



REKAYASA GENETIKA

PRODUKSI BIOLOGI FARMASI

apt. Aktsar Roskiana Ahmadi, S.Farm., M.Farm., Ph.D.



REKAYASA GENETIKA

PRODUKSI BIOLOGI FARMASI



Sanksi Pelanggaran Hak Cipta

**UNDANG-UNDANG REPUBLIK INDONESIA
NOMOR 28 TAHUN 2014 TENTANG HAK CIPTA**

Ketentuan Pidana

Pasal 113

- 1) Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000,00 (seratus juta rupiah).
- 2) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
- 3) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
- 4) Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).



REKAYASA GENETIKA PRODUKSI BIOLOGI FARMASI

apt. Aktsar Roskiana Ahmad, S.Farm., M.Farm., Ph.D.

EDITOR

Virsa Hadayani

Diterbitkan Oleh
PT. Nas Media Indonesia
Tahun 2024

REKAYASA GENETIKA PRODUKSI BIOLOGI FARMASI

apt. Aktsar Roskiana Ahmad, S.Farm., M.Farm., Ph.D.

Editor : Virsa Hadayani

*Copyright © A. R. Ahmad 2024
All rights reserved*

Layout : Muh Taufik
Desain Cover : Muh Taufik
Image Cover : Freepik.com

Terbitan Ebook, Maret 2024
xii + 110 hlm; 14.5 x 20.5 cm

E-ISBN 978-623-155-584-7 (PDF)

Diterbitkan oleh Penerbit Nasmedia

PT. Nas Media Indonesia

Anggota IKAPI

No. 018/SSL/2018

Sidorejo, Prambanan, Klaten 55584

Batua Raya No. 3, Makassar 90233

Telp. 0811 42 2017

0811 49 2022

0813 4111 6363

redaksi@nasmedia.id

www.nasmedia.id

Instagram: @nasmedia.id

Fanspage: nasmedia.id

Youtube: nasmedia entertainment



PRAKATA



Assalamu Alaikum Wr. Wb

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah Swt, atas rahmat dan kurnia-Nya sehingga buku ini dapat diselesaikan. Buku ini merupakan hasil penelitian tentang suatu model rekayasa genetika pada produk biologi farmasi. Rekayasa jaringan dikembangkan untuk memperbaiki atau meregenerasi organ atau jaringan baru di dalam tubuh. Rekayasa jaringan memanfaatkan sel-sel hidup dalam beberapa jalur untuk memulihkan, memelihara atau meningkatkan jaringan dan organ. Hal ini telah diterapkan dalam perawatan klinis seperti cangkok kulit, pembuluh darah, tulang rawan, tulang, dan gigi.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penyelesaiannya banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak yang tak dapat kami sebutkan satu per satu. Harapan penulis, semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat khususnya bagi pengembangan ilmu bidang farmasi.

Wassalamu Alaikum Wr.Wb.

Makassar, 18 Maret 2024

Penulis

DAFTAR ISI



PRAKATA	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
BAB 1	
PENDAHULUAN	1
BAB 2	
KAJIAN TEORITIS	5
1. Rekombinan Protein	5
2. Sistem Produksi Protein Pada Tanaman	11
3. Modifikasi Pasca-Penerjemahan	13
4. Deteksi Protein	15
5. Produksi Dentin Matriks Protein – 1 (DMP1)	20
BAB 3	
METODE	33
1. Kloning	33
2. Ekspresi dan Optimalisasi hDMP1 Rekombinan	35
3. Pemurnian hDMP1 Rekombinan	35
4. Analisis SDS Page	36
5. Analisis Western Blot	37
6. Kuatifikasi Protein	37
7. Protokol Pelapisan DMP1	37
8. Uji Proliferasi	38
9. Ekspresi Osteogenik	38
10. Uji Klasifikasi	40
11. Analisis Data	40

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN	41
1. Optimalisasi Kodon dan Sintesis Gen.....	41
2. hDMP1 yang diproduksi Eschericia coli	42
3. hDMP1 yang diproduksi Nicotiana bethamiana.....	59

BAB 5

PENUTUP.....	83
DAFTAR PUSTAKA	84
PENULIS	110

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Tinjauan sistem ekspresi protein	6
Tabel 2, Metode Pemurnian Protein Rekombinan.....	18
Tabel 3. Kondisi termosiklus untuk koloni kondisi PCR koloni.....	34
Tabel 4. Primer RT-PCR untuk ekspresi gen spesifik diferensiasi	39
Tabel 5. Kuantifikasi ekspresi hasil dari hDMP1	49
Tabel 6. Kuantifikasi ekspresi hasil dari hDMP1 yang diproduksi oleh <i>N. benthamiana</i>	65

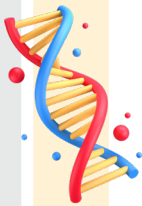
DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. pET-22 b(+) vektor	28
Gambar 2. Vektor pBYR2e.....	29
Gambar 3. pGEM -T vektor	29
Gambar 4. Asam nukleotida dan urutan asam amino yang disimpulkan dari hDMP1	42
Gambar 5. Produk PCR dari amplifikasi hDMP1	43
Gambar 6. Elektroforesis gel agarosa dari koloni PCR pGEMT-hDMP1 dari E. coli DH10B.....	44
Gambar 7. Elektroforesis gel agarosa dari restriksi hDMP1-pGEM-T	45
Gambar 8. Peta vektor dari pET22b-hDMP1	45
Gambar 9. Elektroforesis gel agarosa dari koloni PCR pET22b-hDMP1 dari E. coli DH10B.....	46
Gambar 10. Elektroforesis gel agarosa dari koloni PCR pET22b-hDMP1 dari E. coli strain Rosetta	46
Gambar 11. Analisis Western blot ekspresi hDMP1 pada E. coli. 48	
Gambar 12. Analisis Western blot ekspresi hDMP1 pada E. coli....48	
Gambar 13. Kurva standar kuantifikasi protein DMP1	49
Gambar 14. Analisis Western blot untuk optimasi kondisi ekspresi hDMP1 rekombinan pada E. coli.....	51
Gambar 15. Analisis Western blot dari hDMP1 yang diproduksi E. coli	53
Gambar 16. Analisis SDS-PAGE dari pemurnian hDMP1 yang diproduksi E. coli	53
Gambar 17. Uji proliferasi hDMP1 yang diproduksi E. coli dalam hPDLSC.	55
Gambar 18. hDMP1 yang diproduksi E. coli yang diinduksi diferensiasi osteogenik.....	57

Gambar 19. Uji kalsifikasi hDMP1	59
Gambar 20. Elektroforesis gel agarosa dari restriksi pGEMT-hDMP1.....	60
Gambar 21. Representasi skematis dari daerah T-DNA dalam vektor geminiviral.....	60
Gambar 22. Elektroforesis gel agarosa dari koloni PCR pBYR2e-hDMP1 dari E. coli DH10B	61
Gambar 23. Elektroforesis gel agarosa dari koloni PCR pBYR2e-hDMP1 dari A. tumefaciens GV3101.....	62
Gambar 24. Analisis Western blot ekspresi hDMP1 pada N. benthamiana	64
Gambar 25. Analisis Western blot ekspresi hDMP1 pada N. benthamiana	64
Gambar 26. Kurva standar kuantifikasi protein DMP1	65
Gambar 27. Analisis Western blot dari optimasi OD ₆₀₀ A. tumefaciens pada N. benthamiana.....	66
Gambar 28. Analisis SDS-PAGE untuk optimasi OD600 dari A. tumefaciens pada N. benthamiana	67
Gambar 29. Gejala nekrosis pada daun N. benthamiana.	68
Gambar 30. Analisis SDS-PAGE dari optimasi hari setelah infiltrasi (dpi) pada N. benthamiana.....	68
Gambar 31. Analisis Western blot untuk optimasi	69
hari setelah infiltrasi (dpi) pada N. benthamiana.	69
Gambar 32. Analisis Western blot untuk optimasi konsentrasi amonium sulfat.	70
Gambar 33. Analisis SDS-PAGE dari optimasi konsentrasi pengendapan amonium sulfat curah hujan.	70
Gambar 34. Analisis Western blot dari presipitasi hDMP1.	71
Gambar 35. Analisis SDS-PAGE dari pengendapan hDMP1.	71
Gambar 36. Analisis Western blot dari pemurnian hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana.	72

Gambar 37. Analisis SDS-PAGE untuk pemurnian hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana.	73
Gambar 38. Analisis Western blot pemurnian hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana (pengendapan).....	74
Gambar 39. Analisis Western blot pemurnian hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana (tanpa pengendapan).	74
Gambar 40. Analisis SDS PAGE dari pemurnian hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana (pengendapan).	75
Gambar 41. Analisis SDS PAGE dari pemurnian hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana (tanpa pengendapan).	75
Gambar 42. Uji proliferasi hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana dalam hPDLSC.	76
Gambar 43. hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana menginduksi diferensiasi osteogenik. Penanda gen: ALP, BMP2, CBFA1, COL1, OSX, WNT3a, dan OPN.	78
Gambar 44. Ringkasan protein hDMP1 rekombinan yang menginduksi diferensiasi osteogenik. Penanda gen: ALP, BMP2, CBFA1, COL1, OSX, WNT3a, dan OPN.	79
Gambar 45. Uji kalsifikasi hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana.	80
Gambar 46. Ringkasan uji kalsifikasi protein hDMP1 rekombinan.	81





PENDAHULUAN

Komponen yang diperlukan untuk rekayasa jaringan meliputi perancah, sel, dan bahan biologis. Perancah menyediakan lingkungan bagi sel untuk menghasilkan jaringan baru. Bahan biologis berfungsi dalam menginduksi dan mempromosikan sel untuk meregenerasi organ atau jaringan baru (Akter, 2016). Itu perancah, yang mirip dengan matriks ekstraseluler, berfungsi untuk mempromosikan proliferasi dan diferensiasi sel. Beberapa jenis scaffold telah dikembangkan seperti kolagen (Hendow dkk., 2016), dan chitosan (Levengood dkk., 2014b). Sebelumnya, sel yang digunakan dalam rekayasa jaringan dapat dibagi menjadi tiga kategori yaitu sel pasien (autologus), sel manusia yang diperoleh dari donor (alogen e ic), dan sel asal hewan (xenogeneik) (Sangeeta dkk., 2014).

