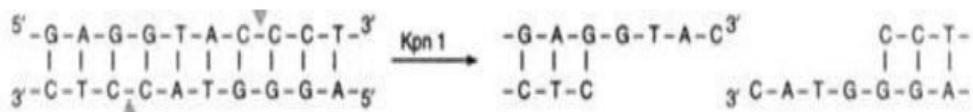
Berdasarkan situs restriktsinya, terdapat 3 macam hasil pemotongan DNA, yaitu:

1. 5' sticky-end overhangs



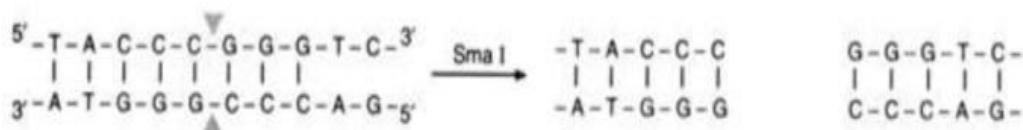
(Gambar 2.11.1 5' overhangs sebagai hasil dari enzim restriksi Bam HI)

2. 3' sticky-end overhangs



(Gambar 2.11.2 3' overhangs sebagai hasil dari enzim restriksi Kpn 1)

3. blunt-ends



(Gambar 2.11.3 Blunt-ends sebagai hasil dari enzim restriksi SMA 1)

Tipe

Terdapat 4 tipe enzim restriksi yang dapat ditemukan secara alami. Keempat tipe tersebut dibedakan oleh lokasi pemotongannya. Pada penelitian ini kami menggunakan enzim restriksi tipe 4.

Tipe IV

Enzim tipe IV mengenali DNA yang dimodifikasi, biasanya termetilasi dan dicontohkan oleh sistem McrBC dan Mrr dari E. coli.

Enzyme	Source	Recognition Sequence	Cut
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	5'TCGA 3'AGCT	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'GANTC 3'CTNAG	5'---G ANTCA---3' 3'---CTNA G---5'
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	5'GATC 3'CTAG	5'--- GATC---3' 3'---CTAG ---3'
<i>PovII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	5'CAGCTG 3'GTCGAC	5'---CAG CTG---3' 3'---GTC GAC---5'
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus eggytius</i>	5'GGCC 3'CCGG	5'---GG CC---3' 3'---CC GG---5'
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'GATATC 3'CTATAG	5'---GAT ATC---3' 3'---CTA TAG---5'
<i>Sall</i>	<i>Streptomyces albus</i>	5'GTCGAC 3'CAGCTG	5'---G TCGAC---3' 3'---CAGCT G---5'
<i>Scal</i>	<i>Streptomyces caespitosus</i>	5'AGTACT 3'TCATGA	5'---AGT ACT---3' 3'---TCA TGA---5'

(Gambar 2.11.4 Contoh enzim restriksi dan sumbernya^[10].)

2.11.2 Enzim Ligase

Enzim ligase, atau DNA ligase, merupakan enzim yang memfasilitasi penggabungan strand DNA dengan mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester. DNA ligase berperan dalam perbaikan *single-strand break* pada DNA, namun ada beberapa tipe enzim ligase yang dapat memperbaiki *double-strand break* (kerusakan pada kedua strand komplementer DNA). DNA ligase memperbaiki *single-strand break* menggunakan strand komplementer double helix sebagai template^[186]. DNA ligase juga berperan dalam replikasi DNA dan pembentukan DNA rekombinan.

Mekanisme Enzimatik

Mekanisme DNA ligase adalah membentuk dua ikatan fosfodiester kovalen antara ujung 3' hidroksil satu nukleotida (acceptor) dan ujung 5' fosfat nukleotida lainnya (donor). Dua molekul ATP digunakan tiap pembentukan ikatan fosfodiester, dan AMP dibutuhkan untuk reaksi ligase, yang dapat dibagi menjadi 4 tahap^[187], yaitu:

1. Reorganisasi situs aktivitas seperti fragmen Okazaki pada DNA;
2. Adenilasi (penambahan AMP) residu lisin pada pusat aktif enzim, dan melepaskan pirofosfat;
3. Transfer AMP menuju 5' fosfat dan membentuk ikatan pirofosfat;
4. Pembentukan ikatan fosfodiester antara 3' hidroksil dan 5' fosfat.

Tipe

E. coli

DNA ligase *E. coli* dikode oleh gen *lig*, dan menggunakan energi yang didapat dari pemotongan nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) untuk membentuk ikatan fosfodiester, sama seperti kebanyakan DNA ligase pada prokariota lainnya^[188]. Ia tidak dapat meligasi *blunt-ends* DNA kecuali dalam kondisi *molecular crowding* dengan polietilen glikol, dan ia juga tidak dapat menggabungkan RNA ke DNA dengan efisien.

Aktivitas DNA ligase *E. coli* dapat ditingkatkan oleh DNA polimerase pada konsentrasi yang tepat. Peningkatan hanya terjadi saat konsentrasi DNA polimerase 1 lebih rendah daripada fragmen DNA yang akan diligasi. Saat

konsentrasi DNA polimerase lebih tinggi, ia akan memiliki efek negatif pada DNA ligase *E. coli*^[189].

T4

DNA ligase dari bakteriofag T4, dan merupakan DNA ligase yang paling sering digunakan dalam laboratorium^[190]. Ia dapat meligase sticky-ends maupun *blunt-ends* DNA, oligonukleotida, RNA, dan hibrid RNA-DNA, namun ia tidak meligase asam nukleat rantai tunggal. Tidak seperti *E. coli*, T4 DNA ligase tidak dapat menggunakan NAD dan memiliki kebutuhan absolut terhadap ATP sebagai kofaktor.

Beberapa cara telah dilakukan untuk meningkatkan aktivitas *in vitro* T4 DNA ligase, salah satunya adalah menguji fusi T4 DNA ligase dengan *DNA binding protein* lain. Hasil eksperimen ini menunjukkan bahwa konstruksi fusi dari T4 DNA ligase dengan p50 atau NF- κ B lebih efektif 160% pada ligasi *blunt-ends* dibandingkan dengan T4 DNA ligase liar^[185]. Reaksi tipikal untuk memasukkan fragmen ke dalam vektor plasmid menggunakan 0.01 unit sticky-ends dan 1 unit *blunt-ends*. Suhu inkubasi maksimal untuk T4 DNA ligase adalah 16 °C.

T4 DNA ligase mutan memiliki sensitivitas terhadap iradiasi UV^[183,184] dan methyl methanesulfonate yang lebih tinggi daripada tipe liar^[182]. Hal ini menunjukkan bahwa DNA ligase berperan dalam perbaikan kerusakan DNA akibat hal hal tadi.

2.12 RT PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) adalah teknik laboratorium yang menggabungkan reverse transcription RNA menjadi DNA (dalam konteks ini disebut complementary DNA atau cDNA) dan amplifikasi target DNA tertentu menggunakan polymerase chain reaction (PCR). [145] Ini terutama digunakan untuk mengukur jumlah RNA tertentu. Ini dicapai dengan memantau reaksi amplifikasi menggunakan fluoresensi, teknik yang disebut PCR waktu nyata atau PCR kuantitatif (qPCR).

4.8 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

In RT-PCR, The RNA population is converted to cDNA by reverse transcription (RT), and then the cDNA is amplified by the polymerase chain reaction .The cDNA amplification step provides opportunities to further study the original RNA species, even when they are limited in amount or expressed in low abundance. Common applications of RT-PCR include detection of expressed genes, examination of transcript variants, and generation of cDNA templates for cloning and sequencing.

1. a. RNA

RNA consist of Start codon AUG and ends with poly A tail

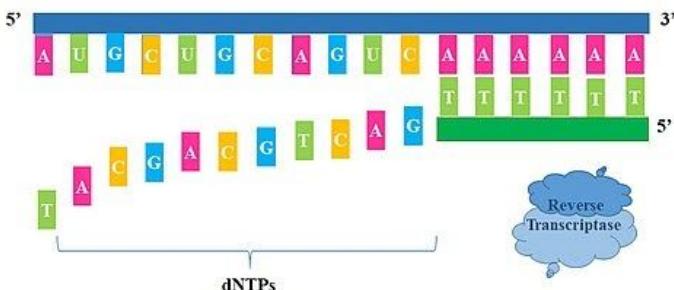


b. Oligo dT Primer

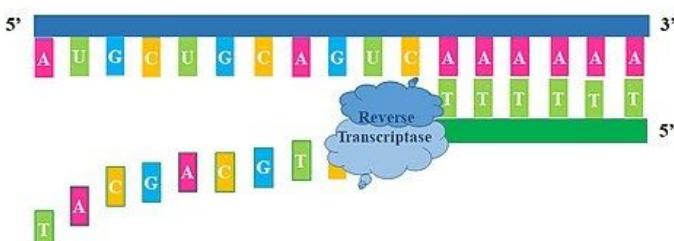
Oligo dT Primer is binding to RNA poly A tail



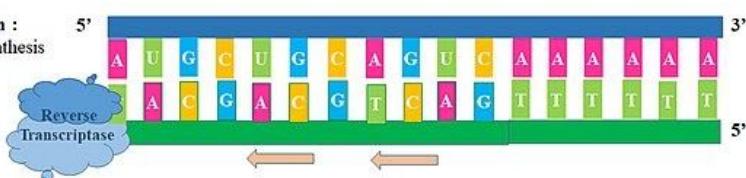
c. Reverse Transcriptase and dNTPs



d. Reverse Transcriptase is an enzymes binds to oligo dT primer and synthesises the cDNA by adding dNTPs



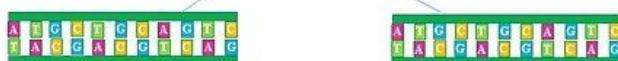
e. RNA hybrid formation :
First - strand cDNA synthesis



f. complimentary DNA



2. a. Amplification of cDNA with Specific Primers and Taq Polymerase



(Gambar 2.12.1 RT-PCR) (sumber : Lokesh Thimmana, under the guidance of Dr. G. Mallikarjuna, Assistant Professor, Molecular Biology, Agri Biotech Foundation.)

Prinsip kerja:

Dalam RT-PCR, template RNA pertama-tama diubah menjadi DNA pelengkap (cDNA) menggunakan reverse transcriptase. cDNA kemudian digunakan sebagai template untuk amplifikasi eksponensial menggunakan PCR. QT-NASBA saat ini merupakan metode paling sensitif untuk mendeteksi RNA yang tersedia. [146] Penggunaan RT-PCR untuk mendeteksi transkrip RNA telah merevolusi studi ekspresi gen dengan cara-cara penting berikut:

1. Secara teoritis memungkinkan untuk mendeteksi transkrip dari hampir semua gen^[417];
2. Mengaktifkan amplifikasi sampel dan menghilangkan kebutuhan akan bahan awal yang melimpah yang diperlukan saat menggunakan analisis *northern blot*^[18,19];
3. Memberikan toleransi untuk degradasi RNA selama RNA yang mencakup primer masih utuh^[148].

Aplikasi:

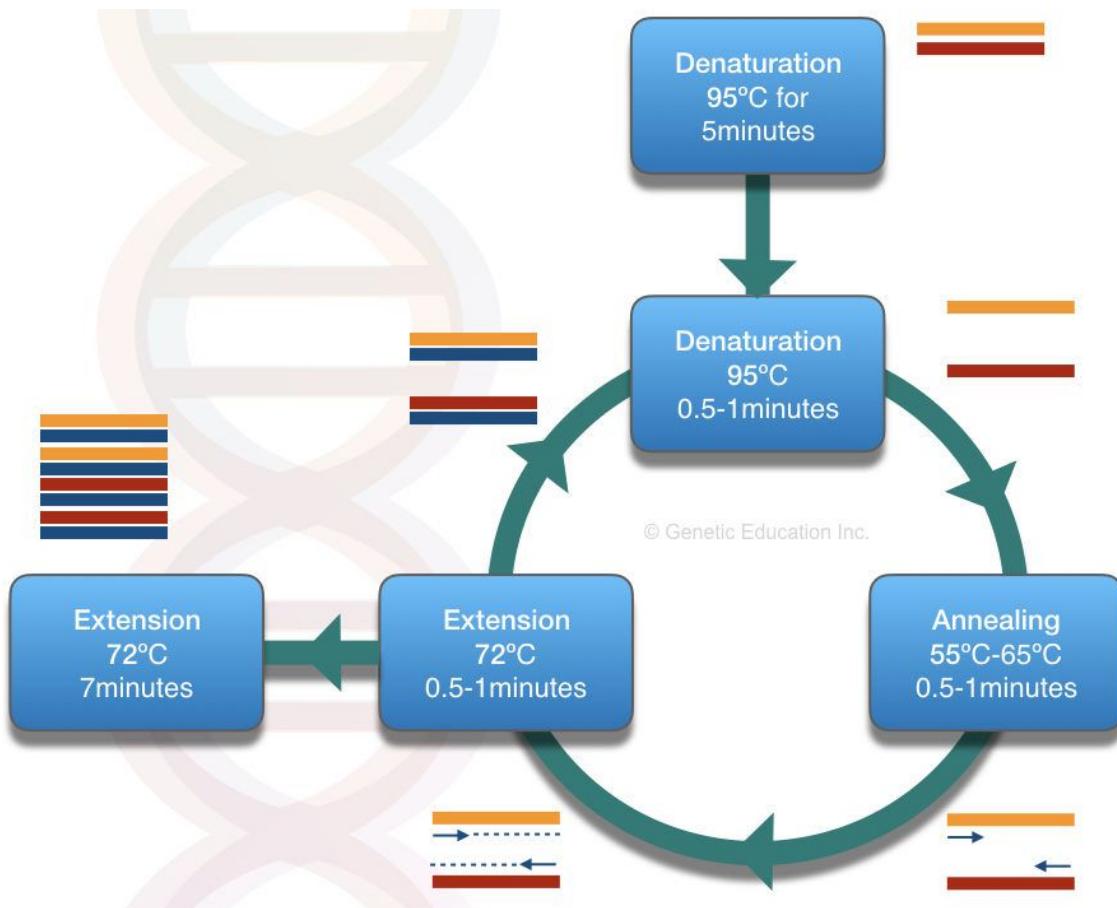
Amplifikasi eksponensial melalui reverse transcription polymerase chain reaction menyediakan teknik yang sangat sensitif di mana jumlah salinan molekul RNA yang sangat rendah dapat dideteksi. RT-PCR banyak digunakan dalam diagnosis penyakit genetik dan, secara semi kuantitatif, dalam penentuan kelimpahan molekul RNA spesifik yang berbeda di dalam sel atau jaringan sebagai ukuran ekspresi gen.

2.13 PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik amplifikasi asam nukleat secara in vitro (Guyer dan Koshland, 1989). PCR memungkinkan peneliti untuk mengamplifikasi urutan DNA tertentu secara eksponensial menjadi ribuan bahkan jutaan salinan. Teknik PCR ditemukan oleh peneliti Amerika, Kary Mullis pada 1984.

Mayoritas metode PCR bergantung pada thermal cycling. Thermal cycling mengekspos reaktan pada siklus pemanasan dan pendinginan berulang. Hal ini memungkinkan terjadinya reaksi yang bergantung pada suhu. PCR terdiri atas 2

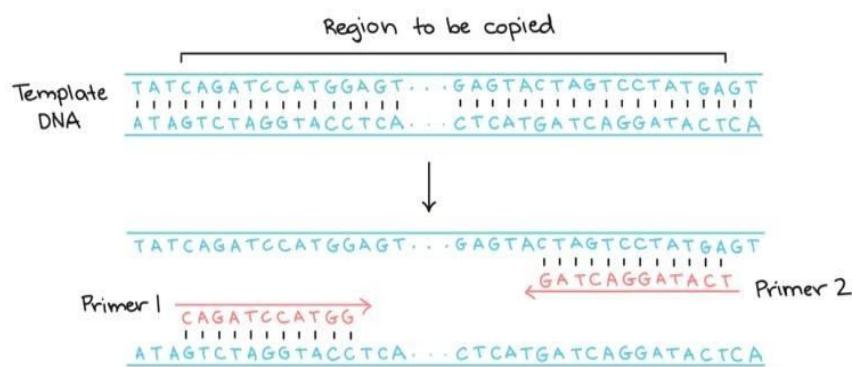
komponen utama, primer (fragmen DNA pendek bernama oligonukleotida dan komplementer terhadap situs DNA target), dan DNA Polymerase.