Faktor penting lainnya adalah bahan biologis s. Molekul-molekul ini berfungsi dalam menginduksi jalur pensinyalan atau komponen seluler yang diperlukan untuk penyembuhan sel atau regenerasi jaringan (Fernandez dkk., 2015). Biomolekul harus memiliki karakteristik seperti osteogenisitas, osteokonduktivitas, dan osteoinduktivitas terhadap osteoblas, osteoklas, dan osteosit. Ada beberapa biomolekul yang telah diterapkan dalam rekayasa jaringan tulang seperti

faktor pertumbuhan dan matriks ekstraseluler (ECM) protein yang dapat mendorong regenerasi tulang (Shrivats dkk., 2014; Sun dkk., 2013).

Protein rekombinan dihasilkan dari manipulasi gen yang dihasilkan dalam beberapa cara untuk mengekspresikan dan memproduksi produk komersial yang bermanfaat. Teknik ekspresi DNA rekombinan telah digunakan untuk produksi antibodi, vaksin, protein terapeutik dan makanan seperti antibodi rantai tunggal rabies-RVG (Phoolcharoen dkk., 2017), antibodi (mAb) 2C10 dan vaksin kolera toksin B subunit (Rattanapisit dkk., 2017), osteopontin (OPN) (Rattanapisit dkk., 2017), laktoferin dan lisozim (Cooper dkk., 2015b). Sistem prokariotik dan eukariotik yang berbeda diterapkan sebagai platform ekspresi untuk produksi protein rekombinan *yaitu* mamalia, serangga, *ragi*, bakteri, dan tanaman (Bonander dkk., 2012; Dalton dkk., 2014; Demain dkk., 2009; Matthews dkk., 2017). Selain itu, setiap host produksi menawarkan kelebihan dan kekurangan. Oleh karena itu pemilihan host disesuaikan dengan tujuan penelitian.

Di antara platform ini, *E. coli* banyak digunakan dalam industri karena pertumbuhannya cepat, umumnya diakui sebagai aman (GRAS), berbiaya rendah, berekspresi tinggi, dan aksesibilitas terhadap manipulasi dan transformasi (He dkk., 2014; Mattanovich dkk., 2012). Namun demikian, *E. coli* tidak memiliki modifikasi pasca-translasi. Konsekuensi kritis dari sistem ini adalah ketidakmampuannya untuk menghasilkan glikoprotein. Namun, sejumlah protein rekombinan diproduksi di *E. coli* yang menunjukkan potensi untuk mengobati rekayasa jaringan seperti protein morfogenetik tulang manusia rekombinan-2 (rhBMP-2) (Kang dkk., 2011), dan osteokalsin (OCN) (Kim dkk., 2015).

Pabrik ini merupakan platform terbaru yang dikembangkan untuk produksi protein rekombinan. Keuntungan menggunakan

tanaman adalah biaya rendah, akumulasi tingkat tinggi, kontaminan rendah, lebih murah untuk ditingkatkan, dan ketersediaan untuk modifikasi pasca-translasi (Demain dkk., 2009). Dua metode dapat dikembangkan untuk menyandikan gen yang dihasilkan ke dalam genom tanaman, termasuk transformasi stabil dan ekspresi transien. Transformasi stabil adalah metode pertama untuk mengubah gen menjadi genom tanaman melalui integrasi stabil. Prosesnya memakan waktu sekitar 12-18 bulan dan terkadang menghasilkan tingkat ekspresi yang rendah (Gleba dkk., 2005).

Di sisi lain, metode ekspresi transien adalah metode transformasi stabil yang ditingkatkan yang memiliki keunggulan cepat dan skalabilitas untuk produksi protein rekombinan ((Krenek dkk., 2015). Proses ekspresi penuh dengan infiltrasi dengan *Agrobacterium* kira-kira 3-10 hari pasca infiltrasi (dpi) ((Gleba dkk., 2005). Saat ini, beberapa protein rekombinan yang diproduksi tanaman tersedia di pasaran, misalnya protein C, interferon α , β , hemoglobin α , β dan penghambat antitripsin α -1 (Daniell dkk., 2001; Thomas et al., 2002). Sedangkan yang lain diuji untuk pengobatan klinis seperti lipase lambung untuk cystic fibrosis dan pankreatitis (Ma dkk., 2005), vaksin antigen permukaan virus Hepatitis B (Liz dkk., 2000), dan vaksin rabies (Yusibov dkk., 2002). Selain itu, tanaman (tembakau) telah menghasilkan functional osteopontin (OPN) yang menginduksi ekspresi osteogenik (Rattanapisit dkk., 2017). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengekspresikan protein rekombinan manusia DMP1 (hDMP1) pada bakteri *Escherichia coli* dan *Nicotiana benthamiana*. dan untuk mempelajari efek proliferasi dan diferensiasi osteogenik dari protein rekombinan ini dalam Sel Induk Ligamen Periodontal manusia (hPDLSCs).

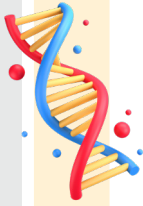
Rekayasa jaringan adalah bidang multidisiplin yang menerapkan prinsip-prinsip teknik, ilmu kehidupan, biologi sel dan molekuler

menuju pengembangan pengganti biologis yang memulihkan, memelihara, dan meningkatkan fungsi jaringan. Rekayasa jaringan bertujuan untuk mengembangkan pengganti jaringan fungsional yang dapat digunakan untuk merekonstruksi jaringan atau organ yang rusak.

Tiga komponen umum terlibat dalam rekayasa jaringan:

- (1) Sel: matriks fungsional
- (2) Perancah: matriks transplantasi
- (3) Molekul bioaktif: jalur pensinyalan induktif

Konstituen triad ini dapat digunakan sebagai komponen tunggal atau digabungkan untuk meregenerasi jaringan. Namun, perancah dapat dikembangkan dengan kolagen atau kitosan. Dengan demikian, molekul bioaktif akan bekerja sebagai molekul induktif. Beberapa faktor pertumbuhan dan protein telah digunakan sebagai molekul induktif seperti protein matriks ekstraseluler (De dkk., 2010; Spiller dkk., 2017) .



KAJIAN TEORITIS



1. Rekombinan Protein

Protein rekombinan adalah hasil dari bentuk protein yang dimanipulasi yang dihasilkan dengan beberapa cara untuk mengekspresikan dan memproduksi produk komersial yang bermanfaat. Produksi protein rekombinan menggunakan teknik bioteknologi untuk menghasilkan protein yang spesifik. Proses ini dilakukan dengan memanipulasi rekombinan DNA (rDNA) ke dalam sistem ekspresi. rDNA terlibat dalam transkripsi hingga penerjemahan ke dalam sintesis protein. Metode DNA komplementer (cDNA) dan PCR yang sesuai dapat diproduksi dengan cepat. Dengan demikian, plasmid mengandung gen bunga yang ditransformasikan ke dalam sistem ekspresi. Ekspresi telah berkembang menjadi domain yang sesuai dengan metode sederhana (Graslund dkk., 2008; Wingfield, 2015).

Sistem ekspresi protein rekombinan sangat direkomendasikan dalam industri bioteknologi untuk memproduksi beberapa protein. Strategi yang efisien untuk menghasilkan protein rekombinan semakin penting, dan semakin banyak aplikasi yang membutuhkan protein berkualitas tinggi dalam jumlah besar untuk direalisasikan di

pasar. Produksi yang tinggi tetapi efisiensi dan biaya yang lebih rendah dari produk akhir diharapkan dapat diperoleh melalui proses industri (Palomares LA, Estrada-Moncada S, & OT, 2004; Wingfield, 2015).

Teknologi protein rekombinan telah digunakan untuk menghasilkan sejumlah protein pada sistem prokariotik dan eukariotik (Greene, 2004; NelsonLehninger & Cox, 2008). Protein non-glikosilasi banyak diekspresikan pada prokariotik (Sahdev Khattar & Saini, 2008). Protein glikosilasi mampu diproduksi dalam sel eukariotik seperti sel mamalia, sel serangga, sel ragi, dan tumbuhan (Jenkins dkk., 1994; Nelson dkk., 2008; Palomares dkk., 2004).

Di antara sel inang, masing-masing inang memiliki kekuatan dan kelemahan yang unik seperti biaya, peningkatan skala, kemampuan modifikasi pasca-translasi, dan pelipatan protein (Clark dkk., 2016). Oleh karena itu, pemilihan sistem didasarkan pada kecocokan dan tujuan penelitian. Keuntungan dan kerugian dari sistem dirangkum dalam Tabel 1. Di antara inang, platform bakteri, yang juga dikenal sebagai sistem ekspresi prokariotik, adalah metode yang paling umum untuk menghasilkan protein dalam jumlah besar (Bonander dkk., 2012; Dalton dkk., 2014; Demain dkk., 2009; Dia dkk., 2014; Mattanovich dkk., 2012).

Tabel 1. Tinjauan sistem ekspresi protein

Perbandingan	Tanaman	Bakteri	Ragi	Sel serangga	Sel mamalia
Biaya	Sangat rendah	Rendah	Sedang	Tinggi	Tinggi
Peningkatan produksi	Sangat tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Rendah
Hasil protein	Tinggi	Sedang	Tinggi	Rendah	Tinggi



Perbandingan	Tanaman	Bakteri	Ragi	Sel serangga	Sel mamalia
Akurasi lipat	Tinggi	Rendah	Sedang	Rendah	Tinggi
Glikosilasi	Benar	Tidak ada	Salah	Salah	Benar
Kualitas produk	Tinggi	Rendah	Sedang	Rendah	Tinggi
Risiko kontaminan	Rendah	Tinggi	Rendah	Tinggi	Tinggi

Sumber: Dalton dkk, 2014.

a. Sel Bakteri

Sistem bakteri, *E. Coli* inang sangat berguna untuk menghasilkan protein rekombinan karena lebih mudah untuk memanipulasi genetik daripada mikroorganisme lainnya. Sistem ini sesuai untuk mengekspresikan protein non-glikosilasi dan tersedia untuk transkripsi, translasi, dan pelipatan protein serta alat genetik yang lebih baik. Selain itu, genom *E. coli* dimodifikasi dengan cepat dan akurat, mudah untuk mengontrol promotor dan mengubah nomor salinan plasmid. Sistem *E. coli* menunjukkan modifikasi karbon metabolik, pencegahan analog asam amino, pembentukan ikatan disulfida intraseluler, dan kontrol yang dapat direproduksi oleh komputer. Produksi protein rekombinan dari sistem ini dapat dikumpulkan lebih dari 80% dari berat keringnya (Demain dkk., 2009).

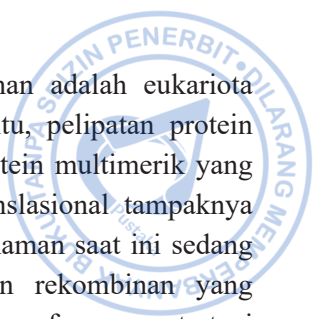
E. coli mengusulkan kebutuhan sumber karbon yang terjangkau untuk pengembangan, pengumpulan biomassa dengan cepat, kepadatan sel yang dapat diterima hingga tinggi, dan mudah untuk ditingkatkan (Sahdev et al., 2008). *E. coli* paling banyak digunakan di industri karena beberapa

keuntungan yang melibatkan tingkat pertumbuhan yang cepat, ekspresi yang tinggi, diakui sebagai aman (GRAS), berbiaya rendah, mudah dimanipulasi dan diubah (Gaciarz dkk., 2016; Rosano dkk., 2014). Beberapa parameter telah dicoba untuk meningkatkan ekspresi *E. coli* seperti memodifikasi promotor, menggunakan strain yang sesuai, mengoptimalkan kondisi, media pertumbuhan, dan ekspresi gen fragmen (Demain dkk., 2009; Maldonado dkk., 2007; Wong, Wu dkk., 2008).

Selain itu, sistem bakteri juga memiliki keterbatasan seperti mengandung toksin dan membentuk badan inklusi (Sahdev dkk., 2008). Badan inklusi seringkali tidak larut, tidak aktif, dan dapat dilipat kembali (Demain dkk., 2009; Jenkins dkk., 1994). Sistem bakteri tidak tersedia untuk mensintesis kompleks protein, seperti antibodi monoklonal dan faktor koagulasi darah. (Clark dkk., 2016; Demain dkk., 2009). Selain itu, sistem bakteri adalah sel prokariotik yang tidak tersedia untuk mesin pasca-translasi (Sahdev dkk., 2008). Namun, protein modifikasi pasca translasi dapat diproduksi dalam sel eukariotik seperti sel mamalia, sel serangga, sel ragi, dan sistem tanaman (Jenkins dkk., 1994; Nelson dkk., 2008; Palomares dkk., 2004).

b. Sel Tanaman

Pemanfaatan tumbuhan untuk menghasilkan protein rekombinan merupakan arah yang menjanjikan dan menjanjikan secara ekonomi yang sedang dikembangkan sebagai alternatif dari tradisional. Keuntungan dari sistem tanaman adalah biaya budidaya sel yang lebih rendah. Ini tidak tunduk pada komponen yang tidak diinginkan, seperti endotoksin bakteri, protein hiperglikosilasi yang dihasilkan oleh ragi, dan patogen hewan dan manusia dalam kultur sel



hewan transgenik. Selain itu, tumbuhan adalah eukariota yang lebih tinggi, dan, oleh karena itu, pelipatan protein penuh dan pembentukan kompleks protein multimerik yang rumit. Signifikansi modifikasi posttranslasional tampaknya analog dengan sel mamalia. Sistem tanaman saat ini sedang dikembangkan untuk ekspresi protein rekombinan yang beragam dalam berbagai teknologi transfer gen, strategi ekspresi dan metode ekstraksi protein target berikutnya. Transformasi stabil (tanaman transgenik) dan ekspresi sementara telah dikembangkan untuk mengekspresikan protein dalam sistem tanaman ((Demain dkk., 2009; Gerasimova dkk., 2016; Zagorskaya dkk. 2017).

c. Sel Yeast

Ragi yang termasuk dalam eukariotik memiliki kemampuan untuk mensintesis protein yang mirip dengan sel manusia asli, karena jalur sekresi mengarah ke protein yang benar dalam modifikasi pasca-translasi (Mattanovich dkk., 2012). Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa ragi bir, *Pichia pastoris* dan *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan protein rekombinan. Spesies-spesies ini sering digunakan untuk memproduksi dan menganalisis protein rekombinan dalam sistem eukariotik. Sel ragi memiliki beberapa keuntungan untuk mengekspresikan protein rekombinan termasuk mudah tumbuh dalam bioreaktor kecil atau besar, dapat diterima untuk memproduksi farmasi tanpa persetujuan pemerintah, mudah dimurnikan, banyak metode yang sesuai untuk mengubah DNA asing ke dalam sel, tersedia untuk modifikasi pasca-translasi (Clark & Pazdernik, 2016; Demain & Vaishnav, 2009). Namun, sel ragi juga memiliki masalah yang melibatkan hasil ekspresi protein yang rendah, karena

kurangnya plasmid pada ekspresi dalam bioreaktor besar, proses glikosilasi mengeluarkan banyak residu gula dan biaya tinggi untuk media kultur (Demain & Vaishnav, 2009; Peng Y, He Y, Wu Z, & C, 2014).

d. Sel Mamalia

Ekspresi mamalia yang dapat menemukan kesesuaian dan efisiensi untuk pemrosesan, memberi sinyal untuk sintesis, dan modifikasi pasca-translasi yang tepat. Selain itu, sel mamalia adalah ekspresi sistem yang paling mirip dengan glikosilasi manusia (Demain & Vaishnav, 2009; Nelson dkk., 2008). Sel mamalia sering digunakan untuk memproduksi protein rekombinan karena modifikasi pasca translasi yang tepat, termasuk melipat dan melampirkan gugus hidroksil glikan, fosfor, tirosin, treonin, dan serin. Selain itu, sel mamalia dapat memproduksi dalam kapasitas tinggi hingga 20-60 pg/sel/hari (Demain & Vaishnav, 2009). Namun, ekspresi pada sel mamalia memiliki beberapa kekurangan, termasuk sekresi yang kurang, biaya tinggi, dan kontaminasi (Clark & Pazdernik, 2016; Cooper dkk., 2015; Dalton & Barton, 2014; Demain & Vaishnav, 2009; Nelson dkk., 2008).

e. Sel Serangga

Sel serangga mampu mengekspresikan modifikasi pasca- translasi yang kompleks karena sel serangga memiliki mesin untuk melipat protein mamalia. Ekspresi pada sel serangga secara luas menggunakan vektor baculovirus dan virus polihedrosis (*Autographa californica*). Virus polyhedrosis melibatkan DNA untai ganda melingkar yang pada awalnya bersifat patogenik untuk sel lepidopteran. Penggunaan sel serangga berbantuan baculovirus untuk protein rekombinan memiliki banyak keuntungan seperti

modifikasi pasca-translasi yang tepat dan pembelahan peptida sinyal, proteolitik yang tepat, sesuai dengan protein pelipat dengan pembentukan ikatan S-S, dapat diukur, dan fleksibel. Ekspresi protein rekombinan lebih dari 30% protein sel (Demain & Vaishnav, 2009; Luckow & Summers, 1998). Namun, kekurangan dari ekspresi pada sel serangga adalah glikosilasi yang tidak tepat, tingkat ekspresi yang rendah, protein yang tidak terlipat dengan baik, dan terbentuknya agregat yang terperangkap di dalam sel (Dalton & Barton, 2014; Demain & Vaishnav, 2009; Peng Y dkk., 2014).