(Gambar 2.13.1 Polymerase Chain Reaction)

2.13.1 Primer

Primer adalah sequence pendek yang komplementer dengan sequence yang akan di amplifikasi. Dalam PCR, digunakan dua jenis primer, forward dan reverse primer.



(Gambar 2.13.2 Forward dan reverse primer)

Pada umumnya, primer PCR adalah DNA. DNA memiliki beberapa keuntungan signifikan dibandingkan RNA untuk PCR. Beberapa keuntungan tersebut adalah:

1. DN lebih stabil dibandingkan RNA, dan tidak terdegradasi dalam suhu tinggi.
2. Proses polimerasi DNA searah pada PCR, sehingga tidak ada kemungkinan hilangnya primer RNA pendek setelah polimerisasi selesai.
3. DNA polimerase 1 membantu menghilangkan RNA primer pendek pada replikasi *in vivo* yang tidak terdapat di PCR.

Setiap enzim membutuhkan kofaktor dan substrat untuk melakukan reaksi, oleh karena itu, Taq DNA polymerase membutuhkan ujung 3'OH bebas untuk memulai polimerisasi. Primer menyediakan ujung 3'OH bebas untuk polimerase dan berfungsi sebagai substrat untuk enzim agar bekerja^[38].

Melting Temperature

Suhu dimana setengah template primer terpecah, dipengaruhi oleh kandungan GC dan AT DNA. Alasannya karena primer menempel pada bagian DNA yang memiliki melting temperature yang sama^[38].

Formula untuk menghitung melting temperature adalah sebagai berikut:

$$\mathbf{Tm= 4 (G + C) + 2 (A + T)}$$

Annealing Temperature

Suhu yang memungkinkan primer terikat dengan DNA template komplemennya. Sekitar 5°C lebih rendah dari melting temperature, dan berkisar antara 56°C to 65°C. Suhu di luar kisaran tersebut dapat menghambat amplifikasi.

Apabila suhu terlalu rendah, primer dapat menempel dimana saja, sehingga menghasilkan penempelan yang tidak spesifik. Sebaliknya, apabila suhu terlalu tinggi, maka primer tidak dapat menempel dengan DNA template^[38].

Panjang Primer

Primer dengan panjang antara 18-23 bp biasanya memberikan hasil terbaik dalam PCR. Primer yang lebih pendek dari 18 bp dapat menghasilkan penempelan tidak spesifik. Hal ini terjadi karena semakin pendek suatu primer, maka annealing temperature nya akan semakin kecil.

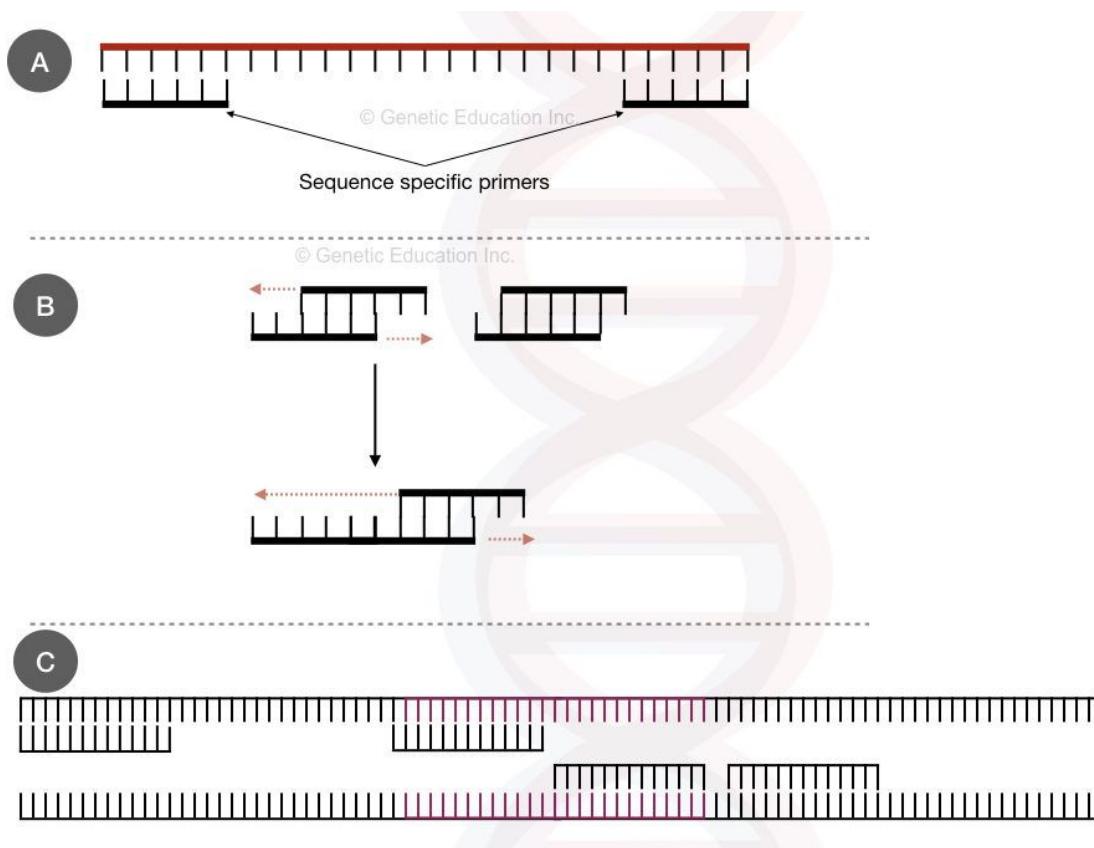
Apabila primer terlalu panjang, annealing temperature akan semakin tinggi, dan dapat mengurangi efisiensi amplifikasi^[38].

Kandungan GC Primer

Kandungan GC disarankan berkisar antara 40%-60%. Daerah kaya GC tidak spesifik, dengan kata lain, kemungkinan terjadinya amplifikasi tidak spesifik di daerah kaya GC lebih tinggi daripada daerah kaya AT^[38].

Komplementasi Forward dan Reverse Primer

Forward dan reverse primer tidak boleh sesuai atau komplementer terhadap satu sama lain. Apabila sesuai, maka kedua primer tersebut akan terikat dan membentuk primer dimer. Primer dimer dapat teramplifikasi dengan mudah dalam PCR karena terbentuk oleh sequence pendek^[38].



(Gambar 2.13.3; **a** Penempelan primer spesifik; **b** Pembentukan primer dimer; **c** Penempelan tidak spesifik)

2.13.2 Langkah Langkah PCR

PCR terdiri dari 3 langkah, yaitu:

1. Denaturasi

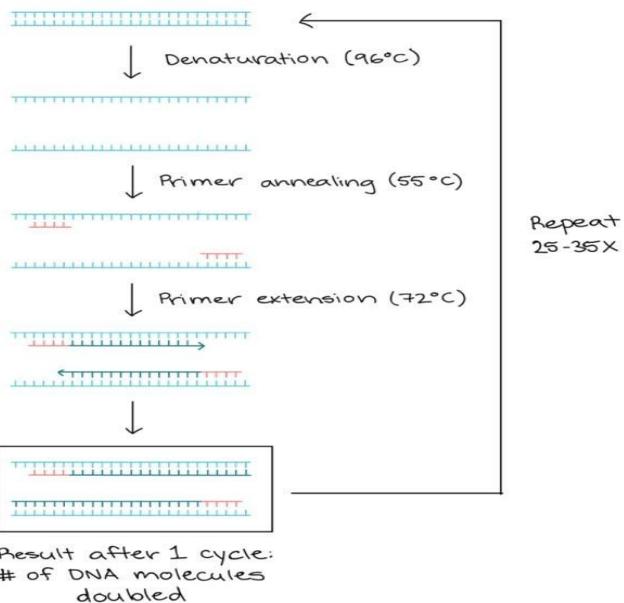
DNA dipanaskan sekitar suhu 95°C, dengan tujuan memecah DNA menjadi dua single-strand molekul DNA dengan memecah ikatan hidrogennya.

2. Annealing

Suhu diturunkan menjadi antara 50°C - 60°C, ini memungkinkan annealing primer dengan ujung 3' dari DNA.

3. Elongasi

Suhu dinaikkan kembali hingga mencapai antara 70°C-80°C, agar enzim DNA polimerase dapat bekerja. DNA polimerase membentuk strand DNA baru yang komplementer terhadap strand DNA template dari arah 5' ke 3' .



(Gambar 2.13.4 Tahapan PCR)

2.13.3 Primer3

Primer3 adalah software online yang digunakan untuk membentuk primer secara otomatis berdasarkan DNA template. Primer 3 dapat diakses di situs <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> .

Cara Penggunaan Primer3

Pertama tama, buka primer3, setelah itu masukkan sequence DNA template.

The screenshot shows the Primer3web version 4.1.0 interface. At the top, there's a navigation bar with links for 'disclaimer', 'code', and 'cautions'. Below it, a dropdown menu 'Select the Task for primer selection' is set to 'generic'. A section for 'Template masking before primer design' includes fields for 'Select species' (Mus musculus), 'Nucleotides to mask in 5' direction' (1), and 'Primer failure rate cutoff' (< 0.1). A note about FASTA format and undesirable sequences follows. The main sequence input area contains a long DNA sequence: GTGACCCCTCCCTAACCTGGGTCAGGCCCGCTGGAGATGGGTGGAGATGGCTGGCAGCTTAGGGCTGGCGGGC... with a red arrow pointing to the start of the sequence. Below the sequence are three checkboxes: 'Pick left primer, or use left primer below' (checked), 'Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below' (unchecked), and 'Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)' (checked). At the bottom of the form are buttons for 'Pick Primers', 'Download Settings', and 'Reset Form'.

(Gambar 2.13.5 Primer3)

Lalu, pilih opsi untuk forward dan reverse primer, seperti yang ditunjuk oleh tanda panah pada gambar. Selanjutnya, tekan tombol Pick Primers yang ditunjukkan oleh kotak biru pada gambar.

Primer3 Output

PRIMER PICKING RESULTS FOR

Template masking not selected
 No mispriming library specified
 Using 1-based sequence positions

OLIGO	start	len	tm	gc%	any_th	3'_th	hairpin seq
LEFT PRIMER	368	20	58.81	55.00	0.00	0.00	0.00 GGGGAACGAGGCTTCTTCTA
RIGHT PRIMER	617	20	59.09	55.00	5.85	5.85	0.00 CTGAGATTCTGACTGGGCCA

SEQUENCE SIZE: 1431
 INCLUDED REGION SIZE: 1431

PRODUCT SIZE: 250, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

1 AGCCCTCCAGGACAGGCTGCATCAGAACAGGCCATCAAGCAGGTCTGTTCCAAGGGCCTT

61 TCGTCAGGTGGCTCAGGATTCAGGGTGCTGGACCCCAGGCCAGCTCTGCAGCAG

121 GGAGGACGTGGCTGGCTCGTAAGCATGTGGGGTGAGCCAGGGCCCCAAGGCAGGG

181 CACCTGGCCTTCAGCCTGCCTCAGCCCTGCCTCTCCAGATCACTGTCCTTCTGCCAT

241 GCCCTGTGGATGCGCTCTGCCCTGCTGGCGCTGCTGCCCTCTGGGACCTGACCC

301 AGCCGAGCCTTGTGAACCAACACCTGTGCGGTCACACCTGGTGAAGCTCTACCT

361 AGTGTGGGGAAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAAGACCCGCCGGAGGCAGAGGACCT
 >>>>>>>>>>

421 GCAGGGTGAGCAAATGCCATTGCTGCCCTGGCCGCCAGCCACCCCTGCTCCTG

481 GCGCTCCCACCCAGCATGGCAGAACGGGGCAGGAGGCTGCCACCCAGCAGGGGTCAAGG

541 TGCACTTTTAAAAAGAAGTTCTTGGTCAGTCCTAAAGTGACCAAGCTCCCTGTGG
 <<<

601 CCCAGTCAGAACATCTCAGCCTGAGGACGGTGGCTTCGGCAGCCCCGAGATAACATCAGA
 <<<<<<<<<<<<

(Gambar 2.13.6 Hasil primer3)

Hasil primer3 akan nampak seperti gambar diatas. Perhatikan bagian atas, disana tertera spesifikasi forward(left) dan reverse(right) primer. Sekarang perhatikan tulisan bergaris bawah merah, primer ini menghasilkan yield sebesar 250 bp, sehingga saat melakukan PCR berdasarkan kriteria primer ini, hasilnya seharusnya berukuran 250 bp.

Tanda panah (>>>>>>>>>) dan <<<<<<<<) menunjukkan lokasi annealing primer saat PCR. Software ini juga memberikan kemungkinan primer lain di bagian bawah(lihat gambar dibawah).

```

1201 ACGTCCTGGCAGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGGGGGGCCCTGGTCAGGCAGCCTGCAGC

1261 CCTTGGCCCTGGAGGGGTCCTGCAGAACGCTGGCATTGTGAAACAATGCTGTACCAAGCA

1321 TCTGCTCCCTACCACTGGAGAACTACTGCAACTAGACGCAGCCCCAGGCAGCCCCA

1381 CACCCGCCGCCTCTGCACCGAGAGAGATGGAATAAGCCCTGAACCAGC

KEYS (in order of precedence):
>>>> left primer
<<<< right primer

ADDITIONAL OLIGOS
      start _len _____ tm _____ gc% ____ any_th ____ 3'_th hairpin seq
1 LEFT PRIMER      904  20   58.86   55.00    0.00    0.00    0.00 TCAGGAGATGGGAAGATGC
RIGHT PRIMER     1070  20   58.80   60.00    0.00    0.00    0.00 CAGGTTAGAGGGAGGGTCAC
PRODUCT SIZE: 167, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

2 LEFT PRIMER      683  20   58.75   50.00    0.00    0.00    0.00 ACTCGCCCTCAAACAAATG
RIGHT PRIMER     923  20   58.86   55.00    0.00    0.00    0.00 GCATCTCCCCATCTCTGA
PRODUCT SIZE: 241, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

3 LEFT PRIMER     1141  20   58.96   55.00    0.00    0.00    0.00 TGACTGTGTCCTCTGTGTC
RIGHT PRIMER     1353  20   59.39   55.00   27.87  27.87    0.00 TGCAGTAGTTCTCCAGCTGG
PRODUCT SIZE: 213, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

4 LEFT PRIMER      22   20   59.01   50.00    5.01    0.00    0.00 TCAGAAGAGGCCATCAAGCA
RIGHT PRIMER     239  20   58.35   50.00    0.00    0.00    0.00 TGGCAGAAGGACAGTGATCT
PRODUCT SIZE: 218, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

Statistics
      con   too   in   in   not      no   tm   tm   high   high   high
      sid   many   tar   excl   ok   bad   GC   too   too   any_th 3'_th hair- poly   end
      ered   Ns   get   reg   reg   GC% clamp   low   high   compl   compl   pin   X   stab   ok
Left    7787    0    0    0    0  2791    0   637   2756    0    0   17   58    0  1528
Right   7790    0    0    0    0  2982    0   719   2574    0    0   19   56    0  1440
Pair Stats:
considered 1585, unacceptable product size 1578, primer in pair overlaps a primer in a better pair 156, ok 7
libprimer3 release 2.4.0

(primer3_results.cgi release 4.1.0)

```

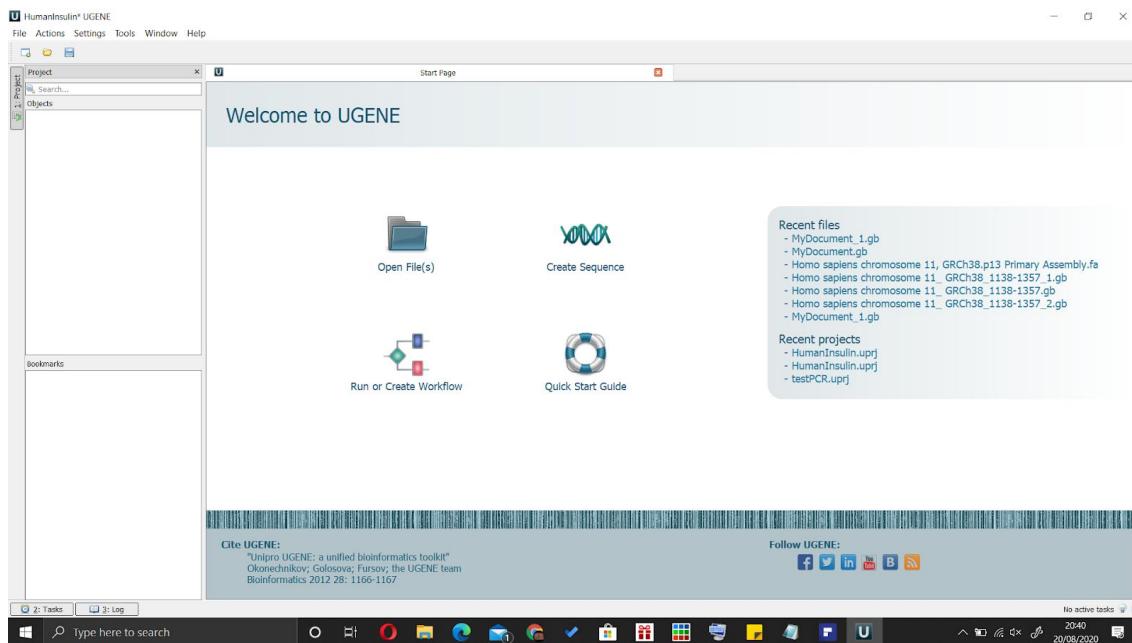
(Gambar 2.13.7 Kemungkinan primer lain)

2.13.4 UGENE In-Silico PCR

Untuk simulasi PCR, kami akan menggunakan software Unipro UGENE. Dokumentasi software ini dapat dibuka di <http://ugene.net/documentation.html>. Unipro UGENE terdiri dari 2 modul utama, modul dasar, dan modul data processing. Modul dasar digunakan untuk melakukan simulasi, sedangkan modul data processing digunakan untuk pengolahan data yang lebih kompleks. Kedua modul dapat diinstal secara terpisah (tidak harus sekaligus).