2. Sistem Produksi Protein Pada Tanaman

Tanaman adalah platform terbaru yang dikembangkan untuk produksi protein rekombinan. Keuntungan menggunakan tanaman adalah biaya rendah, akumulasi tingkat tinggi, menghasilkan protein kompleks, mudah, dan lebih murah untuk peningkatan skala, modifikasi pasca-translasi (37). Selain itu, kontaminasi patogen yang rendah, media pertumbuhan, sistem pertanian (air, cahaya, dan mineral) (Demain & Vaishnav, 2009; Gerasimova, Smirnova, Kochetov, & Shumnyi, 2016). Terdapat dua metode untuk memproduksi protein rekombinan pada tanaman, yaitu transien dan transgenik (transformasi stabil).

a. Transgenik

Transgenik adalah metode pertama yang mentransformasikan gen ke dalam genom kloroplas dengan integrasi yang stabil. Tanaman transgenik dapat diaplikasikan dengan dua metode; mentransformasikan gen yang diinginkan ke dalam virus tanaman seperti virus mosaik tembakau pada tanaman tembakau dan menyisipkan langsung ke dalam DNA tanaman. Keterbatasan dari metode ini adalah

kemungkinan adanya kontaminasi herbisida, pestisida, dan metabolit tanaman. Selain itu, metode ini juga membutuhkan waktu yang memakan waktu sekitar 12-18 bulan (Fitzgerald, 2003; Gleba dkk., 2005). Ke depan, transformasi yang stabil terkadang berekspresi rendah pada kisaran 0,01%-2% total protein terlarut (Mor, Moon, Palmer, & Mason, 2003).

b. Transient

Transien ekspresi merupakan peningkatan dari transformasi stabil yang memiliki kelebihan, seperti cepat dan mudah ditingkatkan untuk produksi. Saat ini, metode transien berkembang untuk melayani sistem cepat untuk memproduksi protein rekombinan. Selanjutnya, transien memiliki beberapa manfaat seperti sederhana, efektif, sangat terukur, aman dari kontaminasi, dan layak untuk menghasilkan protein kompleks. Di antara kelebihannya, yang paling penting adalah waktu yang dihabiskan untuk seluruh ekspresi, hanya sekitar 2-12 hari. Beberapa tanaman telah dikembangkan untuk mengekspresikan protein rekombinan, antara lain alfalfa, kedelai, selada, kentang, bayam, arabidopsis, dan tembakau (Cao dkk., 2017; Gerasimova dkk., 2016). Tembakau memiliki manfaat yang signifikan, termasuk protokol transformasi yang mapan, ekspresi hasil tinggi, aksesibilitas untuk meningkatkan produksi, makanan non-konsumsi, pertumbuhan kapan saja (Karg et al., 2009; Twyman dkk., 2003). Mengenai beberapa spesies *Nicotiana*, *Nicotiana benthamiana* adalah spesies yang paling berguna untuk ekspresi sementara untuk menghasilkan protein rekombinan.

3. Modifikasi Pasca-Penerjemahan

Modifikasi pasca-translasi (PTM) adalah konformasi kimiawi yang terjadi pada residu asam amino setelah proses translasi. Modifikasi pasca-translasi dikatalisis oleh enzim seperti glikosiltransferase dan glikosidase. Modifikasi pasca-translasi banyak terjadi pada sistem eukariotik dan jarang ditemukan pada sel prokariotik (El-Battari dkk., 2003). PTM melibatkan reaksi kovalen melalui proses pembelahan, modifikasi atau penambahan gugus asam amino yang dapat mengubah karakter protein. Aktivitas protein, lokalisasi, pergantian, dan interaksi dapat dikontrol oleh PTM (Mann & Jensen, 2003).

Aktivitas protein tidak hanya dikontrol oleh biosintesis dan degradasi, tetapi juga oleh pemrosesan kovalen, termasuk modifikasi pasca-translasi dan mengatur stabilitas, pelipatan, γ -karboksilasi, dan glikosilasi protein. Fungsi ini dapat ditingkatkan dengan melampirkan tautan kovalen ke gugus baru, seperti fosfat, gugus metil, dan asetat (Deribe, Pawson, & Dikic, 2010; Houdebine, 2009). PTM telah terbukti memiliki fungsi untuk mengaktifkan, bertahan hidup, berkembang biak, berdiferensiasi, dan bermigrasi dari sel (J. Liu, Qian, & Cao, 2016).

a. Glikosilasi

Glikosilasi yang paling sering muncul untuk modifikasi pasca-translasi. Glikosilasi adalah penempelan glikosil (glukosa) pada gugus hidroksil atau gugus fungsi akseptor glikosil. Glikosilasi berdampak pada stabilitas, imunogenisitas, dan aktivitas biologis (Walsh & Jefferis, 2006). Beberapa biofarmasi telah disetujui untuk terapi klinis. Mereka diproduksi dengan membutuhkan glikosilasi dalam sistem eukariotik. Dalam sel eukariotik, disekresikan 1-2% dari protein yang dikodekan manusia yang dapat terhubung

dengan glikosilasi N- atau O- linked (Walsh & Jefferis, 2006). Glikosilasi dibagi menjadi dua kelompok: Glikosilasi oksigen (O) dan glikosilasi nitrogen (N).

Oligosakarida akan dilekatkan melalui urutan konsensus serin/treonin (O-linked) dan Asn-X-Ser/Thr untuk glikosilasi N-linked (Chen dkk., 2017; Higel, Seidl, Sorgel, & Friess, 2016; Walsh & Jefferis, 2006). N- Glikosilasi salah satu modifikasi kritis pasca translasi yang berdampak pada pengaturan fungsi dan farmakokinetik (Chen dkk., 2017; Higel dkk., 2016). N-glikosilasi struktur antibodi dapat mempengaruhi stabilitas, fungsi dan farmakokinetik dan N-glikosilasi (N-oligosakarida) meningkatkan stabilitas dan fungsi transmembran pada permukaan mukosa (Higel et al., 2016; Taniguchi dkk., 2017; Walsh & Jefferis, 2006).

b. Fosforilasi

Proses fosforilasi adalah dengan melampirkan gugus fosfat ke rantai samping asam amino dalam protein. Situs urutan umumnya terjadi pada serin, treonin, dan tirosin. Fosforilasi dikelola oleh reaksi silang protein kinase dan fosfatase dan memainkan peran penting dalam proses seluler yang memengaruhi komunikasi dan koordinasi sel (Deribe dkk., 2010). Terfosforilasi oleh tirosin terutama dilakukan untuk mengendalikan diferensiasi dan proliferasi melalui pengikatan pada reseptor transmembran (Deribe dkk., 2010; Ullrich & Schlessinger, 1990).

c. Metilasi

Metilasi adalah proses konjugasi metil ke situs lisin atau arginin. Modifikasi ini dapat mengubah struktur kromatin dan mempengaruhi perekrutan protein nonhistone. Metilasi memiliki fungsi untuk mengatur aktivitas p53. Muatan negatif

atau positif sesuai dengan situs dan tingkat metilasi (Kirmizis dkk., 2007; Kouzarides, 2007).

d. Ubiquitination

Ubiquitination adalah PTM yang unik karena protein kecil yang melekat dan dimodifikasi seperti pengubah seperti ubiquitin kecil (SUMO) dan protein seperti ubiquitin lainnya (UBL) (Deribe et al., 2010). Melampirkan ubiquitin melalui Lys63 memiliki fungsi untuk mengobati reseptor tumor necrosis factor- α (TNFR) dan DDR. Metionin-ubiquitin diindikasikan dapat mengaktifkan reseptor NF- κ B dan TNF α (Rahighi dkk., 2009; Tokunaga dkk., 2009).

e. Hidroksilasi

Hidroksilasi adalah PTM yang paling sering ditemukan pada residu prolin dan lisin. Proses hidroksilasi dengan menambahkan gugus hidroksil merupakan modifikasi umum yang menghasilkan protein dan mesin penginderaan oksigen seluler (Deribe dkk., 2010; Kaelin, 2005).

f. Asetilasi

Asetilasi adalah proses dengan melampirkan gugus asil ke asam amino asparagin, glutamin, atau lisin. Gugus asetil menyisip melalui residu lisin ke dalam asam amino, dan muatannya bersifat netral yang mengubah aktivitas biologis. Asetilasi oleh histon pada ekor N-terminal mempengaruhi ekspresi gen (Deribe dkk., 2010; Strahl & Allis, 2000).

4. Deteksi Protein

Deteksi protein rekombinan diperlukan untuk mengidentifikasi keberhasilan ekspresi. Western blot dan sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) adalah metode yang

paling berguna untuk mendeteksi protein rekombinan. Prinsip umum dari metode ini adalah memisahkan protein berdasarkan muatannya dan memindahkan protein secara elektro ke membran. Metode ini tepat untuk memisahkan protein dalam kisaran berat molekul sekitar 10-200 kDa (Osborne & Brooks, 2006).

a. SDS-Page

SDS-PAGE adalah memigrasikan protein terkait muatan molekul dalam gel matriks dengan elektroforesis. Dengan Teknik ini bergantung pada berat molekul. SDS-PAGE dapat diterapkan dalam kondisi pereduksi dan non-pereduksi. Kondisi reduksi mengandung agen pereduksi yang memisahkan ikatan disulfida intrakain. Dengan pemanasan, protein akan terjadi denaturasi dan kemudian menyebabkan protein terbentang (linier), kemudian dilapisi oleh muatan negatif ion SDS.