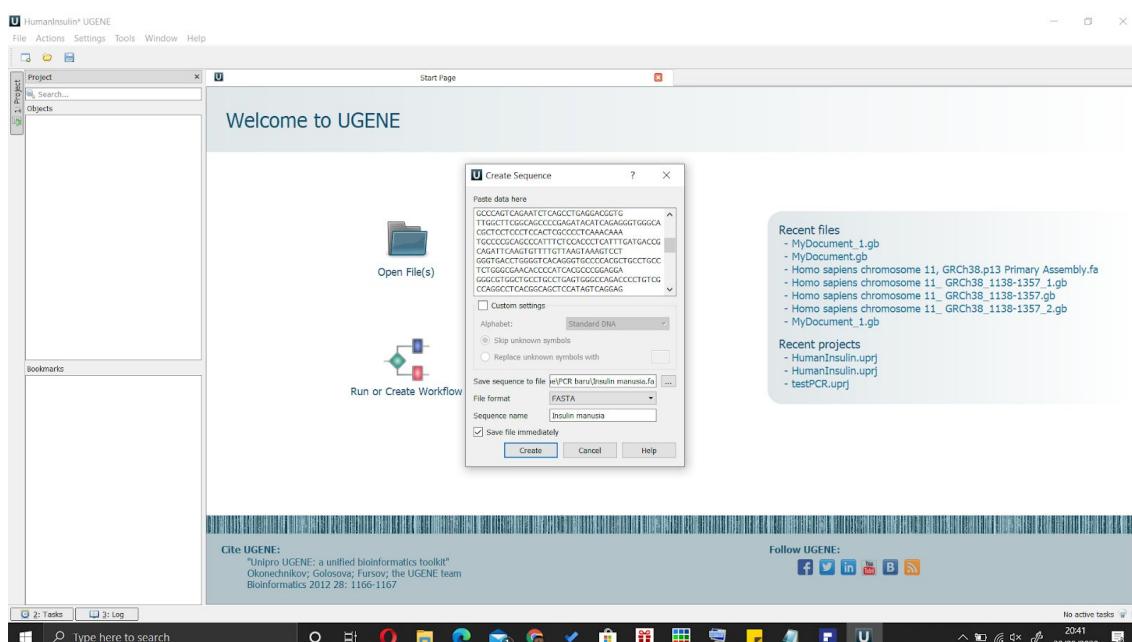
Unipro UGENE dapat diunduh dari situs <http://ugene.net/download.html>. Saat penginstalan, akan diberikan pilihan pilihan mengenai modul yang akan dipasang. Sampai dengan saat ini, kami hanya menggunakan modul dasar, namun, apabila diperlukan, maka kami akan memasang modul data processing juga.

Langkah-langkah PCR In-Silico



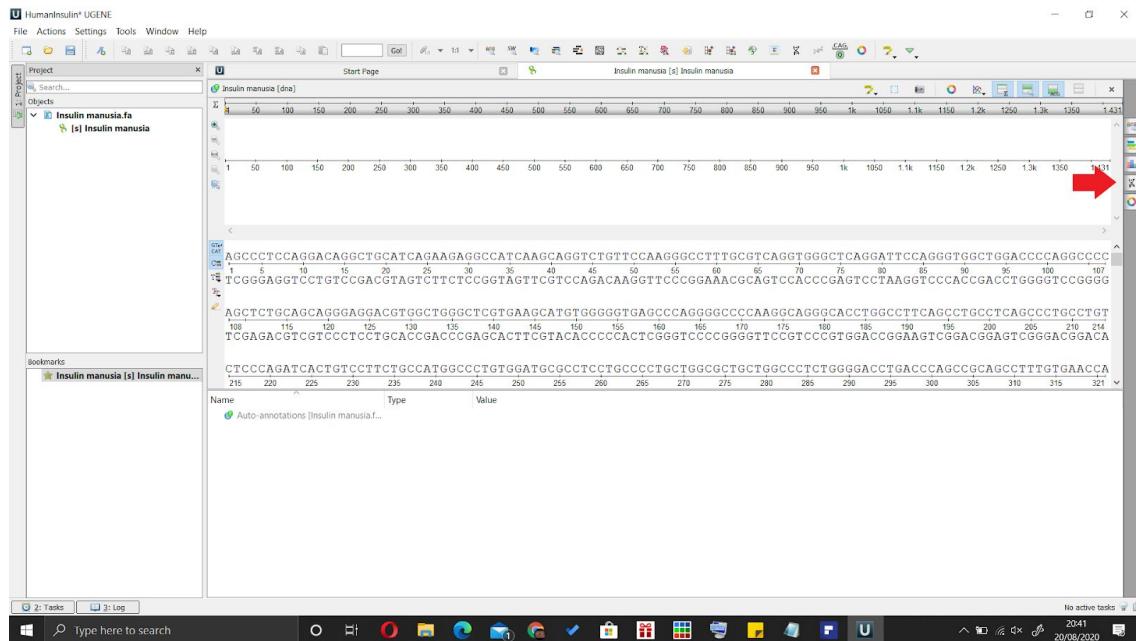
(Gambar 2.13.8 Tampilan UGENE saat dibuka)

Setelah membuka software UGENE, yang pertama dilakukan adalah membuat sequence baru dengan menekan create sequence.



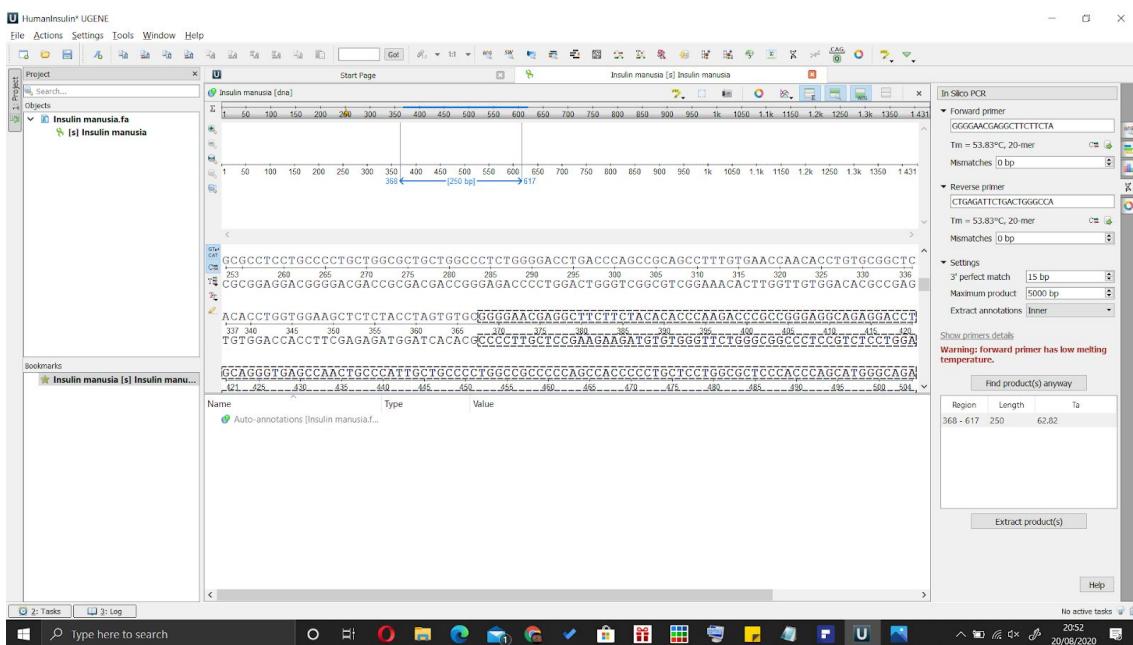
(Gambar 2.13.9 Membuat sequence baru)

File sequence akan terbuka secara otomatis. Selanjutnya buka tab PCR di bagian bertanda panah pada gambar dibawah.

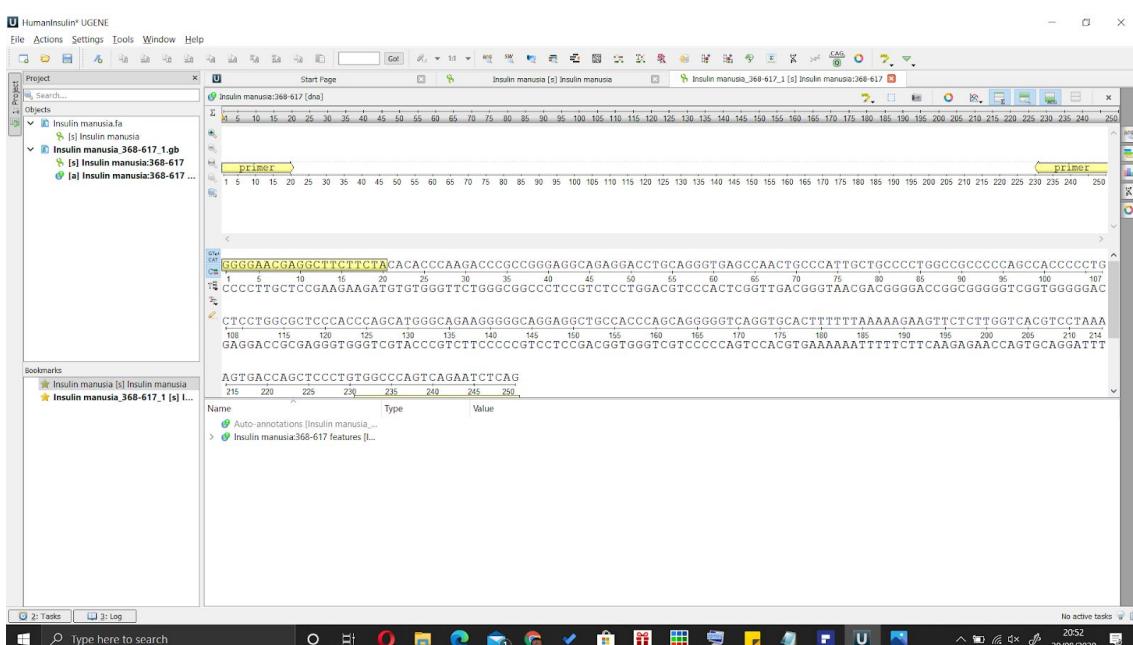


(Gambar 2.13.10 Tampilan file sequence)

Setelahnya, masukkan forward dan reverse primer. Perlu diperhatikan, reverse primer yang dimasukkan ada primer komplemen dari hasil Primer3 dan dituliskan dari arah sebaliknya. Sebagai contoh, Primer3 memberikan reverse primer TGGCCCAGTCAGAATCTCAG, dan reverse primer yang kita pakai untuk PCR adalah komplemen nya, dibaca dari 5' ke 3' yaitu CTGAGATTCTGACTGGGCCA. Setelah primer dimasukkan, tekan find product. Selanjutnya, tekan extract product untuk mendapatkan produknya di file terpisah.



(Gambar 2.13.11 Tampilan tab PCR)



(Gambar 2.13.12 Hasil PCR)

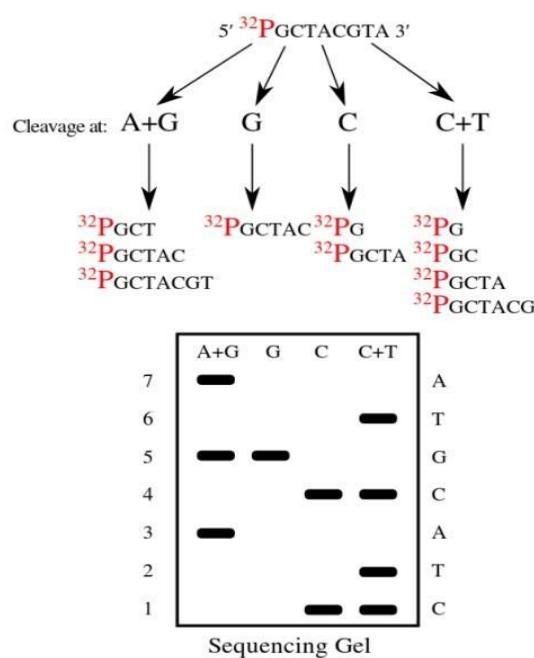
2.14 Sekuensing

Sekuensing DNA atau pengurutan DNA adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA^[14]. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuens-nya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui^[15].

Teknik ini digunakan dalam riset dasar biologi maupun berbagai bidang terapan seperti kedokteran, bioteknologi^[16], dan antropologi.^[17]

2.14.1 Maxam-Gilbert Sequencing

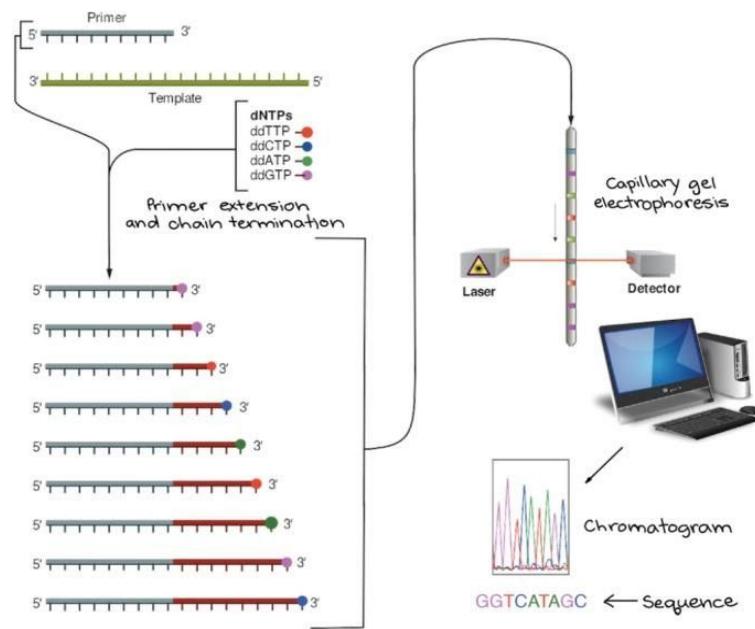
Sekuensing Maxam-Gilbert membutuhkan pelabelan radioaktif pada ujung 5' dari DNA dan pemurnian fragmen DNA untuk diurutkan. Perlakuan kimia kemudian menghasilkan jeda pada proporsi kecil satu atau dua dari empat basa nukleotida di masing-masing dari empat reaksi (G, A + G, C, C + T). Dengan demikian serangkaian fragmen berlabel dihasilkan, dari ujung radiolabeled ke situs "cut" pertama di setiap molekul. Fragmen-fragmen dalam empat reaksi berdampingan secara elektroforesis dalam mendenaturasi gel akrilamid untuk pemisahan ukuran. Untuk memvisualisasikan fragmen, gel dipaparkan ke film sinar-X untuk autoradiografi, menghasilkan serangkaian pita gelap yang masing-masing sesuai dengan fragmen DNA yang diberi label radiolabel, dimana urutan dapat disimpulkan^[18].