Gel poliakrilamida terdiri dari dua lapisan, yaitu gel susun dan gel pemisah (gel utama). Gel susun biasanya menggunakan 3% (w/v) akrilamida, yang memiliki jaring-jaring yang longgar dan memungkinkan semua massa protein bermigrasi. Kemudian, protein akan tertahan pada lapisan yang sama sebelum bermigrasi ke dalam gel pemisah. Di sisi lain, persentase akrilamida bergantung pada berat molekul protein. Persentase akrilamida 5-7,5% [b/v] memiliki pori-pori yang besar, sehingga sesuai untuk protein dengan berat molekul yang cukup besar. Sebaliknya, protein kecil adalah persentase akrilamida sekitar 12,5-15% [b/v]. (Osborne & Brooks, 2006).

b. Western Blot

Western blotting dimulai dengan memindahkan sampel ke dalam membran dan diperiksa dengan antibodi spesifik. Ada tiga jenis membran yang biasa digunakan untuk blotting, yaitu nitroselulosa, nilon, dan polivinilidena fluorida. Metode pemindahan dapat dibagi menjadi dua jenis; pemindahan basah (tank blotting) dan pemindahan semidry. Kedua metode ini berguna, tetapi transfer semidry lebih cepat dan lebih mudah. Setelah protein dimigrasikan ke membran, protein tersebut dapat dikembangkan dengan antibodi. Antibodi memiliki peluang untuk mengikat enzim lobak peroksidase, yang dibelah oleh agen chemiluminescent dan dideteksi oleh paparan fotografi. Pita sinyal sebanding dengan jumlah protein; oleh karena itu, dapat diandalkan untuk mengukur kuantitas protein.

Dengan metode ini, protein secara langsung berikatan dengan antibodi. Metode pelabelan langsung sederhana, lebih mudah, dan lebih cepat. Antibodi yang digunakan terhubung ke enzim pelapor horseradish peroksidase (HRP), yang dibelah oleh agen chemiluminescent dan diukur dengan pencahayaan dalam film fotografi. HRP dapat dikonjugasikan dengan substrat kromogenik (diaminobenzidin dan hidrogen peroksida, untuk menghasilkan pita berwarna cokelat tua pada latar belakang putih). Selain itu, bahkan dalam konsentrasi protein yang rendah, sensitivitasnya dapat ditingkatkan dengan mengkonjugasikannya dengan chemiluminescence yang ditingkatkan (Osborne & Brooks, 2006; Schneider, 2013).

c. Pemurnian Protein

Kromatografi adalah metode umum untuk pemurnian preparatif protein rekombinan. Metode pemurnian tergantung pada sifat-sifat target protein atau zat lain (Anonim, 2000; Burgess, 2009).

Tabel 2, Metode Pemurnian Protein Rekombinan

Metode	Sifat-Sifat Protein
Kromatografi afinitas	Pengenalan ligan spesifik (bispesifikatau nonspesifik)
Kromatografi pertukaran ion	Muatan protein
Filterasi gel	Ukuran protein
Kromatografi afinitas ion logam terimobilisasi	Pengikatan ion logam

d. Kromatografi Afinitas

Kromatografi afinitas (AC) memisahkan protein sesuai dengan interaksi reversibel dari ligan spesifik dalam matriks kromatografi. Kromatografi afinitas menawarkan resolusi tinggi dan selektif. Protein target adalah pengikatan komplementer yang dapat dibalik terhadap ligan. Percobaan dilakukan dalam kondisi yang dapat mendukung pengikatan pada ligan tertentu. Protein non-spesifik dicuci. Proses elusi dilakukan secara kompetitif ligan dengan mengubah pH, kekuatan ion, atau polaritas (Anonim, 2000; Burgess, 2009).

e. Kromatografi Pertukaran ion

Kromatografi penukar ion (IEX) memurnikan protein tergantung pada reaksi reversibel antara muatan protein dan

muatan yang berlawanan dari medium kromatografi. Partikel kromatografi penukar ion sesuai untuk diterapkan pada laju alir yang tinggi karena kinetika pengikatan yang cepat dan kaku. Umumnya, proses elusi menggunakan buffer yang meningkatkan konsentrasi garam atau pH secara gradien (Anonim, 2000; Burgess, 2009).

f. Filtrasi Gel

Filtrasi gel (GF) disebut kromatografi pengecualian ukuran. Filtrasi gel merupakan metode yang sederhana, dan dalam kondisi ringan yang memungkinkan pemisahan berdasarkan ukuran molekul. Selain itu, area sampel diperluas pada aliran yang dipikirkan dalam kolom; akibatnya, sampel akan diencerkan. Dalam persiapan filtrasi gel, resolusi maksimum dapat dikumpulkan sekitar 0,5-2% dari volume kolom, meskipun lebih dari 5% diperbolehkan untuk pemisahan. Peningkatan kapasitas terkonsentrasi (kurang dari 70mg / ml) sebelum melakukan filtrasi gel. Viskositas yang tinggi mempengaruhi pelebaran pita dan mengurangi resolusi. Protein dielusi dengan larutan isokratik (buffer tunggal, tanpa gradien). Metode ini sesuai dengan sampel yang memiliki karakteristik seperti pH yang luas dan protein ionik. Media yang biasa digunakan, seperti co-factor, stabilizer, deterjen, urea, dan guanidin (Anonim, 2000; Burgess, 2009).

g. Kromatografi Afinitas ion Logam Termobilisasi

Kromatografi afinitas ion logam termobilisasi (IMAC) sesuai dengan reaksi antara histidin (lainnya: triptofan dan sistein) protein dan ion logam divalen, misalnya, Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} melalui ligan pengkelat. Protein yang ditandai dengan histidin memiliki afinitas tinggi karena terdiri dari beberapa residu histidin sekitar 6-10. Konsentrasi

imidazol yang rendah adalah kondisi kesetimbangan kolom. Ion imidazol yang tidak bergerak dapat melawan ligan. Oleh karena itu, sampel harus menyesuaikan dengan konsentrasi imidazol yang sama sebelum dimasukkan ke dalam kolom. Histidin dari protein yang menempel pada kolom dan menggantikan ligan imidazol. Protein non-spesifik dapat dipotong dengan konsentrasi imidazol yang rendah. Buffer elusi dapat digunakan satu langkah atau elusi gradien imidazol (100 hingga 500 mM) (Anonim, 2000; Burgess, 2009).

5. Produksi Dentin Matriks Protein – 1 (DMP1)

a. Karakteristik dari DMP1

Gen Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) diisolasi dari manusia, tikus, dan tikus (Fisher dkk., 2001; Karen dkk., 1997; Macdougall dkk., 2009; Seetha dkk., 2000). Urutan cDNA DMP1 telah menunjukkan bahwa gen manusia melibatkan kerangka pembacaan terbuka 1539 bp (Karen et al., 1997). CDNA dikategorikan menjadi 6 ekson yang terbagi menjadi 5 ekson kecil dengan ukuran 33 sampai 104 bp dan 6 ekson besar yang terdiri dari 80% informasi genetik. Ekson 2 berhubungan dengan asam amino untuk peptida sinyal dan ekson 5 dengan ukuran 45 bp akan disambung pada beberapa spesies. Intron 1 adalah bagian terbesar dengan ukuran 3791 kb sampai ~6 kb dan membutuhkan ekspresi khusus dari DMP1. Intron lainnya kecil, sekitar 162-189 bp ((Ling dkk., 2005; Lu dkk., 2007).

rDMP1 pertama kali diisolasi dari dentin tikus. Itu terdeteksi oleh immunoblotting dan menunjukkan panjang penuh 53 kDa tanpa urutan modifikasi (George et al., 1993) . Sebaliknya, modifikasi rDMP1 diindikasikan sekitar 160-210

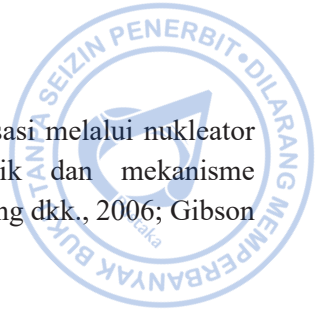
kDa setelah analisis immunoblotting dengan antibodi anti-DMP1 (Butler dkk., 2009). Selain itu, DMP1 tikus (mDMP1) dianalisis dengan menggunakan antibodi anti-tikus DMP1 dan menunjukkan ukuran 130–150 kDa (Terasawa dkk., 2004). G glikosilasi tikus DMP1 telah ditunjukkan ukuran 89–180 kDa (Sun dkk., 2015). Berat molekul DMP1 yang berbeda disebabkan oleh modifikasi pasca-translasi, yang dapat meningkatkan berat molekul protein (Terasawa dkk., 2004). Fusi rekombinan rDMP1-GST dalam *E. coli* diproduksi dan dilakukan sekitar 90–95 kDa dalam analisis SDS-PAGE (Srinivasan dkk., 2009). Selanjutnya, DMP1 tikus rekombinan diekspresikan dalam bibit gandum atau *E. coli* yang terdeteksi dengan menggunakan immunoblotting dan diperiksa dengan DMP1 anti-tikus (Terasawa dkk., 2004).

Protein full-length DMP1 diharapkan sebagai inisiator untuk memulai fragmentasi bentuk fungsional (Qin dkk., 2004). Fragmen DMP1 merupakan fragmen pendek yang awalnya diisolasi dari tulang dan dentin. 37 kDa (residu asam amino 1-334) dan 57 kDa masing-masing berasal dari terminal NH₂ dan terminal COOH (Gajjeraman dkk, 2007). Pada tulang, DMP1 muncul dalam 4 bentuk, yaitu 57 kDa C-terminal, 37 kDa N-terminal core protein, glycosylated N-terminal core protein (DMP1-PG), dan full-length DMP1 (Qin dkk., 2007; Maciejewska dkk., 2009). Proteolitik produk pembelahan DMP1 umumnya adalah fragmen N-terminal dan C-terminal. Namun, DMP1 tikus dibagi menjadi tiga domain potensial untuk pembelahan.

Wilayah pertama disebut GA-domain di Ser⁷⁴, yang terhubung ke rantai glikosaminoglikan (GAG). Wilayah kedua adalah Val¹⁵⁷-Gly¹⁸⁴ tikus yang mengandung situs

pembelahan primer ikatan peptida terminal NH₂ dari Asp¹⁸¹. Wilayah ketiga sesuai dengan Arg⁴⁴⁹-Tyr⁴⁷³, dari tikus DMP1 (Qin dkk., 2007; Feng dkk., 2006; Qin et al., 2003). Selain itu, analisis fosfat dari DMP1 menunjukkan bahwa terdapat 12 dan 41 fosfat dalam fragmen 37 dan 57 kDa yang menyepakati fosforilasi protein. Akibatnya, DMP1 menjadi protein asam dengan titik isoelektrik 4,15 (Deshpande et al., 2011; Qin dkk., 2003). DMP1 mengandung 473 asam amino yang dominan melibatkan residu asam amino seperti serin, asam glutamat, dan asam aspartat (George A dkk., 1993).

Residu DMP1 yang bersifat asam menyebabkan berfungsi sebagai mineralisasi dalam tulang. Studi sebelumnya melaporkan bahwa DMP1 mengandung empat domain asam seperti ESNS (376–380), ESQS (386–390), DSQDS (431–435), QESQSEQDS (414–422) yang dapat mengontrol kristalisasi (G. He dkk., 2003). Selain itu, DMP1 juga terdiri dari motif ASARM (serin asam dan motif kaya aspartat). Motif ASARM memiliki efek penting dalam mengatur aktivitas protein (Rowe dkk., 2004; Staines dkk., 2012). Dalam urutan DMP1, motif ASARM terlokalisasi di fragmen terminal COOH (Martin dkk., 2008). Di sisi lain, DMP1 mengandung domain RGD (arginine-glycine-aspartic acid) yang penting, yang mendorong pengikatan sel ke sel dan target spesifik jaringan dan kemudian mengaktifkan jalur pensinyalan (Butler dkk., 2009; Eapen dkk., Domain RGD berada di tengah fragmen 57 kDa (Qin et al., 2004; Qin dkk., 2003). Residu dan domain protein DMP1 berfungsi multifungsi sebagai mineralisasi pada tulang dan gigi.



b. Fungsi DMP1

DMP1 dapat mengatur mineralisasi melalui nukleator hidroksiapatit, diferensiasi osteogenik dan mekanisme homeostasis fosfat (Qin dkk., 2007; Feng dkk., 2006; Gibson dkk., 2013; Nishino dkk., 2017).

c. Pembentukan Hidroksiapatit

DMP1 melakukan regulasi pembentukan hidroksiapatit (HA) dan pertumbuhan kristal (Tartaix dkk., 2004) . DMP1 dapat menginisiasi pembentukan hidroksiapatit dengan multiproses, yang dimulai dengan mengikat ion kalsium, menghasilkan deposisi mineral, mengendapkan nukleat amorf kalsium fosfat, dan membentuk nanokristal. Setelah itu, ini meluas dan bersatu menjadi kristal mikro yang memanjang ke arah sumbu-C (He, 2003).

Formasi kristal kalsium fosfat berada di bawah pengaturan domain asam DMP1. Dimana situs asam rakitan sendiri ke templat lembar beta diinginkan untuk menginduksi biomineral. Supramolekul DMP1 merangsang nukleasi kristal. Kemudian, ia mengatur langkah transisi pengendapan kalsium fosfat menjadi karbonat apatit (He dkk., 2005; He dkk., 2003) . Panjang penuh dan C-terminal DMP1 tikus asli dapat meningkatkan nukleasi hidroksiapatit dengan keberadaan kolagen I (Gajjeraman dkk., 2007; Tartaix dkk., 2004) . Selain itu, DMP1 memiliki dua domain gugus asam yang dapat berinteraksi dengan kolagen tipe I di wilayah N-telopectida, yang mengindikasikan pembentukan fibrogenesis kolagen (George dkk., 2008; He dkk., 2003) .

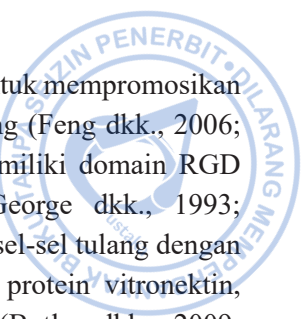
Domainnya adalah DSESSEEDR (249-357) di terminal C dan SEENRSDSDSQDSSR (424-437) di akhir DMP1 (He et

al., 2008). Berdasarkan studi mutagenesis yang diarahkan ke situs, telah dikonfirmasi tentang domain perlekatan kolagen. Studi *in vitro*, DMP1 meningkatkan pembentukan fibril kolagen dan meningkatkan diameter fibril kolagen. Selain itu, DMP1 yang menempel pada situs kolagen diindikasikan sebagai endapan kalsium dan hidroksiapatit (He dkk., 2003; He dkk., 2004). Peptida lain dari DMP1 DSESSEEDR-Ahx-ESQES (1,726 kDa) dan DSESSEEDR-Ahx-QESQSEQDS (2,185) telah dilaporkan. Domain-domain ini mengikat secara khusus ke tempat pengikatan kolagen dan pengikatan kalsium. Mereka telah ditunjukkan regulasi pengendapan mineral dan pembentukan hidroksiapatit saat paparan fisiologis terhadap kalsium dan fosfat (Padovano dkk., 2015).

Di sisi lain, 57 kDa COOH-terminal menunjukkan aktivitas nukleator hidroksiapatit dan mengendalikan sel diferensiasi dengan menargetkan dan mengikat antara nukleus atau integrin permukaan sel seperti reseptor CD44 (Gajjerman dkk., 2007). Pengikatan antara DMP1 dan reseptor permukaan sel GRP78 sangat menarik karena aksi melindungi stres, penipisan ER Ca^{2+} dan agregasi protein unglikosilasi (Eapen et al., 2010; Lien, Kung, Lu, Jeng, & Chau, 2008). Keberadaan DMP1 dapat meningkatkan self-assembly kalsium menjadi pembentuk filamen (He dkk., 2004).

d. Deferensiasi Osteogenesis

DMP1 merangsang migrasi, regulasi, diferensiasi dentin, dan sel tulang (Widbiller dkk., 2018). DMP1 menginduksi gen penanda osteogenik dalam nukleus, seperti alkaline phosphate (ALP) dan faktor transkripsi terkait runt 2 (Runx2), dan osteocalcin (Gulseren dkk., 2015; He dkk., 2005; Eapen dkk., 2010). Mereka mengatur mineralisasi



melalui mekanisme lokal dan sistemik untuk mempromosikan jalur pensinyalan dalam regenerasi tulang (Feng dkk., 2006; Qin dkk., 2004). Selain itu, DMP1 memiliki domain RGD untuk mempromosikan adhesi sel (George dkk., 1993; Terasawa dkk., 2004) dan membedakan sel-sel tulang dengan mengikat kolagen IV, fibronektin, dan protein vitronektin, yang mengaktifkan jalur pensinyalan (Butler dkk., 2009; George dkk., 1993; Terasawa dkk., 2004).

Selanjutnya, DMP1 dapat berinteraksi dengan reseptor $\alpha\beta$ v3 dan CD44 untuk mengontrol diferensiasi sel (Gulseren dkk., 2015; Srinivasan dkk., 2009) . Selanjutnya, DMP1 dapat mengontrol diferensiasi sel odontoblas dan osteoblas (Lu dkk., 2007) . DMP1 menunjukkan diferensiasi sel induk endometrium. Efek osteogenik juga telah ditunjukkan pada sel induk folikel gigi (DFSCs) dkk., 2015) . Dengan demikian, DMP1 rekombinan dalam *E. coli* dapat mendorong diferensiasi preosteoblas calvaria tikus (MC3T3-E1) dan sel C3H10T1/2 dengan menginduksi gen run2x dan osteokalsin. Hasil ini juga menegaskan efek diferensiasi osteogenik dari DMP1 melalui pengikatan RGD-integrin untuk mengaktifkan jalur signal-regulated kinase (ERK)-MAPK (Eapen dkk, 2010; Eapen dkk., 2011).

Selanjutnya, diferensiasi osteogenik sel dapat diatur melalui pensinyalan kalsium. Eapen et al. mengusulkan bahwa DMP1 dapat meningkatkan kalsium dalam sistolik yang memfasilitasi hilir stres seluler. Kondisi ini melibatkan pengaturan kalsium dan mengaktifkan diferensiasi osteoblas terkait p38 MAPK yang diinduksi stres. Selain itu, pengikatan antara GRP78 dan DMP1 menginduksi pelepasan dan akumulasi $ER2Ca^{2+}$, kemudian mengaktifkan jalur MAPKs

p38. Selanjutnya, aktivasi p38 MAPK mentranslokasi nukleus untuk mengatur transkripsi modulator diferensiasi sel, seperti Run2x pada perkembangan embrionik (Eapen dkk., 2010) .

e. Homeostatis Fosfat

Temuan baru DMP1 dapat mengontrol homeostasis anorganik fosfat (Pi) melalui Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) (Feng dkk., 2006; Lorenz-Depiereux dkk., 2006) . FGF23 adalah hormon yang terutama disekresikan oleh osteosit dan osteoblas di tulang. Ini ditargetkan di ginjal dan memperluas fungsi organ endokrin tulang dalam regulasi homeostatis Pi (Gattineni et al., 2009) . Hemostatik fosfat menunjukkan kematangan osteoblas dan osteosit. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa defisiensi DMP1 menyebabkan peningkatan mRNA FGF23 dalam osteosit (Feng dkk., 2006) . Terkait dengan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa FGF 23 meningkat pada osteosit nol DMP1 yang mengarah ke homeostasis Pi di tulang (Lin dkk., 2015; Quarles, 2012) . Rupanya, peningkatan tajam ini kemungkinan besar disebabkan oleh cacat pada pematangan osteoblas menjadi osteosit. Terminal-C 57 kDa memainkan peran kunci dalam mempertahankan homeostasis fosfat melalui pengaturan ekspresi FGF23 dalam tulang (Lu dkk., 2011) .