(gambar 2.14.1 Maxam-Gilbert Sequencing)

2.14.2 Sanger Sequencing

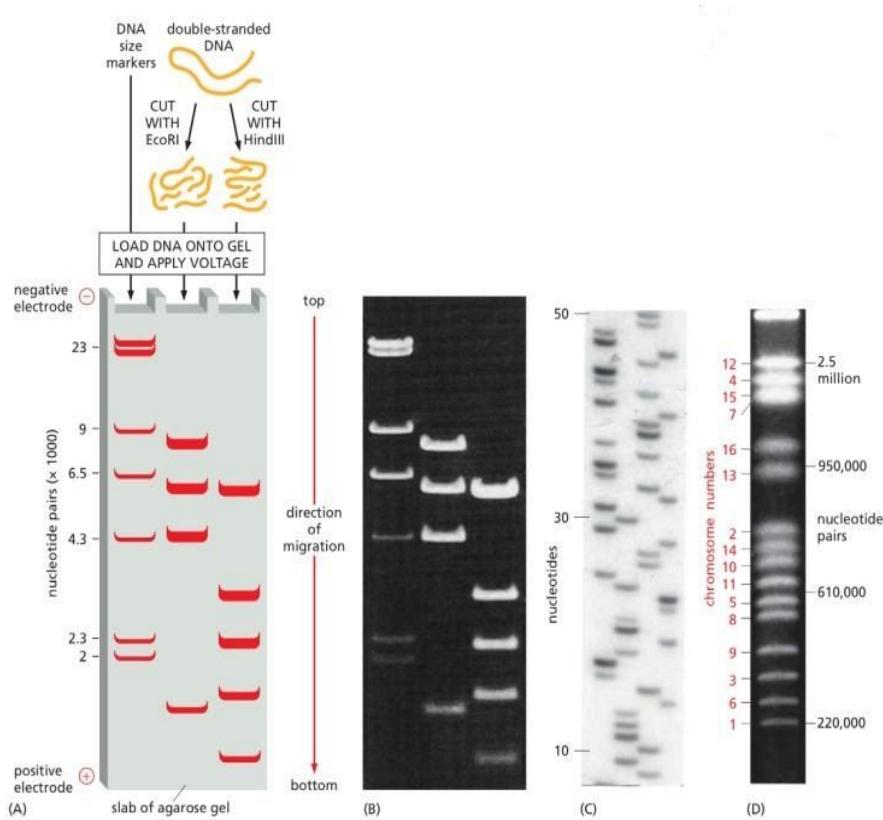
Sanger sequencing adalah metode pengurutan DNA berdasarkan penggabungan selektif dari rantai dideoxynucleotide yang dipecah oleh DNA polimerase selama replikasi DNA in vitro [19].



(Gambar 2.14.2 Sanger Sequencing)

2.15 Elektroforesis

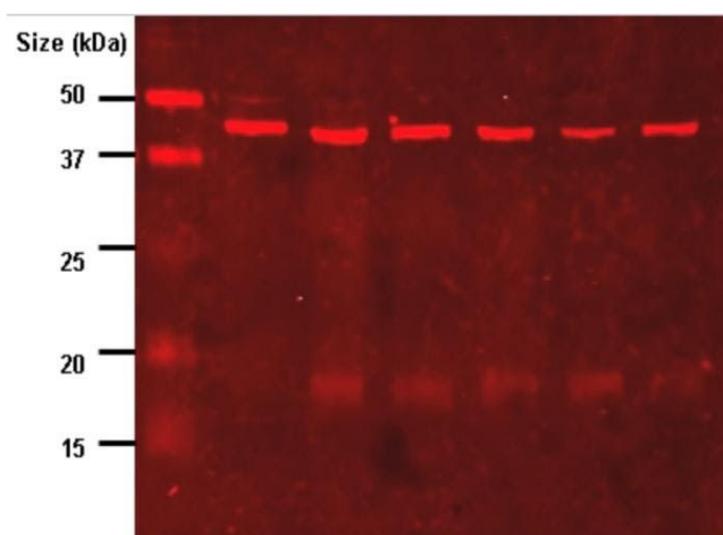
Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik. Teknik ini memanfaatkan muatan listrik pada makromolekul, misalnya DNA yang bermuatan negatif. Jika molekul yang bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, kemudian dialiri arus listrik dari suatu kutub ke kutub yang berlawanan muatannya maka molekul tersebut akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif. Kecepatan gerak molekul tersebut tergantung pada nisbah muatan terhadap massanya serta tergantung pula pada bentuk molekulnya^[20].



(Gambar 2.15.1 Elektroforesis)

2.16 Western Blot

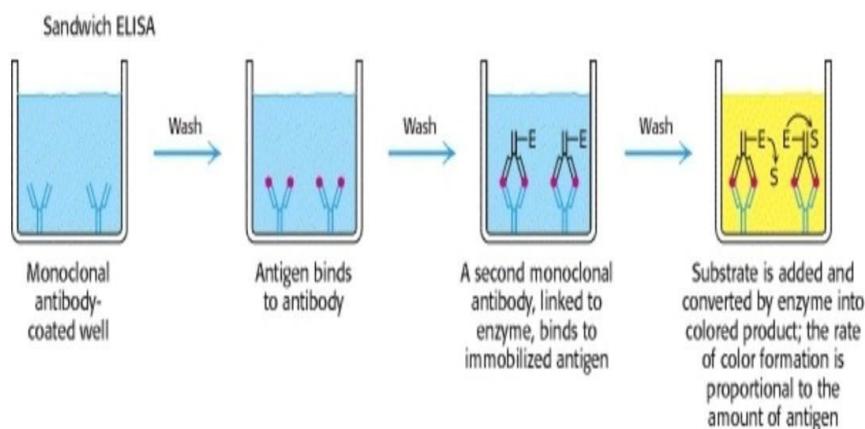
Western blot adalah sebuah metode untuk mendeteksi protein pada sampel jaringan. Western blot menggunakan elektroforesis gel untuk memisahkan protein asli atau perubahan oleh jarak polipeptida atau oleh struktur 3D protein. Protein tersebut dikirim ke membran, di mana mereka dideteksi menggunakan antibodi untuk menargetkan protein^[22].



(Gambar 2.16.1. Western blot menggunakan antigen primer asam anti-lipoat dan antigen sekunder berlabel IR dalam ekstrak utama Leishmania. Tim Vickers, 2012)

2.17 ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) adalah tes biokimia analitik yang umum digunakan, pertama kali dijelaskan oleh Engvall dan Perlmann pada tahun 1971. Uji ini menggunakan Enzyme Immunoassay (EIA) fase padat untuk mendeteksi keberadaan ligan (umumnya protein) dalam sampel cair menggunakan antibodi yang diarahkan terhadap protein yang akan diukur. ELISA telah digunakan sebagai alat diagnosa dalam kedokteran, patologi tanaman, dan bioteknologi, serta pemeriksaan kualitas di berbagai industri. Mulanya, sampel melekat pada permukaan. Kemudian, antibodi yang cocok diaplikasikan di atas permukaan sehingga dapat mengikat antigen. Antibodi ini terkait dengan enzim, dan pada langkah terakhir, zat yang mengandung substrat enzim ditambahkan. Reaksi selanjutnya menghasilkan sinyal yang dapat dideteksi, misalnya perubahan warna^[23].



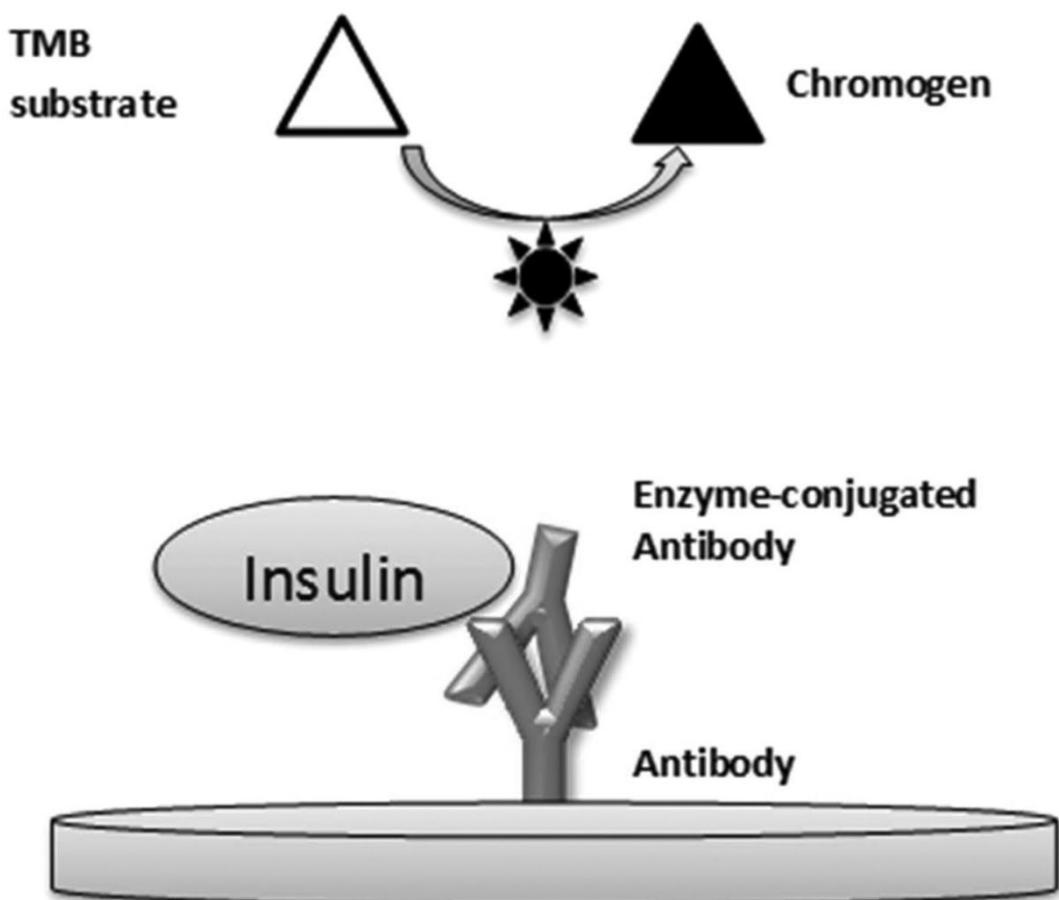
(Gambar 2.17.1 Sandwich ELISA. Pratiksha, Molecular Test, 2015)

2.17.1 Insulin ELISA kit

Tujuan dari ELISA adalah untuk mendeteksi apakah antigen target (proinsulin) terdapat pada sampel. Tipe sandwich ELISA adalah yang paling populer untuk mendeteksi keberadaan proinsulin dan mengandung dua antibodi : antibodi penangkap (antibodi anti-insulin) dan pendekripsi antibodi (peroxide labeled anti-insulin antibodies).[151] Selama inkubasi, insulin pada sampel bereaksi dengan antibodi anti insulin yang tidak bisa bergerak di atas piring

(Gambar 2.1.1). [152] Antibodi yang tidak terikat dibilas dengan larutan pembilas dan 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ditambahkan sebagai substrate chromogenic untuk bereaksi dengan insulin/proinsulin membentuk ikatan konjugasi. [153] Setelah reaksi diberhentikan dengan menambahkan asam, produk yang berwarna diukur pada 450 nm dengan menggunakan spektrofotometer dan mengukur sinyal yang berhubungan dengan konsentrasi analit. [153] kit ELISA yang komersial tersedia untuk mendeteksi proinsulin/insulin menunjukkan batas deteksi (LOD) 3-12pmol/L dan batas atas 600pmol/L. [154] LOD nya 0.73 μ IU mL⁻¹ dan 4.9 μ IU mL⁻¹, and the batas atasnya

200 μ IU mL⁻¹ dan 324 μ IU mL⁻¹ (Even et al. 2007 dan Abellán et al. (2009). [155,156] ELISA memiliki sistem seleksi yang bagus terhadap insulin dan meminimalisir interferensi dari protein lain, sehingga cocok untuk tujuan penelitian dimana sampel mengandung larutan fisiologi berupa gara, dan albumin. [157] Selain itu juga terdapat modifikasi ELISA seperti amplified luminescent proximity homogeneous assay (AlphaLISA) dan homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) telah dikembangkan untuk mendeteksi insulin/proinsulin lebih lanjut.



(Gambar 2.17.2 Direct sandwich ELISA untuk mendeteksi Insulin/Proinsulin^[159])

BAB 3

METODOLOGI

Metodologi yang digunakan dalam penelitian ini adalah teknik in silico.

3.1 In Silico

Pada penelitian ini kami memakai teknik In silico karena beberapa pertimbangan seperti waktu yang dibutuhkan untuk percobaan lebih cepat, lebih ekonomis, dan lain-lain daripada in vivo dan in vitro.

3.2 Data dan Metode Analisis

Proyek ini difokuskan pada analisis komputasi dan metode konstruksi dalam mengembangkan Aloe vera transgenik yang menghasilkan insulin. Data komputasi dan hasil simulasi dikumpulkan untuk merancang eksperimen. Beberapa algoritma dibuat dengan menggunakan bahasa pemrograman. Demikian juga, beberapa alat bioinformatika yang digunakan dalam proyek ini diperoleh dari data-web, database, software, dan lain-lain. Beberapa data juga didapatkan dari GenBank, NCBI, UCSC Genome Browser, konstruksi transgen menggunakan snapgene, benchling, dan pengoptimalan PCR menggunakan suatu program. Selain itu, bagian eksperimental dari penelitian ini akan dilakukan selanjutnya untuk membandingkan data antara hasil komputasi dan hasil eksperimen nyata.

3.3 Prosedur

1. Mengidentifikasi dan mengumpulkan informasi
 - Mengumpulkan informasi mengenai diabetes
 - Menganalisis dari tinjauan pustaka untuk mengkonstruksi sistem dan dasar teori
 - Mengobservasi pendekatan yang paling sesuai untuk mengaplikasikan teknik genetika.
 - Mengumpulkan jurnal dan data transgenik dari database.
2. Mengobservasi dan mengumpulkan data
 - Mengkonstruksi modifikasi transgen untuk meningkatkan produksi insulin pada Aloe vera.
 - Mengumpulkan informasi dari jurnal dan database:
 - Urutan genom (Sekuens).
 - Jalur metabolisme

- Membandingkan platform dan target yang spesifik
- Konstruksi urutan gen
- Menyeleksi enzim restriksi dan ligasi yang digunakan pada penelitian
- Menemukan metode transformasi yang sesuai
- Mencari teori pendukung yang dibutuhkan dalam penelitian
 - Sintesis insulin dan jalur transgenik
 - Mengkonstruksi desain vektor kloning yang sesuai.

3. Simulasi Software

- Mengidentifikasi sisi restriksi menggunakan Mapper version 3.0;
- Optimasi kodon proinsulin dengan dnachisel dan biopython;
 - Splicing;
 - Codon usage table;
 - Optimasi dengan dnachisel;
 - Pairwise alignment dengan biopython.
- Optimasi PCR;
- Konstruksi transgen dengan snapgene dan benchling.