Di sisi lain, studi tikus nol DMP1 dan mutasi DMP1 pada pasien menunjukkan bahwa FGF23 secara signifikan diregulasi dalam osteosit, yang dilepaskan ke dalam sirkulasi melalui hubungan antara osteosit dan pembuluh darah, yang menyebabkan peningkatan FGF23 dalam serum dan hipofosfatemia berikutnya. Secara khusus, hibridisasi in situ (mengukur kadar mRNA) atau imunohistokimia (mengukur

kadar protein), mengungkapkan bahwa kadar FGF23 pada osteosit kontrol jauh lebih rendah daripada pada osteoblas, menunjukkan mekanisme pengaturan diferensial untuk FGF23 dalam sel tulang sehat versus kondisi penyakit. Penemuan peningkatan kadar FGF23 dalam osteosit nol DMP1 menunjukkan bahwa tulang adalah organ endokrin yang mengatur homeostasis fosfat (Lin dkk., 2015; Feng dkk., 2006).

Berdasarkan fungsi DMP1 yang sangat berpotensi menginduksi atau mempromosikan sel-sel untuk pembentukan tulang. Oleh karena itu, DMP1 dapat digunakan untuk mengobati penyakit tulang yang disebabkan oleh kerusakan atau kecelakaan seperti aplikasi pada rekayasa jaringan tulang. Akibatnya, DMP1 perlu diproduksi untuk mengembangkan rekayasa jaringan.

f. Sumber DMP1

Sebagian besar DMP1 diisolasi dari hewan atau manusia. Namun, jumlah DMP1 yang terbatas dalam jaringan membuatnya sulit untuk diisolasi. Selain itu, DMP1 tidak mudah dimurnikan dari NCP lain di dalam jaringan. Namun, penelitian sebelumnya melaporkan ekspresi rDMP1 rekombinan pada *E. coli* (Srinivasan dkk., 2009). Oleh karena itu, teknik protein rekombinan dapat menjadi solusi untuk menghasilkan protein hDMP1 dalam sistem yang baik.

g. Bahan

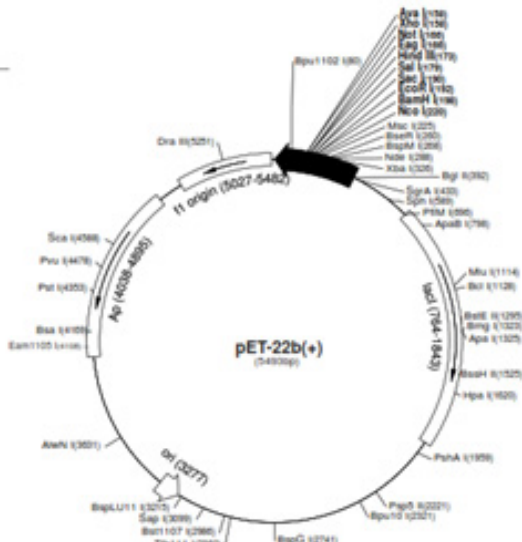
(1) Gen

Urutan asam amino hDMP1 (Gene ID: 1758) dengan tag 8xHis pada C-terminus disintesis oleh Bioneer Corp (Bioneer Corp, Korea Selatan).

and BioLabs, AS)
and BioLabs, AS)
BioLabs, USA)
(S)
(S)

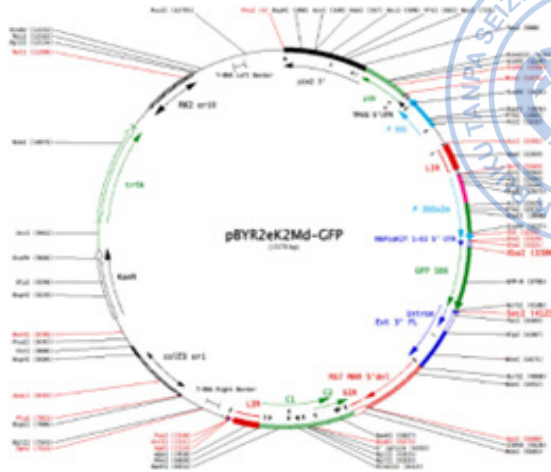
T4-DNA Ligase (Promega, AS)

pET-22 b(+) digunakan untuk ekspresi dalam sistem bakteri (*E. coli* strain Rosetta).



Gambar 1. pET-22 b(+) vektor

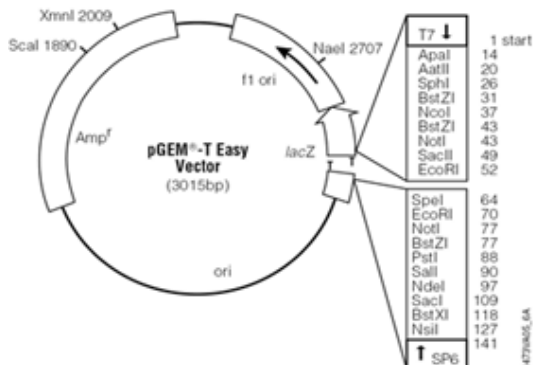
Vektor pBYR2e (bean yellow dwarf virus) digunakan untuk ekspresi dalam *N. benthamiana*.



Gambar 2. Vektor pBYR2e

(5) pGEM -T Vektor

Vektor pEM -T digunakan untuk mengkloning produk PCR. Vektor pGEM -T nomor salinan tinggi mengandung promotor T7 dan SP6 RNA polimerase yang mengapit daerah kloning ganda dalam daerah pengkodean peptida α dari enzim β -galactosidase.



Gambar 3. pGEM -T vektor



(6) Kit Biologi Molekuler

Ekstraksi Plasmid (Bioneer Corp, Korea Selatan)

Gel elusi (Bioneer Corp, Korea Selatan)

DMP1 ELISA Kit (ThermoFisher Scientific, USA)

(7) Kimia s

Akrilamida 30% (Himedia, India), Ampisilin (Reagen ITW, Jerman), kanamisin (Bio basic, AS), gentamisin (Reagen ITW, Jerman), rifampisin (Thermo Fisher Scientific, AS), 2-(N-morpholino), asam etanasulfonat (MES) (Reagen ITW, Jerman), magnesium sulfat (Merck, USA), tris (Vivantis, Malaysia), natrium chorid, imidazole (Affymetrix, Jerman), amonium sulfat (Merck, USA), filter jarum suntik 0,45 μm (Sigma-Aldrich, Jerman), kolom afinitas Ni-NTA (Qiagen GmbH, Jerman), sodium dodecyl sulphate (SDS) (Himedia, India), β - mercaptoethanol, bromophenol blue (Sigma-Aldrich, USA), coomassie Brilliant Blue R250 (Reagen ITW, Jerman), metanol (Honeywell, AS), asam nitrat (Qrec, Selandia Baru), amonium persulfat (Merck, AS), membran nitroselulosa (ThermoFisher Scientific, AS), Enhanced Chemiluminescence (ECL) (GE Healthcare, UK), MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (USB Corporation, AS), glisin, Dimetil sulfoksida (DMSO) (Term oFisher Scientific, USA), dexamethasone, ascorbic acid, alizarin red S staining solution (Sigma-Aldrich, St. Louis), gliserol, isopropyl-bD-thiogalactopyranoside (IPTG) (Bio Basic, Canada), DNA- leadder (Vivantis, Malaisia), standar protein (Bio-rad, AS), hDMP1 komersial (R&D systems Inc, AS),

filter jarum suntik 0,45 mm (Sigma-Aldrich, Jerman),
Coomassie Brilliant Blue R250 (ITW Reagents, Jerman).

(8) Bakteri

Strain *E. coli* DH10B

E. coli Rosetta (DE3)

Agrobacterium tumefaciens strain GV3101

(9) Antibodi

HRP-conjugated goat anti-His antibody (Abcam, UK)

Antibodi DMP1 anti-manusia kelinci (Abcam, UK)

Antibodi IgG anti-kelinci kambing terkonjugasi HRP
(Jackson Immuno Research, USA).

10) Perangkat Lunak

GambarJ

GraphPad Prism 7.0

Expasi

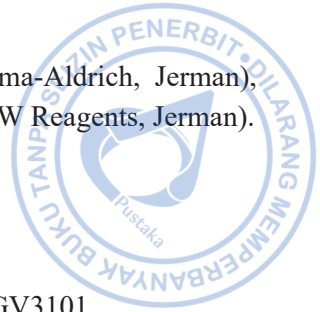
Jarum timbul

11) Tembakau (*Nicotiana benthamiana*)

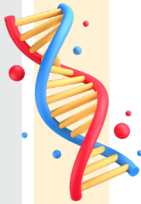
N. benthamiana ditanam di tanah selama kurang lebih 10 hari. Setelah tumbuh, tanaman tembakau dipindahkan ke dalam pot. Tanaman tembakau ditanam pada suhu kamar (28° C) di bawah cahaya putih. Tembakau disiram 2-3 kali seminggu. Tanaman tembakau akan siap digunakan setelah 6-8 minggu.