4. Desain eksperimen (Pendekatan modifikasi transgenik)

- Proses di laboratorium
 - Isolasi promoter
 - Perakitan vektor
 - Kloning
 - Transformasi
 - Identifikasi tumbuhan transgenik
- Tes Laboratorium/Hasil Eksperimen
 - Ekstraksi dan karakterisasi molekuler dari *Aloe vera*
 - Identifikasi gen transgenik
 - Tes konfirmasi dari ekspresi
 - Identifikasi tanaman transgenik
 - Ekstraksi insulin dan *western blotting*
 - Identifikasi level insulin yang dihasilkan

3.4 Mengidentifikasi dan Mengumpulkan informasi

Menentukan metode penelitian antara *in vivo*, *in vitro*, dan *in silico*, Menentukan platform dan sistem ekspresi (target transformasi), dan teknik transformasi yang digunakan. Sehingga didapatkan hasil menggunakan pendekatan *in silico*, menggunakan tanaman sebagai platform ekspresi (spesifiknya *Aloe vera*), menggunakan sistem ekspresi kloroplas, dan teknik transformasi menggunakan particle bombardment.

3.5 Mengobservasi dan Mengumpulkan Data Konstruksi

Terdapat 3 sequence genetik utama yang akan kami cloning, yaitu:

1. Promoter psbA (uniprot P83755)
2. Sequence insulin manusia (genbank NC_000011 REGION: complement(2159779..2161209), dengan optimasi untuk aloe vera)
3. NOS terminator (pCAMBIA 1305.1 genbank AF354045.1)

3.6 Langkah-Langkah In silico

- **Data dan Metode Analisis**

Projek ini berfokus pada analisis komputasional dan metode konstruksi dalam pengembangan Aloe vera transgenik yang menghasilkan proinsulin. Data komputasi dan hasil simulasi didapatkan beberapa sumber serta menggunakan beberapa algoritma dan bahasa pemrograman phyton. Rencana dan metode detail eksperimental ditetapkan berdasarkan hasil in silico, dasar teori, data yang diperoleh, dan juga berpedoman dengan penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Selain itu, pada bagian eksperimen penelitian akan dilakukan selanjutnya untuk membandingkan data antara hasil komputasi dan hasil eksperimen nyata

- **Software yang digunakan**

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

3.6.1 Identifikasi situs restriksi

Kami mendapatkan data mengenai situs restriksi dengan software Restriction Mapper 3 (<http://restrictionmapper.org>).

Kami menggunakan vektor pCAMBIA1300.

- Situs restriksi unik MCS pCAMBIA1300:

HindII, SmaI, AccI, ApoI, AvaI, BamHI, BspMI, EcoRI, HindIII, PleI, Sall, XbaI, XhoII, KpnI, NspI, PstI, SacI, SduI, SphI, Sse8387.

Tabel 3.6.1.1 sisi restriksi pada setiap gen (sumber : Restriction Mapper Version 3.0)

Gen	Non Cutter
psbA Promoter	AarI, AatII, AbsI, AccI, AcII, AfIII, AfIII, AgsI, AjuI, Alfl, AloI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApoI, ArsI, Ascl, AsuII, AvaI, AvaII, AvrII, BaeI, BamHI, BarI, BbvCI, BciVI, BclI, BdaI, BfI, BglIII, BplI, Bpu10I, BsaAI, BsaBI, BsaXI, BseRI, BseSI, BsgI, BsmAI, Bsp1407I, BspHI, BspMI, BsrDI, BstXI, BtrI, BtsI, Clal, CspCI, DraII, DraIII, DrdI, Eam1105I, Eco31I, Eco47III, Eco57I, Eco57MI, EcoNI, EcoRI, EcoRV, Esp3I, Fall, FseI, FspAI, GsuI, HaeIV, HgaI, Hin4I, HindII, HindIII, HpaI, Hpy99I, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, NaeI, NheI, NmeAIII, NotI, OliI, PacI, PasI, PfoI, PleI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PstI, PvuI, PvuII, RsrII, SacI, Sall, SanDI, SapI, Scal, PI-SceI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrDI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, SwaI, TaqII, TatI, TspRI, TstI, Tth111I, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, Xmni
Proinsulin	AatII, AbsI, AccI, AcII, AfIII, AfIII, AgeI, AgsI, AjuI, Alfl, AloI, ApaLI, ApoI, ArsI, Ascl, AsuII, AvrII, BaeI, Ball, BamHI, BarI, BbvCI, BccI, BcgI, BciVI, BclI, BdaI, BfI, BglIII, BplI, Bpu10I, BsaAI, BsaBI, BseMII, BsePI, BsmI, BsmAI, Bsp1407I, BspHI, BsrI, BsrBI, BsrDI, BstEII, BstXI, BtgZI, CfrI, Clal, CspCI, DrdI, Eam1105I, EciI, Eco31I, Eco47III, Eco57I, EcoRI, EcoRV, Esp3I, Fall, FseI, FspAI, HaeIV, HgaI, Hin4I, HindII, HindIII, HpaI, Hpy99I, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, MmeI, MsII, NcoI, NdeI, NheI, NotI, NruI, NspI, OliI, PacI, PasI, PflMI, PfoI, PleI, PmaCI, PmeI, PpiI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PvuI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SanDI, SapI, Scal, PI-SceI, SfaNI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, StuI, StyI, SwaI, TaqII, TatI, TfI, TsI, Tsp45I, TspDTI, TspGWI, TstI, Tth111I, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, Xmni

NOS	AarI, AatII, AbsI, AccI, AcII, Acyl, AgeI, AjuI, AlfI, AloI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApoI, ArsI, AscI, AsuII, AvaI, AvaII, AvrII, BaeI, Ball, BamHI, BarI, BbvI, BbvCI, BcgI, BciVI, BclI, BdI, BfiI, BglI, BglIII, BplI, Bpu10I, BsaAI, BsaXI, BseMII, BseRI, BseSI, BseYI, BsgI, BsmI, BsmAI, Bsp1407I, BspHI, BspMI, BsrI, BsrBI, BsrDI, BstEII, BstXI, BtrI, BtsI, CfrI, ClaI, CspCI, DraII, DraIII, DrdI, Eam1105I, EciI, Eco31I, Eco47III, Eco57I, Eco57MI, EcoNI, EcoP15I, EcoRI, EcoRII, EcoRV, Esp3I, Fall, FokI, FseI, FspAI, GsuI, HaeII, HgaI, HindII, HindIII, HpaI, HphI, Hpy99I, KpnI, MboII, MfeI, MluI, MmeI, MsI, NaeI, NarI, NeoI, NdeI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, OliI, PacI, PasI, PflMI, Pfol, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PstI, PvuI, PvuII, RsrII, SacI, SacII, SalI, SanDI, SapI, ScaI, PI-SceI, SduI, SexAI, SfaNI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, Smal, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, StyI, SwaI, TaqII, TatI, TauI, TseI, TsoI, Tsp45I, TspDTI, TspGWI, TspRI, TstI, Tth111I, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XhoII, Xmni
-----	---

3.6.2 Optimasi Kodon Proinsulin dengan dnachisel

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 tgcccctgtc ggcgctgctg gccctctggg gacctgaccc

301 agccgcagcc ttgtgaacc aacacctgtg cggctcacac ctgttggaaag ctctctacct

361 agtgtgcggg gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct

421 gcagggtgggcag gtggagctgg gcggggggccc ttgtcaggc agcctgcage

1261 ctttggccct ggaggggtcc ctgcagaagc gtggcattgt ggaacaatgc tgtaccagca

1321 tctgtccct ctaccagctg gagaactact gcaactag

Warna biru menandakan exon pertama, dan warna merah menandakan exon kedua.

Dengan hasil translasi berikut:

MALWMRLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFY

TPKTRREAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSL

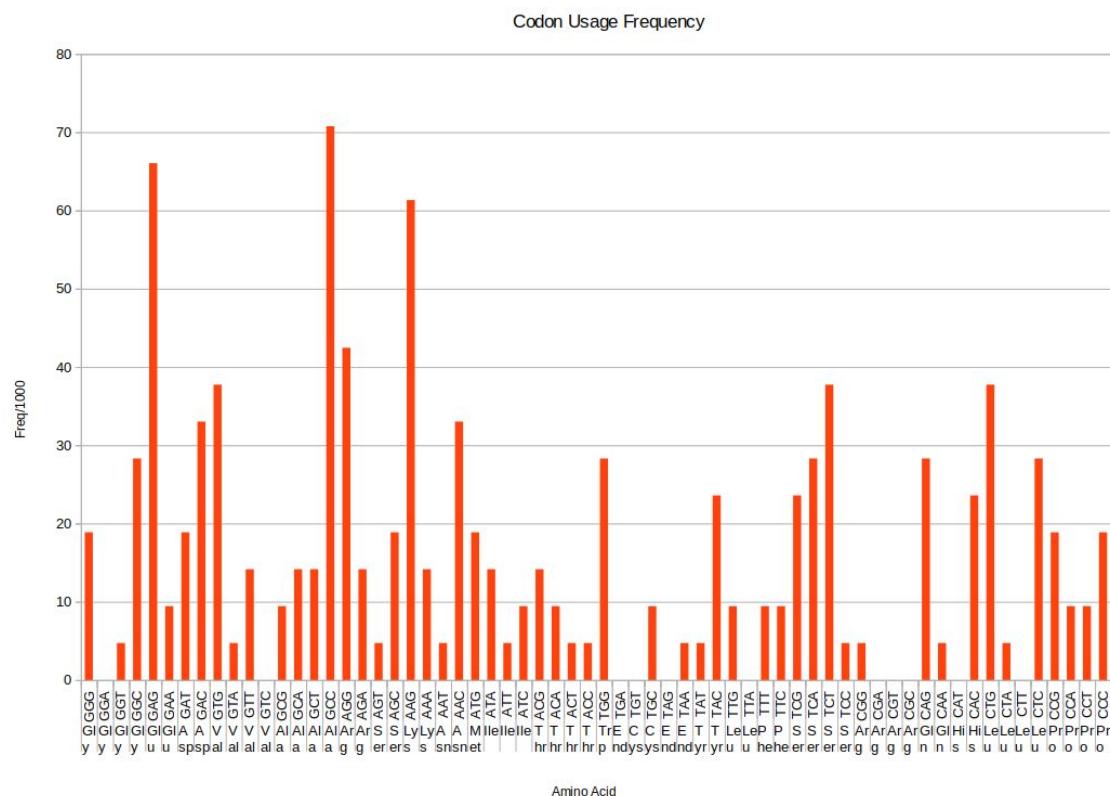
YQLENYCN*

Untuk memastikan ekspresi, maka kami melakukan codon optimization menggunakan python dengan modul dnachisel dan biopython. Codon optimisasi kami didasarkan pada index spesies 34199.chloroplast dari kazusa.

Codon usage table yang kami gunakan:

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

chloroplast Aloe vera [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 46.7 (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

Hasil optimasi berdasarkan codon usage table diatas adalah sebagai berikut:

```
ATGGCCCTGTGGATGAGGCTGCTGCCCTGCTGGCCCTGCTGGCCCTGTG
GGGCCCGAACCCGCCGCCTTGTGAACCAGCACCTGTGCGGCTCTC
ACCTGGTGGAGGCCCTGTACCTGGTGTGCGGCGAGAGGGGCTTCTAC
ACGCCAAGACGAGGAGGGAGGCCGAGGACCTGCAGGTGGGCCAGGTG
GAGCTGGCGGCCGGCGCCGGCTCTGCAGCCCCTGGCCCTGG
AGGGCTCTGCAGAAGAGGGCATAGTGGAGCAGTGCTGCACGTCTAT
ATGCTCTGTACCAAGCTGGAGAACTACTGCAACTAA
```

Hasil translasi setelah optimasi:

```
MALWMRLPLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFY
TPKTRREAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSL
YQLENYCN*
```

Alignment sequence sebelum dan sesudah sequence:

NP_001278826.	1	ATGGCCCTGTGGATGCCCTCTGCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTGT 	50
NP_001278826.	1	ATGGCCCTGTGGATGAGGCTGCTGCCCTGCTGGCCCTGCTGGCCCTGTG 	50
NP_001278826.	51	GGGACCTGACCCAGCCGAGCCTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCAC 	100
NP_001278826.	51	GGGCCCGAACCCGCCGCCCTTGTGAACCAGCACCTGTGCGGCTCTC 	100
NP_001278826.	101	ACCTGGTGGAAAGCTCTACCTAGTGTGCGGGGAACGAGGGCTTCTTCTAC 	150
NP_001278826.	101	ACCTGGTGGAGGCCCTGTACCTGGTGTGCGGCGAGAGGGGCTTCTTCTAC 	150
NP_001278826.	151	ACACCAAGACCGCCGGAGGCAGAGGACCTGCAGGTGGGCAGGTGGA 	200
NP_001278826.	151	ACGCCAAGACGAGGAGGGAGGCCGAGGACCTGCAGGTGGGCAGGTGGA 	200
NP_001278826.	201	GCTGGCGGGGGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCCTGGCCCTGGAGG 	250
NP_001278826.	201	GCTGGCGGCCGCCGGCGCCGGCTCTGCAGCCCCTGGCCCTGGAGG 	250
NP_001278826.	251	GGTCCCTGCAGAACGCTGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAAGCATCTGC 	300
NP_001278826.	251	GCTCTCTGCAGAACGAGGGGATAGTGGAGCAGTGCTGCACGTCTATATGC 	300
NP_001278826.	301	TCCCTCTACCAAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG 	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	MALWMRLPLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFY	50
NP_001278826.	1	MALWMRLPLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFY	50
NP_001278826.	51	TPKTRREAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGS LQKRGIVEQCCTSIC	100
NP_001278826.	51	TPKTRREAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGS LQKRGIVEQCCTSIC	100
NP_001278826.	101	SLYQLENYCN*	111
NP_001278826.	101	SLYQLENYCN*	111

Gambar 3.6.3 Pairwise alignment hasil translasi sebelum dan sesudah optimasi kodon

3.6.3 Optimisasi PCR

Sistem ini dimaksudkan untuk membantu mengevaluasi kuantitas dari primer dan nukleotida untuk reaksi PCR yang optimal dan menentukan jumlah siklus yang dibutuhkan. Estimasi ini bersifat mendasar. Parameter default berhubungan dengan amplifikasi fragmen 2Kb dari 0.5 µg dari DNA manusia. Sehingga diasumsikan :

1. Kondisi dari reaksi mendekati normal, sehingga tidak perlu khawatir tentang teorinya (Kebanyakan polimerase bisa menyebabkan amplifikasi yang tidak spesifik, kebanyakan primer bisa menyebabkan primer-dimer);
2. A,T, dan G,C secara ekuivalen dipresentasikan pada hasil PCR;
3. Tidak terdapat primer-dimers;
4. Taq polimerase tidak kehilangan keaktifannya selama reaksi.

Jika:

- Panjang dari produk PCR adalah “L” [kbp];
- Konsentrasi dNTP’s adalah “c” [mM];
- Kuantitas primer adalah “q” [pmol];
- Kuantitas dari Taq polimerase adalah “a” [u];
- Volume reaksi adalah “V” [µl];
- Waktu elongasi adalah “t” [min];
- Kuantitas template adalah “mo”.

Lalu:

1. Hasil yang maksimal merupakan hasil minimum dari dua evaluasi di bawah ini:

Jika semua nukleotida digunakan :

$$mn = 4[\text{nukleotida}] \times c[\text{mmol/l}] 324.5 [\text{g/mol}] \times V [\mu\text{l}] = 1300 cV [\text{ng}]$$

Jika semua primer digunakan :

$$mp = q[\text{pmol}] \times 2[\text{strands}] \times 324.5[\text{g/mol}] \times L[\text{kbp}] = 650qL [\text{ng}]$$

2. Kuantitas maksimum dari produk PCR per satu siklus bergantung pada dua faktor :

a. Kecepatan taq polimerase : 2-4 [kbp/min];

b. Aktivitas taq polimerase (1 u adalah jumlah dari enzim, yang berinkorporasi 10nmol dari keempat dNTPs in 30 min pada 72oC.

$$mcycle = 10[\text{nmol}] \times 324.5[\text{g/mol}] \times a[u] \times t[\text{min}] / 30[\text{min}] = 108at [\text{ng}]$$

3. Jumlah siklus yang berguna untuk sintesis dari “mmax” produk PCR adalah:

$$mmax = 2^n \times mo \Rightarrow n = \ln(mmax/mo)/\ln$$

4. Hubungan antara massa dan kuantitas mol adalah :

$$m[\mu\text{g}] = 649[\text{g/mol}] \times q[\mu\text{mol}] \times L[\text{kbp}] \times 1000$$

3.6.4 Konstruksi transgen menggunakan snapgene

Tahap pertama yang kami lakukan adalah mencari primer dan situs restriksi berdasarkan hasil dari restriction mapper. Dengan mempertimbangkan data dari restriction mapper, kami memutuskan untuk menggunakan 4 enzim restriksi untuk menyambungkan ketiga gen. Keempat enzim restriksi tersebut adalah KpnI, BamHI, SphI dan HindIII, diurutkan dari kiri ke kanan pada vektor akhir. Keempat situs restriksi itu dipilih karena mereka berempat merupakan non cutter bagi ketiga gen. Untuk menyambungkan ketiga gen dengan MCS pCAMBIA1300, kami memutuskan untuk menggunakan teknik insertion cloning dengan enzim ligase T4.

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)GATCGTTCAAACATTGGCAATAAAGTTCTTAAGA-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

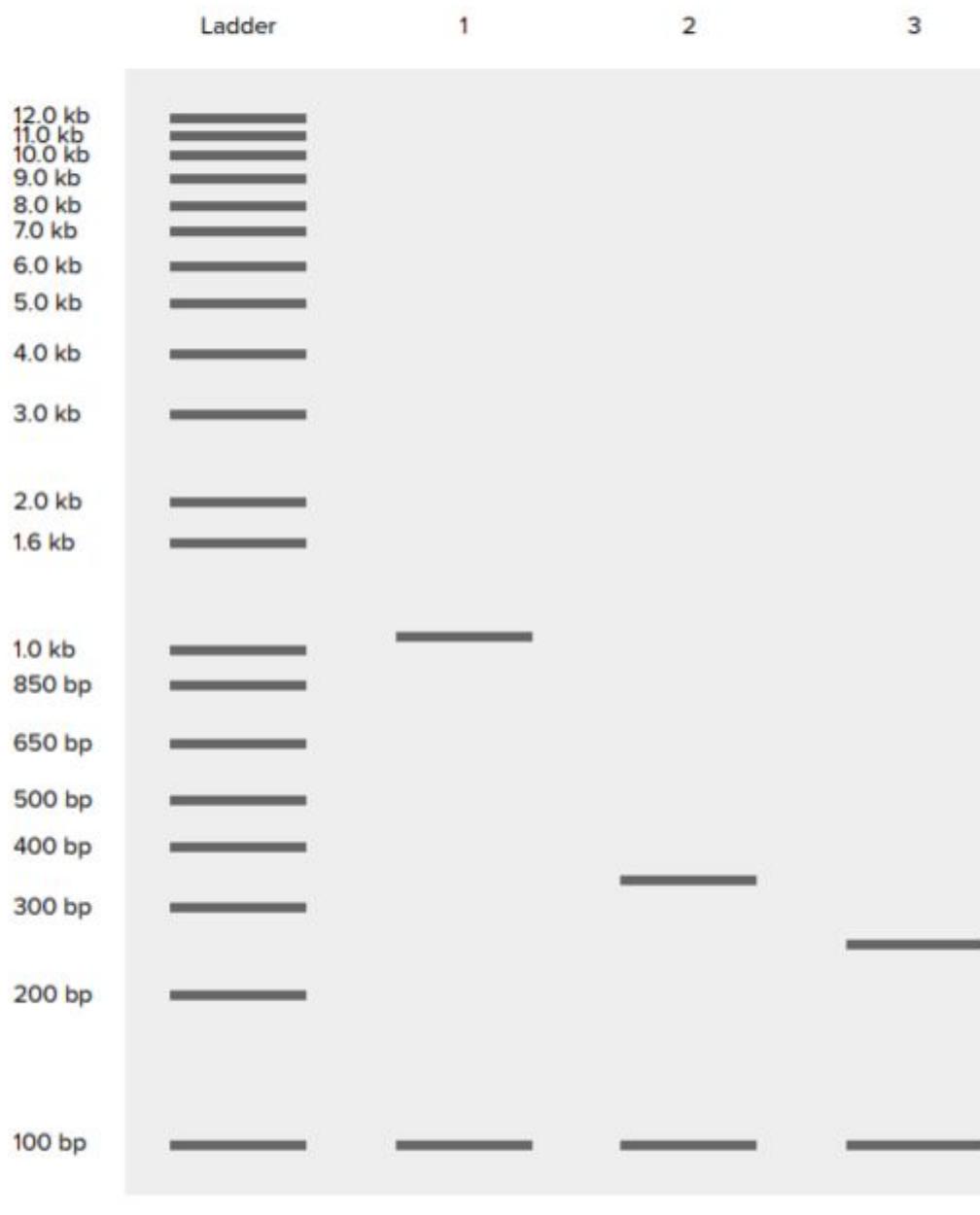
Gambar 3.6.4 Virtual digest Proinsulin dengan enzim BamHI dan SphI (Benchling)

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:

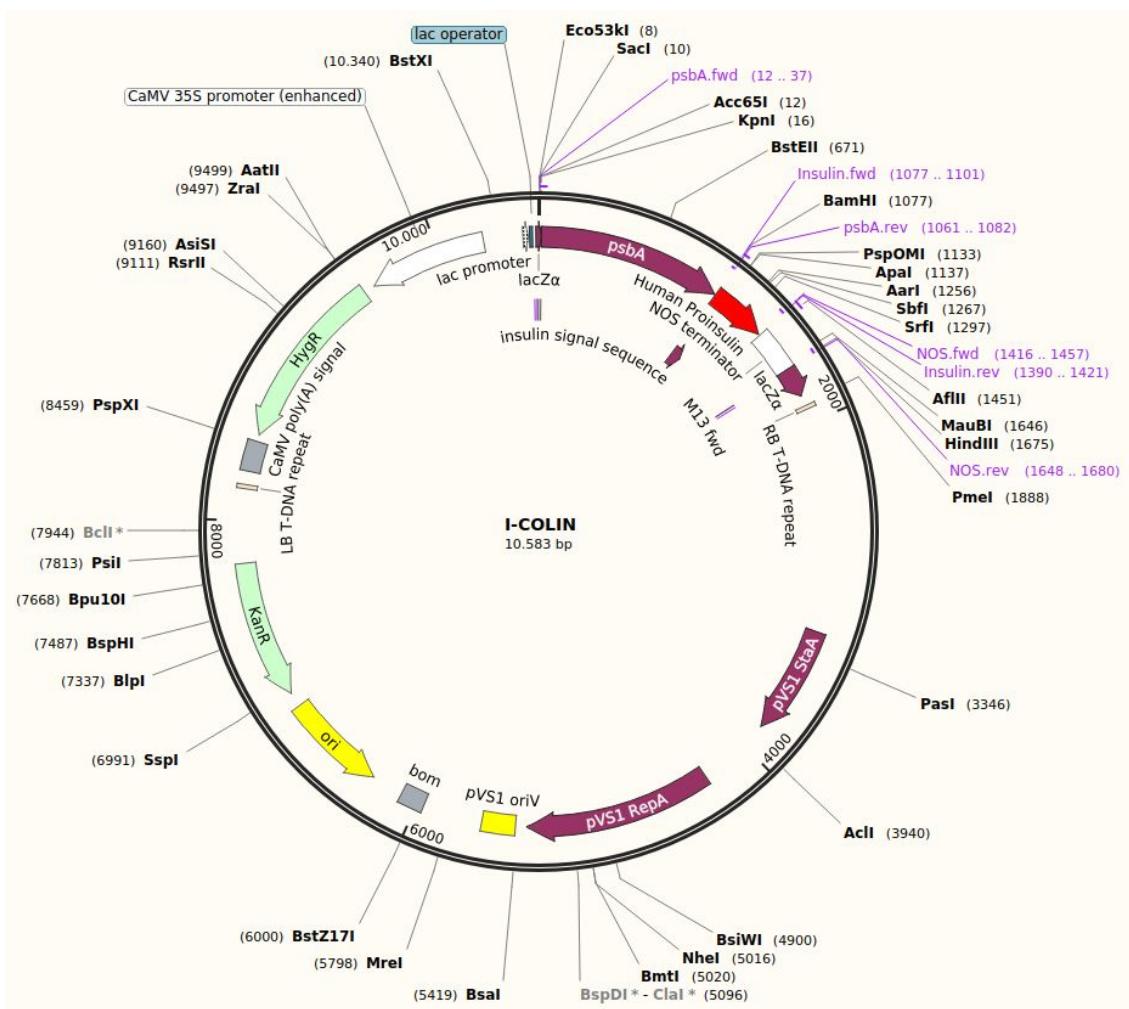
Ladder	Life 1 kb Plus
1	psbA Promoter - BamHI KpnI
2	Optimized Human Insulin - BamHI SphI
3	NOS Terminator - HindIII SphI



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)

Bab 4

Hasil dan Pembahasan

4.1 Mengidentifikasi dan Mengumpulkan informasi

Sistem dan Metode yang digunakan

1. Desain In Silico Aloe vera transgenik
2. Menggunakan tanaman sebagai platform ekspresi
3. Menggunakan sistem ekspresi kloroplas
4. Transformasi menggunakan teknik particle bombardment

4.2 Mengobservasi dan Mengumpulkan Data Konstruksi

Terdapat 3 sequence genetik utama yang akan kami cloning, yaitu:

1. Promoter psbA (uniprot P83755)
2. Sequence insulin manusia (genbank NC_000011 REGION: complement(2159779..2161209), dengan optimasi untuk aloe vera)
3. NOS terminator (pCAMBIA 1305.1 genbank AF354045.1)

4.3 Desain Detail dari Eksperimen

Beberapa parameter perlu diperhatikan agar proses menjadi efektif secara maksimal. Dengan biolistik, parameter dapat dikelompokkan sebagai fisik, biologis, dan lingkungan (4–7). Parameter fisik meliputi komposisi dan ukuran microcarrier, penempelan DNA ke microcarrier, dan beberapa parameter instrumen.

Selama pengembangan PDS-1000 / He, pengaturan instrumen divariasikan berbagai macam dan diuji dengan banyak organisme (7,8). Vakum 28,0 dan Hg (94,8 kPa), tekanan helium sekitar 1100 psi (7584,2 kPa), jarak celah 6,5-10,0 mm, dan jarak macrocarrier 6,0-10,0 mm mendekati optimal untuk sebagian besar aplikasi transformasi pabrik. Partikel emas di kisaran 0,7–1,0 μm diameter rata-rata umumnya menghasilkan laju tertinggi dari transformasi, tetapi lebih murah. Selain itu, lapisan DNA yang konsisten ke partikel dan penyebaran partikel ke macrocarrier sangat penting.

Parameter biologis pertama yang perlu diperhatikan adalah konstruk gen pada cloning vector (promotor-gen-terminator dan reporter gene, marker gene penting untuk mencocokkan promotor dan / atau regulatory sequence dengan jaringan tumbuhan, sehingga gen akan diekspresikan pada level yang diinginkan. Parameter biologi lainnya meliputi tipe jaringan, ukuran sel, dan umur sel kultur, fase mitosis, dan lain-lain.

Faktor lingkungan seperti suhu; kelembaban; dan intensitas cahaya, kualitas, dan durasi memiliki efek langsung pada fisiologi jaringan (6). Kelembaban juga penting dalam persiapan dan penembakan microcarrier. Kelembaban tinggi dapat menyebabkan microcarrier menggumpal dan / atau terikat secara permanen ke macrocarrier, sehingga mengurangi tingkat transformasi. Kelembaban tinggi juga mungkin mempengaruhi stok alkohol yang digunakan selama tahap pelapisan DNA / microcarrier. Beberapa peneliti menggunakan suhu dingin sambil melapisi macrocarrier dengan DNA.

Langkah kerja umum :

1. Kultur dan Preparasi Sel Tanaman
2. Persiapan DNA coated microcarrier
 - a. Sterilisasi dari *Macrocarrriers dan Holders*
 - b. Sterilisasi dari Partikel Emas
 - c. Membungkus Partikel Emas dengan DNA
3. Bombardment
4. Perlakuan Pasca Bombardment dari medium
5. Analisis Ekspresi dari GUS
6. Seleksi Embrio, Germinasi, dan Regenerasi

(Tabel 3.7.1 Flowchart transformasi menggunakan sistem Particle bombardment secara umum.)

Time	Activity (in sequential steps)
<i>Week prior to bombardment</i>	
(-) 6 d	Sterilize supplies (Whatman and Sharkskin filter papers, funnels, flasks, water, etc.).
(-) 5 d	Prepare media needed for transformation procedure. GM+NOA suspension culture medium. 1/2 MS-HF bombardment medium with osmotica. 1/2 MS-HF medium without osmotica. 1/2 MS-HF selective medium.
(-) 4 d	Subculture or refresh medium of embryogenic cell suspensions.
<i>Week of bombardment</i>	
(-) 1 d	Set gene gun parameters (distances as described in Fig. 2). Weigh gold particles (microcarriers) and place in an oven overnight. Sterilize macrocarriers, holders and stopping screens. Assemble macrocarriers into holders.
Key d	Bombardment day (suggested day, Tuesday). Examine embryogenic cell suspension for contamination using a microscope. Prepare cells on filter paper for bombardment. Sterilize microcarriers. Coat microcarriers with DNA. Bombard cells. Incubate cells in the dark at $23 \pm 1^\circ\text{C}$.
(+) 1 d	Transfer cells to medium without osmotica. First transfer approx 16 h after bombardment. Second transfer approx 24 h after bombardment.
(+) 2 d	Transfer cells to selective medium. Analysis of reporter gene (i.e., GUS assay) for transient expression.
(+) 3 d	Examine GUS-positive blue spots per filter paper.
<i>Postbombardment weeks</i>	
(+) 30 d	Transfer cells to fresh selective medium. Reporter gene assay for transient expression.
(+) 60 d	Check plates for development of embryos. Transfer embryos to germination medium. Transfer remaining cells to fresh selective medium. Reporter gene assay for long-term expression.
(+) 90 d	Items and procedure as in (+) 60 d. Transfer germinated embryos to plant growth medium.

4.3.1 Menyiapkan Material dari Tanaman

-Kultur Jaringan

Kalus Aloe vera didapatkan dari biji. Benih disterilkan permukaannya dalam etanol 70% (v / v) selama 30 detik diikuti dengan 10 menit dalam pengenceran pemutih untuk konsentrasi efektif 1% (v / v) natrium hipoklorit dan kemudian direndam semalaman dalam larutan 0,5% (v / v) media pengawet tanaman. Embrio yang diisolasi dilapisi pada media MS yang dilengkapi dengan gelrite 0,25% (w / v), sukrosa 3% (b / v), PPM 0,01% (v / v), 300 mg / L myo-inositol, 2 mg / L NAA, 0,2 mg / L BA, 0,01 mM AgNO₃ dan 2 mM CaCl₂. Sesuaikan dengan pH 5,4 pasca autoclave. Embrio yang diisolasi ditumbuhkan pada keadaan gelap pada suhu 25°C. Tunas dan akar yang sedang tumbuh telah dibuang. Kalus dipilih setelah 4 minggu. Embriogenesis somatik dimulai pada media MS yang mengandung 0,2 mg / L NAA, 0,2 mg / L BA tanpa AgNO₃ dan terkena cahaya 14 jam, siklus gelap 10 jam yang disediakan oleh tabung fluoresen putih dingin. Tunas yang sedang berkembang dipindahkan ke media MS dengan 0,2 mg / L NAA untuk mengembangkan akar di pembuluh magenta, dikeraskan dan dipindahkan ke tanah.

4.3.2 Mengisolasi gen dan melakukan PCR

Primer yang digunakan:

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)GATCGTTAACACATTGGCAATAAAGTTCTTAAGA-3'
 - b. Reverse: 5'-(HindIII)GATCTAGAACATAGATGACACCGCGC-3'

Primer dirancang menggunakan snapgene dan ditambahkan situs restriksi agar sequence hasil PCR diapit oleh situs restriksi.

4.3.3 Optimasi kodon

Sekuens dari gen dilakukan optimasi kodon untuk meningkatkan kecocokan dengan kodon preferensi pada genom Aloe vera.

4.3.4 Mengkonstruksi Vektor, Kloning, dan Amplifikasi

Teknik konstruksi vektor dapat dilihat pada 3.6.4

4.3.5 Transformasi Aloe vera

Kalus Aloe vera dirawat selama 4 jam dalam media osmotik (media MS dilengkapi dengan 36,4 g / L sorbitol dan 36,4 g / L manitol seperti yang direkomendasikan oleh Frame et al. (2000), sebelum ditransformasikan dengan sistem pengiriman partikel Biolistic PD-1000 / He (BioRad, Hercules, CA) menggunakan partikel Au 1 lm, tekanan Helium 1.100 psi dan jarak target 9 cm. Partikel emas dilapisi dengan DNA plasmid dengan protokol yang telah dijelaskan sebelumnya (Frame et al. 2000). Vektor ekspresi dibangun dengan mengkloning promoter ubiquitin yang diamplifikasi PCR seperti yang dijelaskan sebelumnya oleh Christensen dan Quail (1996) ke dalam pCAMBIA1300. [160 dan Lowther, Lorick. 2012]

Sel dikembalikan ke media osmotik (selanjutnya ditambah dengan 200 mg / L glutathione dan 1 mM DTT) selama 1 jam sebelum dipindahkan ke MS yang dilengkapi dengan antioksidan. Dalam waktu 2 minggu sel dipindahkan ke media MS yang dilengkapi dengan 50 mg / L Kan untuk seleksi setelah globules sekunder mulai berkembang. Sel dipindahkan ke media regenerasi dan tunas yang berkembang diisolasi dan diuji untuk ekspresi transgen. (Lowther, Lorick. 2012)

Setelah konstruksi DNA yang merupakan gen yang diminati dimasukkan ke dalam vektor, konstruksi DNA akan dimasukkan ke dalam sel-sel Aloe vera menggunakan berbagai teknik. Terdapat beberapa metode untuk menggabungkan konstruksi DNA yang terkandung dalam vektor ke dalam sel lidah buaya atau jaringan untuk membuat transform lidah buaya yang stabil, namun pada penelitian

ini kami menggunakan teknik particle bombardment. (Langkah-langkahnya dapat dilihat pada gambar 3.7.1).

4.3.6 Identifikasi Organisme Transgenik

Setelah kultivasi, kalus yang telah selesai di proliferasi di dalam medium seleksi yang mengandung hygromycin yang diprediksi sebagai kalus yang telah di transformasi.

4.3.7 Penanaman

Tanaman yang telah ditransformasi telah diaklimatisasi pada transgenic greenhouse yang ditanam pada pot dengan disterilisasi dan diberikan nutrient. Setelah beberapa minggu, tanaman yang telah ditransformasi dipindahkan ke dalam buket. Setelah semua langkah dilakukan, maka akan dilakukan tahapan analisis insulin yang dihasilkan.

4.3.8 Mengekstraksi dan Purifikasi Protein dari sel tanaman

Kemungkinan protein yang diinginkan terkonsentrasi di bagian tengah gel daun Aloe vera. Ekstraksi protein dapat dilakukan dari total biomassa atau jaringan tertentu. Ekstraksi protein dari sel tanaman dapat mencakup metode fisik dan kimia. Ekstraksi protein dari daun atau getah dapat melibatkan ultrasentrifugasi, ekstraksi kimia, dan kromatografi afinitas.

4.3.9 Analisis Immunoblot

Dengan menggunakan Western blot dan ELISA.

a. Western blot

Terdapat modifikasi dari Western blot untuk mendeteksi presensi insulin. (Penjelasan pada 2.14)

b. Insulin ELISA kit

Tujuan dari ELISA adalah untuk mendeteksi apakah antigen target (proinsulin) terdapat pada sampel. Sistem nya akan mengenal natural dan rekombinan insulin. (Penjelasan pada 2.15)

4.3.10 Tes Reseptor Insulin Manusia

Salah satu tes nya dapat menggunakan molecular docking (contoh software nya : Hex 8.0, AutoDock Vina, dan lain-lain) untuk mengetahui interaksi/kecocokan antara ligan (insulin transgenik dan reseptor insulin manusia.

Bab 5

Kesimpulan dan Saran

5.1 Kesimpulan

Aloe vera cocok dijadikan tanaman transgenik untuk menghasilkan proinsulin. Aloe vera telah diteliti oleh banyak ilmuwan terutama dalam kandungan protein dan berbagai khasiatnya. Akhir-akhir ini juga terdapat berbagai penelitian tentang modifikasi genetik Aloe vera sebagai kandidat tanaman transgenik. Selain berpotensi sebagai tanaman transgenik, Aloe vera menawarkan berbagai keuntungan, diantaranya, kemudahan dalam proses kultivasi dan ekstraksi sehingga menjadi lebih ekonomis, rendahnya risiko kontaminasi oleh substansi toxic, dan membutuhkan waktu relatif singkat dengan hasil produksi yang tinggi, sehingga meningkatkan produktivitas, terutama di daerah beriklim tropis seperti di Indonesia.

5.2 Saran

Masih banyak kekurangan dari desain in silico ini, diharapkan dengan adanya desain ini bisa menjadi pertimbangan ataupun sebagai perbandingan ketika melakukan eksperimen in vivo.

Referensi

- [1] Diabetes atlas, international Diabetes Federation, 2019
- [2] Dong YM, Zhu SQ. Shanghai: Aloe Refinery Tech and Its Rules. Shanghai: Shanghai Science-Tech Press, 2002 (in Chinese).
- [3] Gu YX, Zhu SZ. Plant and Application of Aloe. Shanghai: Shanghai Science-Tech Press, 1999 (in Chinese).
- [4] Shi XJ. Discussion on aloe and its exploitation. Southwest Horticulture, 2001, 29: 14–17.
- [5] Sustiprijatno. Jagung Transgenik dan Perkembangan Penelitian di Indonesia. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. <http://balitseral.litbang.pertanian.go.id/wp-content/uploads/2016/11/duadelapan.pdf>. Diunduh pada 22 April 2020.
- [6] Cells and beyond Austin, 2016.
<https://cellsandbeyond.wordpress.com/2016/04/28/using-e-coli-for-insulin-production/>.
- [7] Francisco Pouci, 2017. Aloe vera for Tissue Engineering Application. Journal of Functional Biomaterials. DOI: [10.3390/jfb8010006](https://doi.org/10.3390/jfb8010006)
- [9] Bowen RA, Austgen L, Rouge M. 2002. Biology and Activity of Restriction Endonucleases. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/renzymes.html> [10 Januari 2020].
- [10] Pingoud A, Jeltsch A. 2001. Structure and function of type II restriction endonucleases. Nucleic Acids Res 29(18): 3705-27
- [11] Molecular Biology of the Cells, Bruce Albert, 6th edition, 2015
- [12] add gene. <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/promoters/>
- [13] Molecular Biology of the Cells, Bruce Albert, 6th edition, 2015
- [14] Rogers, K., ed. (2011), New Thinking about Genetics, New York: Britannica Educational Publishing, hlm. 132
- [15] Glick, B.R., Pasternak, J.J., Patten, C.L. (2010). Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA (edisi ke-4). Washington, DC: ASM Press. hlm. 117–118.

- [16] Sweet, K.M., Michaelis, R.C. (2011). The Busy Physician's Guide to Genetics, Genomics and Personalized Medicine. Dordrecht: Springer. hlm. 76.
- [17] Bieber, F.R. (2004), "Science and Technology of Forensic DNA Profiling: Current Use and Future Directions", dalam Lazer, D. (Penyunting), DNA and the Criminal Justice System: the Technology of Justice, Cambridge, MA: MIT Press, hlm. 30.
- [18] Maxam AM, Gilbert W (February 1977). "[A new method for sequencing DNA](#)". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 (2): 560–64. [Bibcode:1977PNAS...74..560M](#). [DOI:10.1073/pnas.74.2.560](#). [PMC 392330](#). [PMID 265521](#).
- [19] Sanger F; Coulson AR (May 1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase". J. Mol. Biol. 94 (3): 441–8. [DOI:10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](#). [PMID 1100841](#).)
- [20] Westermeier. 2004. Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice. New Jersey: John Wiley & Sons inc.
- Yuwono T. 2005. Biologi Molekuler. Jakarta: Erlangga.
- [21] U. Albrecht et al., J. Gen. Virol. 75:3353-3363, 1994; C, courtesy of Leander Lauffer and Peter Walter; D, from D. Vollrath and R.W. Davis, Nucleic Acids Res. 15:7865–7876, 1987. With permission from Oxford University Press. Molecular Biology of the cells, bruce Albert,2015)
- [22] Renart J, Reiser J, Stark GR. "Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure", Proc Natl Acad Sci U S A, 1979 Jul;76(7):3116-20. [PMID: 91164 abstract](#)
- [23] Engvall, E (1972-11-22). "[Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa](#)". The Journal of Immunology. 109 (1): 129–135. [ISSN 0022-1767](#). [PMID 4113792](#).
- [24] researchgate.net/figure/Comparison-of-in-vivo-in-vitro-and-in-silico-methods-for-U V-A-assessment_tbl3_280623647
- [25] Cong Fen He, Jiaxing Zhang, Jie Chen. 2007. Genetic Transformation of Aloe barbadensis Miller by Agrobacterium tumefaciens. Journal of Genetics and Genomics. College of Chemistry, Beijing. Institute of crops science, Beijing.
- [26] Sahdev S, Khattar SK. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression system: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem. 2008;307: 249-264.

- [27] Ferrer-Miralles N, Villaverde A. Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microb Cell Fact.*
- [28] Gellissen G, Hollenberg CP: A comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review. *Gene.* 1997, 190: 87-97. doi:10.1016/S0378-1119(97)00020-6.
- [29] Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D: Recombinant protein production in yeasts. *Mol Biotechnol.* 2005, 31: 245-259. doi:10.1385/MB:31:3:245.
- [30] Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell DA: High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol.* 2000, 18: 333-338. doi:10.1038/73796.
- [31] Lower et al. "transgenic aloe plants for production of protein and related methods"
- [32] Jefferson, R. A. (1987). *Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology Reporter,* 5(4), 387–405. doi:10.1007/bf02667740
- [33] William Lowther • Kevin Lorick • Susan D. Lawrence • Wen-Shuz Yeow Expression of biologically active human interferon-alpha 2 in Aloe vera
- [34] Plotkin, JB, Kudla G. (2011). [Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias](#). *Nat Rev Genet*, 12:32–42.
- [35] Wildt, S., & Gerngross, T. U. (2005). The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Reviews Microbiology*, 3(2), 119–128. doi:10.1038/nrmicro1087
- [36] Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., ... Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13(1). doi:10.1186/s12934-014-0141-0
- [37] Boyhan D, Daniell H: Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. *Plant Biotech J* 2011, 9:585–598
- [38] [PCR primer design guidelines](#)
- [39] Campbell RK, White JR., Jr Insulin therapy in type 2 diabetes. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 2002;42:602–11
- [40] Rolla AR, Rakel RE. Practical approaches to insulin therapy for type 2 diabetes mellitus with premixed insulin analogues. *Clin Ther.* 2005;27:1113–25.

- [41] Yaturu S. Insulin therapies: Current and future trends at dawn. *World J Diabetes* 2013;4:1-7
- [42] Benedict C, Frey WH 2nd, Schiöth HB, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. *Exp Gerontol* 2011;46:112-5.
- [43] Craft S, Baker LD, Montine TJ, Minoshima S, Watson GS, Claxton A, et al. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnestic mild cognitive impairment: A pilot clinical trial. *Arch Neurol* 2012;69:29-38.
- [44] Kim H.K., Chung H.J., Park T.G. Biodegradable polymeric microspheres with “open/closed” pores for sustained release of human growth hormone. *J Control Release*. 2006;112:167–174.
- [45] Eilleia, S. Y., Soliman, M. E., Mansour, S., & S. Geneidi, A. (2018). Novel technique of insulin loading into porous carriers for oral delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 297–309. doi:10.1016/j.ajps.2018.03.003
- [46] Dinas Pangan, Pertanian, dan Perikanan Pontianak - Lidah Buaya.
- [47] Reynolds, Tom (Ed.) (2004) *Aloes: The genus Aloe (Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles)*. CRC Press. ISBN 978-0415306720
- [48] Quattrocchi, Umberto (2012) *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology* (5 Volume Set) CRC Press. ISBN 978-1420080445
- [49] Food Drug Administration, HHS (2002). "Status of certain additional over-the-counter drug category II and III active ingredients. Final rule". *Fed Regist*. **67** (90): 31125–7. PMID 12001972
- [50] National Center for Complementary and Integrative Health, US National Institutes of Health. 1 September 2019. Diakses tanggal 24 August 2019.
- [51] Mayo Clinic. 17 September 2017. Diakses tanggal 21 Januari 2020.
- [52] Transgenic aloe plants for production of proteins and related methods
- [53] Borgoño, C. A., & Zinman, B. (2012). *Insulins: Past, Present, and Future. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 41(1), 1–24. doi:10.1016/j.ecl.2012.03.002
- [54] Hagedorn HC, Jensen BN, Krarup NB, et al. Protamine insulinate. *JAMA* 1936; 106:177–80.

- [55] Scott DA, Fisher AM. Studies on insulin with protamine. *J Pharmacol Exp Therapeut* 1936;58:78–92.
- [56] Himsworth HP. Protamine insulin and zinc protamine insulin. *Br Med J* 1937;1:541–6.
- [57] Krayenbuhl C, Rosenberg T. Crystalline protamine insulin. *Rep Steno Mem Hosp Nord Insulin Lab* 1946;1:60–73.
- [58] Hallas-Moller K. The lente insulins. *Diabetes* 1956;5:7–14.
- [59] Oakley W, Hill D, Oakley N. Combined use of regular and crystalline protamine (NPH) insulins in the treatment of severe diabetes. *Diabetes* 1966;15:219–22.
- [60] Sanger F. Chemistry of insulin; determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science* 1959;129:1340–4.
- [61] Markussen J, Damgaard U, Jorgensen KH, et al. Human monoclonal insulin. Chemistry and characteristics. *Acta Med Scand Suppl* 1983;671:99–105.
- [62] Keen H, Glynne A, Pickup JC, et al. Human insulin produced by recombinant DNA technology: safety and hypoglycaemic potency in healthy men. *Lancet* 1980;2:398–401.
- [63] Velcheva, M., Faltin, Z., Vardi, A., Hanania, U., Eshdat, Y., Dgani, O., ... Perl, A. (2010). Aloe vera transformation: the role of Amberlite XAD-4 resin and antioxidants during selection and regeneration. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(6), 477–484. doi:10.1007/s11627-010-z
- [66] ^ Norris, Sonya (4 July 2005). "Molecular farming". Library of Parliament. Parliament of Canada. PRB 05-09E. Diakses tanggal 2008-09-11.
- [67] ^ Kaiser, Jocelyn (25 April 2008). "Is the Drought Over for Pharming?" (PDF). *Science*. 320 (5875): 473–5. doi:10.1126/science.320.5875.473. PMID 18436771.
- [68]. Vieira Gomes, A.M.; Souza Carmo, T.; Silva Carvalho, L.; Mendonca Bahia, F.; Parachin, N.S. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. *Microorganisms* 2018, 6, 38. [CrossRef]
- [71]. Shanmugaraj, B.; Ramalingam, S. Plant expression platform [74]. Sahdev, S.; Khattar, S.K.; Saini, K.S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 2008, 307, 249–264. [CrossRef]
- [75]. Strasser, R.; Stadlmann, J.; Schahs, M.; Stiegler, G.; Quendler, H.; Mach, L.; Glossl, J.; Weterings, K.; Pabst, M.;

- Steinkellner, H. Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnol.* [77]. Montero-Morales, L.; Steinkellner, H. Advanced plant-based glycan engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018, 6, 81. [CrossRef] [PubMed]
- [79]. Menary, J.; Hobbs, M.; Mesquita de Albuquerque, S.; Pacho, A.; Drake, P.M.W.; Prendiville, A.; Ma, J.K.;
- Fuller, S.S. Shotguns vs Lasers: Identifying barriers and facilitators to scaling-up plant molecular farming for high-value health products. *PLoS ONE* 2020, 15, e0229952. [CrossRef]
- [80]. Floss, D.M.; Sack, M.; Stadlmann, J.; Rademacher, T.; Scheller, J.; Stöger, E.; Fischer, R.; Conrad, U. Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody–ELP fusion proteins from transgenic plants. *Plant Biotechnol. J.* 2008, 6, 379–391. [CrossRef]
- [81]. Silva H, Sagardia S, Seguel O, Torres C, Tapia C, Franck N, Cardemil L: Effect of water availability on growth and water use efficiency for biomass and gel production in Aloe Vera (*Aloe barbadensis* M.). *Industrial Crops and Products* 2010, 31(1):20-27.
- [82]. Grace OM, Buerki S, Symonds MR, Forest F, van Wyk AE, Smith GF, Klopper RR, Bjorå CS, Neale S, Demissew S: Evolutionary history and leaf succulence as explanations for medicinal use in aloes and the global popularity of Aloe vera. *BMC evolutionary biology* 2015, 15(1):29.
- [83]. Reynolds T, Dweck A: Aloe vera leaf gel: a review update. *Journal of ethnopharmacology* 1999, 68(1-3):3-37.
- [84]. Gupta VK, Malhotra S: Pharmacological attribute of Aloe vera: Revalidation through experimental and clinical studies. *Ayu* 2012, 33(2):193.
- [85]. Raksha B, Pooja S, Babu S: Bioactive compounds and medicinal properties of Aloe vera L.: An update. *Journal of Plant Sciences* 2014, 2(3):102-107.
- [86]. Hamman JH: Composition and applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules* 2008, 13(8):1599-1616.
- [87]. Joseph B, Raj SJ: Pharmacognostic and phytochemical properties of Aloe vera linn an overview. *International journal of pharmaceutical sciences review and research* 2010, 4(2):106-110.
- [88]. Choudhri P, Rani M, Sangwan RS, Kumar R, Kumar A, Chhokar V: De novo sequencing, assembly and characterisation of Aloe vera transcriptome and analysis of

expression profiles of genes related to saponin and anthraquinone metabolism. BMC genomics 2018, 19(1):427.

[89]. Zonneveld BJ: Genome size analysis of selected species of Aloe (Aloaceae) reveals the most primitive species and results in some new combinations. Bradleya 2002, 2002(20):5-12.

[90]. Kadirvelu Sharon1, Sharma Suvarna. 2017. Cloning of HVA22 Homolog from Aloe vera and Preliminary Study of Transgenic Plant Development. ISSN: 2320 – 7051. DOI: <http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.6033>.

[91]. Jia-Ju Rena, Jian Wang et al. 2020. The complete chloroplast genome of Aloe vera from China as a Chinese herb. aSchool of Nursing, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, China. Taylor & Francis. VOL. 5, NO. 1, 1092–1093 <https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1726229>

[91]. Shubham, Abhisek et al. 2020. The genome sequence of Aloe vera reveals adaptive evolution of drought tolerance

2 mechanisms. bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.29.122895>.

[92]. Jia-Ju Ren, Jian wang. 2020. The complete chloroplast genome of Aloe vera from China as a Chinese herb. © 2020 The Author(s). Published by InformaUK Limited, trading as Taylor & FrancisGroup. DOI : VOL. 5, NO. 1, <https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1726229>

[93]. Gellissen G, Hollenberg CP, Application of yeasts in gene expression studies A comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review. Gene. 1997;190:87–97. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00020-6. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

[94]. 24. Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D: Recombinant protein production in yeasts. Mol Biotechnol 2005, 31:245–259.

[95]. Kjeldsen T, Pettersson AF, Hach M: Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. Biotechnol Appl Biochem 1999, 29:79–86.

[96]. Mansur M, Cabello C, Hernandez L, Pais J, Varas L, Valdes J, Terrero Y, Hidalgo A, Plana L, Besada V, Garcia L, Lamazares E, Castellanos L, Martinez E: Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. Biotechnol Lett 2005, 27:339–345.

- [97]. "nopaline synthase terminator: Topics by Science.gov". www.science.gov. Retrieved 2019-11-20.
- [98] Carrer, Helaine; Hockenberry, Tish Noel; Svab, Zora; Maliga, Pal (October 1993). "Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco". MGG Molecular & General Genetics. 241-241 (1–2): 49–56.
- [99] Vande Broek, A; Lambrecht, M; Vanderleyden, J (1998). "Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by Azospirillum brasilense". Microbiology. 144 (9): 2599–606. doi:10.1099/00221287-144-9-2599. PMID 9782509.
- [100] Sundberg, C., Meek, L., Carroll, K., Das, A., & Ream, W. (1996). VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from Agrobacterium tumefaciens into plant cells. Journal of Bacteriology, 178(4), 1207–1212. doi:10.1128/jb.178.4.1207-1212.1996
- [101] Sundberg CD, Ream W (November 1999). "[The Agrobacterium tumefaciens chaperone-like protein, VirE1, interacts with VirE2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction](#)". Journal of Bacteriology. 181 (21): 6850–5. [doi:10.1128/JB.181.21.6850-6855.1999](https://doi.org/10.1128/JB.181.21.6850-6855.1999)
- [106] Damerval C, Vienne DD, Zivy M, Thiellement H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis 1986; 7: 52–4
- [107] Shaw, M. M., & Riederer, B. M. (2003). *Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis*. PROTEOMICS, 3(8), 1408–1417. doi:10.1002/pmic.200300471
- [108] Novák, P., & Havlíček, V. (2016). *Protein Extraction and Precipitation. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, 51–62. doi:10.1016/b978-0-444-63688-1.00004-5
- [109] Koontz, L. (2014). *TCA Precipitation. Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*, 3–10. doi:10.1016/b978-0-12-420119-4.00001-x
- [110] He, C.-F., & Wang, Y.-M. (2008). *Protein Extraction From Leaves of Aloe vera L., A Succulent and Recalcitrant Plant, for Proteomic Analysis*. Plant Molecular Biology Reporter, 26(4), 292–300. doi:10.1007/s11105-008-0040-9

- [111] Hurkman, W. J., & Tanaka, C. K. (1986). *Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis*. *PLANT PHYSIOLOGY*, *81*(3), 802–806. doi:10.1104/pp.81.3.802
- [112] Faurobert, M., Pelpoir, E., & Chaïb, J. (n.d.). Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. *Plant Proteomics*, 9–14. doi:10.1385/1-59745-227-0:9
- [113] Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., & Panis, B. (2005). *Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis*. *PROTEOMICS*, *5*(10), 2497–2507. doi:10.1002/pmic.200401222
- [114] Saravanan, R. S., & Rose, J. K. C. (2004). *A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues*. *PROTEOMICS*, *4*(9), 2522–2532. doi:10.1002/pmic.200300789
- [115]https://www.researchgate.net/post/Protein_denaturation_vs_degradation
- [116] Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (1998). *Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words*. *Electrophoresis*, *19*(11), 1853–1861. doi:10.1002/elps.1150191103
- [117] Blackstock, W. P., & Weir, M. P. (1999). *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins*. *Trends in Biotechnology*, *17*(3), 121–127. doi:10.1016/s0167-7799(98)01245-1
- [118] Komari, T., Takakura, Y., Ueki, J., Kato, N., Ishida, Y., & Hiei, Y. (n.d.). Binary Vectors and Super-binary Vectors. *Agrobacterium Protocols*, 15–42. doi:10.1385/1-59745-130-4:15
- [127] De Framond, A. J., Barton, K. A., & Chilton, M.-D. (1983). *Mini-Ti: A New Vector Strategy for Plant Genetic Engineering*. *Nature Biotechnology*, *1*(3), 262–269. doi:10.1038/nbt0583-262
- [141] Citovsky, V., Lee, L.-Y., Vyas, S., Glick, E., Chen, M.-H., Vainstein, A., ... Tzfira, T. (2006). *Subcellular Localization of Interacting Proteins by Bimolecular Fluorescence Complementation in Planta*. *Journal of Molecular Biology*, *362*(5), 1120–1131. doi:10.1016/j.jmb.2006.08.017

- [142] Hamilton, C. M. (1997). *A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA.* *Gene,* *200*(1-2), 107–116. doi:10.1016/s0378-1119(97)00388-0
- [143] Liu, Y.-G., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S., & Shibata, D. (1999). *Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning.* *Proceedings of the National Academy of Sciences,* *96*(11), 6535–6540. doi:10.1073/pnas.96.11.6535
- [144] Liu, Y.-G., Nagaki, K., Fujita, M., Kawaura, K., Uozumi, M., & Ogihara, Y. (2000). *Development of an efficient maintenance and screening system for large-insert genomic DNA libraries of hexaploid wheat in a transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector.* *The Plant Journal,* *23*(5), 687–695. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00827.x
- [145] Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (January 1999). "Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential". *BioTechniques.* *26* (1): 112–22, 124–5. doi:10.2144/99261rv01. PMID 9894600.
- [146] Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW (October 2000). "Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods". *Anal. Biochem.* *285* (2): 194–204. doi:10.1006/abio.2000.4753. PMID 11017702. S2CID 258810.
- [147] Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, et al. (June 2007). "Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes". *Curr. Genomics.* *8* (4): 234–51. doi:10.2174/138920207781386960. PMC 2430684. PMID 18645596.
- [148] Bustin SA (August 2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems". *J. Mol. Endocrinol.* *29* (1): 23–39. doi:10.1677/jme.0.0290023. PMID 12200227.
- [149] Keiko, Takashi. 2003. A Role of the –35 Element in the Initiation of Transcription at psbA Promoter in Tobacco Plastids
- [150] Lowther, Lorick. 2012. Expression of biologically active human interferon alpha 2 in Aloe vera
- [151] T. Cruz, T. Kanashiro, A. de Castro, C. Baldin, L. Richtzenhain and J. Araujo Jr., Pesqui. Vet. Bras., 2016, 36, 1171–1177.

- [152] T. Csont, Hungary-Romania cross Border co-operation pro- gramme, 2013, vol. 2007–2013, pp. 3–4.
- [153] I. A. Darwish, Int. J. Biomed. Sci., 2006, 2, 217–235.
- [154] S. E. Manley, I. M. Stratton, P. M. Clark and S. D. Luzio, Clin. Chem., 2007, 53, 922–932.
- [155] M. S. Even, C. B. Sandusky, N. D. Barnard, J. Mistry and M. K. Sinha, Clin. Biochem., 2007, 40, 98–103.
- [156] R. Abellan, R. Ventura, I. Palmi, S. di Carlo, R. di Giovannandrea, M. Bellver, R. Olive, J. A. Pascual, R. Pacifici, J. Segura, P. Zuccaro and S. Pichini, J. Pharm. Biomed. Anal., 2009, 49, 793–799.
- [157] Z. J. Farino, T. J. Morgenstern, J. Vallaghe, N. Gregor.
- [158] Ushimaru, T., Terada, H., Tsuboi, K., Kogou, Y., Sakaguchi, A., Tsuji, G., & Kubo, Y. (2010). *Development of an efficient gene targeting system in Colletotrichum higginsianum using a non-homologous end-joining mutant and Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer*. Molecular Genetics and Genomics, 284(5), 357–371. doi:10.1007/s00438-010-0572-1
- [159] T. Csont, Hungary-Romania cross Border co-operation pro- gramme, 2013, vol. 2007–2013, pp. 3–4.
- [160] Zahra, Ravi. 2016. A novel aseptic technique for micropropagation of Aloe vera mill. herbmed.skums.ac.ir
- [165] Roberts, R. J., & Murray, K. (1976). *Restriction Endonuclease*. CRC Critical Reviews in Biochemistry, 4(2), 123–164. doi:10.3109/10409237609105456
- [166] Kessler, C., & Manta, V. (1990). *Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases — a review (edition 3)*. Gene, 92(1-2), 1–240. doi:10.1016/0378-1119(90)90486-b
- [167] Pingoud A, Alves J, Geiger R (1993). "Chapter 8: Restriction Enzymes". In Burrell M (ed.). *Enzymes of Molecular Biology*. Methods of Molecular Biology. 16. Totowa, NJ: Humana Press. pp. 107–200. ISBN 0-89603-234-5.
- [168] Luria SE, Human ML (October 1952). "A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses". Journal of Bacteriology. 64 (4): 557–69. doi:10.1128/JB.64.4.557-569.1952. PMC 169391. PMID 12999684

- [169] Bertani G, Weigle JJ (February 1953). "Host controlled variation in bacterial viruses". *Journal of Bacteriology*. **65** (2): 113–21. doi:10.1128/JB.65.2.113-121.1953. PMC 169650. PMID 13034700.
- [176] Clark DP (2005). *Molecular biology*. Amsterdam: Elsevier Academic Press. ISBN 0-12-175551-7.
- [177] O'Brien, John A.; Lummis, Sarah CR (2011). "Nano-biolistics: A method of biolistic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nanometer-sized projectiles". *BMC Biotechnology*. 11: 66. doi:10.1186/1472-6750-11-66. PMC 3144454. PMID 21663596.
- [178] Sanford, John C. (1990). "Biolistic plant transformation". *Physiologia Plantarum*. 79 (1): 206–209. doi:10.1111/j.1399-3054.1990.tb05888.x. ISSN 1399-3054.
- [179] Slater, Adrian; Scott, Nigel; Fowler, Mark (2008). *Plant Biotechnology: the genetic manipulation of plants* (2 ed.). Oxford, New York, USA: Oxford University Press Inc. ISBN 978-0-19-928261-6.
- [180] Kikkert, Julie; Vidal, Jose; Reisch, Bruce (2005). Stable transformation of plant cells by particle bombardment/bioistics. *Methods in Molecular Biology*. 286. pp. 61–78. doi:10.1385/1-59259-827-7:061. ISBN 978-1-59259-827-4. PMID 15310913. S2CID 44395352.
- [181] Gan C. (1989) Gene Gun Accelerates DNA-Coated Particles To Transform Intact Cells. *The Scientist* 3(18):25.
- [182] Baldy MW, Strom B, Bernstein H (March 1971). "Repair of alkylated bacteriophage T4 deoxyribonucleic acid by a mechanism involving polynucleotide ligase". *Journal of Virology*. **7** (3): 407–8. doi:10.1128/JVI.7.3.407-408.1971. PMC 356131. PMID 4927528.
- [183] Baldy, M. W. (1970). *The UV sensitivity of some early-function temperature-sensitive mutants of phage T4*. *Virology*, **40**(2), 272–287. doi:10.1016/0042-6822(70)90403-4
- [184] Baldy MW (1968). "Repair and recombination in phage T4. II. Genes affecting UV sensitivity". *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **33**: 333–8. doi:10.1101/sqb.1968.033.01.038. PMID 4891973.

- [185] Wilson, R. H., Morton, S. K., Deiderick, H., Gerth, M. L., Paul, H. A., Gerber, I., ... Patrick, W. M. (2013). *Engineered DNA ligases with improved activities in vitro*. *Protein Engineering Design and Selection*, 26(7), 471–478. doi:10.1093/protein/gzt024
- [186] Pascal, J. M., O'Brien, P. J., Tomkinson, A. E., & Ellenberger, T. (2004). *Human DNA ligase I completely encircles and partially unwinds nicked DNA*. *Nature*, 432(7016), 473–478. doi:10.1038/nature03082
- [187] Lehnman, I. R. (1974). *DNA Ligase: Structure, Mechanism, and Function*. *Science*, 186(4166), 790–797. doi:10.1126/science.186.4166.790
- [188] Foster JB, Slonczewski J (2010). *Microbiology: An Evolving Science* (Second ed.). New York: W. W. Norton & Company. ISBN 978-0-393-93447-2.
- [189] Yang, Y., & LiCata, V. J. (2018). *Pol I DNA polymerases stimulate DNA end-joining by Escherichia coli DNA ligase*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497(1), 13–18. doi:10.1016/j.bbrc.2018.01.165
- [190] "Ligases" (PDF). *Enzyme Resources Guide*. Promega Corporation. pp. 8–14.
- [191] m-edukasi. Kemdikbud. Pembentukan hormon-hormon Endokrin Pankreas
- [192] Richard. Insulin Synthesis and Secretion. VIVO Pathophysiology.