12) hPDLSC_ (Sel Induk Ligamen Periodontal Manusia)

Sel-sel ligamen periodontal dibentuk dari jaringan ligamen periodontal yang diperoleh dari impaksi molar bawah yang diekstraksi untuk alasan ortodontik



di Departemen Bedah, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Chulalongkorn. Penelitian ini telah disetujui oleh dewan etika subjek manusia Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Chulalongkorn, dan dilakukan pada Deklarasi Helsinki tahun 1975, sebagaimana direvisi pada tahun 2013. Berdasarkan laporan sebelumnya (Osathanon dkk., 2013), hPDLSC adalah terpencil. Kemudian, sel-sel tersebut dibiakkan dan tumbuh dalam medium Dulbecco yang dimodifikasi Eagle's yang dilengkapi dengan 10% serum janin sapi, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 ug/ml streptomisin dan 5 ug/ml amfoterisin B. Setelah pertemuan, sel dipisahkan dengan 0,25% trypsin-EDTA dan disubkultur dengan perbandingan 1:3. Sel-sel dari bagian ketiga hingga kelima digunakan dalam percobaan.



METODE



1. Kloning

Gen hDMP1 diamplifikasi dengan primer (F:5' CTCGAGATCTAGAATGGCTAACA-AGCACCTCTCATTGTCTCTCTTCC 3' dan R: 5' GAGCTCTTAATGATGGTGATGGTG-GTGATGATGATAGCCGTCTTGGCAGTC 3'). Jadi, dimasukkan ke dalam gel agarosa 1%. Ukuran yang diharapkan sekitar 1654 bp dipotong dan diencerkan dengan kit gel elusi. Selanjutnya, produk PCR diligasi dengan pGEM-T dan diubah menjadi *E. coli* DH10B. Koloni penyisipan dikultur dan diekstraksi plasmid untuk memeriksa urutannya.

a. pET22b-hDMP1

Gen hDMP1 diligasi ke dalam vektor ekspresi pET22b dengan menggunakan enzim restriksi *EcoR* I dan *Sac* I. pET22b-hDMP1 diubah menjadi *E. coli* DH10B dengan menggunakan metode kejut panas (Froger & Hall, 2007). Kemudian koloni insersi ditentukan dengan PCR dan dikulturkan pada media Luria Bertani (LB) yang ditambah dengan ampicilin 100 mg/mL pada suhu 37°C semalam. Selanjutnya pET22b-hDMP1 ditransformasikan menjadi *E. coli* Strain Rosetta dengan meng-

gunakan metode kejut panas (Froger & Hall, 2007). Koloni insersi ditentukan dengan PCR.

Tabel 3. Kondisi termosiklus untuk koloni kondisi PCR koloni

Langkah 1	Suhu	Waktu	Siklus
Denaturasi	94 °C	2 menit	1
Denaturasi	94 °C	2 detik	30
Anil	54 °C	1 mnt	
Perpanjangan	72 °C	1-3 mnt	1
Ekstensi terakhir	72 °C	7 mnt	

b. pBRY2e-hDMP1

Pengkodean hDMP1 diikat ke dalam vektor ekspresi pBYR2e dengan menggunakan enzim restriksi *Xho* I dan *Sac* I. PBYR2e-hDMP1 diubah menjadi *E. coli* DH10B dengan menggunakan metode kejut panas (Froger & Hall, 2007). Koloni terpilih ditentukan dengan PCR dan dibiakkan dalam media Luria Bertani (LB) yang ditambah kanamisin 50 mg/ml pada suhu 37°C semalam. PBYR2e-hDMP1 ditransformasikan menjadi strain *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 dengan menggunakan metode elektroporasi (Yoshihisa Oda YN & Fukuda, 2018). Bakteri ditumbuhkan pada media agar (mengandung kanamisin 50 mg/ml, gentamisin 50 mg/ml, dan rifampisin 50 mg/ml) pada suhu 28°C selama 2 hari. Kemudian, koloni insersi dipilih dengan menggunakan PCR.

2. Ekspresi dan Optimalisasi hDMP1 Rekombinan

a. *E. coli*- menghasilkan hDMP1

Bakteri *E. coli* strain Rosetta dibiakkan pada media Luria Bertani (LB) dengan pemberian ampisilin 100 mg/L pada suhu 37°C semalam. Kemudian disubkultur hingga optical density 600 nm (OD_{600}) sekitar 0,4. Kemudian ditambahkan isopropyl- β -D- thiogalactopyranoside (IPTG) untuk menginduksi ekspresi protein dengan konsentrasi akhir 0,2, 0,5, dan 1 mM. Bakteri diinkubasi pada suhu 28°C atau 37°C pada rotary shaker dengan kecepatan 200 rpm. Sel dipanen setiap 2, 4, dan 6 jam setelah induksi. Level ekspresi ditentukan dengan analisis western blot.

b. *Nicotiana Benthamiana* -memproduksi hDMP1

Koloni insersi *Agrobacterium* GV3101 dikultur pada media LB yang disuplementasi dengan kanamisin 50 mg/ml, gentamisin 50 mg/ml, dan rifampisin 50 mg/ml pada suhu 28°C semalam. Kultur bakteri dikumpulkan dengan sentrifugasi pada 4000 g selama 15 menit. Kemudian pelet disuspensi dengan buffer infiltrasi. Kultur *Agrobacterium* dengan berbagai OD (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, dan 1) diinfiltrasikan ke dalam *N. benthamiana* menggunakan vakum dengan metode transien. Daun dipanen 1, 2, 3, 4, dan 5 hari pasca infiltrasi (dpi). Level ekspresi ditentukan dengan analisis western blot.

3. Pemurnian hDMP1 Rekombinan

a. Pemurnian hDMP1 yang Diproduksi oleh *E. coli*

Kultur bakteri dikumpulkan dengan sentrifugasi pada 4.000 g selama 10 menit. Setelah itu, pelet disuspensi dengan buffer ekstraksi dan dipecah selnya dengan menggunakan

ultrasonik lisis. Larutan disentrifugasi pada 6.000 g selama 30 menit. Supernatan disaring dengan filter jarum suntik 0,45 μm dan dimuat ke kolom afinitas Ni-NTA. Selanjutnya kolom dicuci dengan washing dan dielusi dengan buffer elusi.

b. Pemurnian *N. benthamiana* -produksi hDMP1

Daun infiltrasi *N. benthamiana* dihaluskan dan diekstraksi dengan buffer Imac 5. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 30 menit. Kemudian, protein rubisco dihilangkan dengan menggunakan pengendapan dengan amonium sulfat (Burgess, 2009). Amonium sulfat ditambahkan ke dalam larutan (35%), diaduk selama 30 menit di atas es, kemudian disentrifugasi pada 4000 g selama 30 menit. Kemudian supernatan ditambahkan amonium sulfat (80%), diaduk selama 30 menit dan disentrifugasi pada 4000 g selama 30 menit. Pelet disuspensi dengan buffer ekstraksi dan disaring dengan menggunakan spuit 0,45 μm . Selanjutnya, dimuat ke kolom afinitas Ni-NTA. Kolom dicuci dengan bufer pencuci dan dielusi dengan bufer elusi.

4. Analisis SDS Page

Gel akrilamida 10% digunakan untuk memisahkan protein. Sampel disuspensi dalam kondisi reduksi buffer-Z dan dipanaskan pada suhu 95°C selama 5 menit. Sebanyak 40 μl dimasukkan ke dalam gel. Selanjutnya protein dipisahkan dengan menggunakan elektroporasi 100 volt. Protein dianalisis dengan pewarnaan dengan *Coomassie brilliant blue* selama semalam dan dilanjutkan dengan *distaining* dengan *buffer destain*. Presisi plus standar protein digunakan sebagai referensi ukuran protein (10-250 kDa).

5. Analisis Western Blot

Protein pada gel akrilamida dipindahkan ke membran nitroselulosa dengan menggunakan elektroporasi pada 100 volt selama 2 jam. Kemudian dilanjutkan dengan memblokir protein non spesifik dengan susu skim 5% dalam buffer 1xTBS. Setelah 1 jam, membran diinkubasi dengan antibodi HRP-conjugated goat anti-his dan rabbit anti-DMP1 (HRP-conjugated goat anti-rabbit) yang diencerkan dalam susu skim 3% dalam 1x TBS pada 1 : 5000. Buffer TBST sebanyak tiga kali digunakan untuk mencuci membran. Membran diperiksa dengan substrat ECL (enhanced chemiluminescence) untuk mendeteksi.

6. Kuatifikasi Protein

Ekstrak mentah dari protein hDMP1 rekombinan ditentukan dengan metode Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). hDMP1 rekombinan komersial digunakan sebagai standar dengan berbagai konsentrasi. Prosedur berdasarkan manual Kit ELISA hDMP1 (ThermoFisher Scientific, USA). Absorbansi diukur dengan menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 450 nm.

7. Protokol Pelapisan DMP1

Sebelum menguji aktivitas protein hDMP1 rekombinan, sumuran dilapisi dengan mengikuti protokol. Sumur dilapisi dengan dopamin selama 6 jam. Setelah itu, sumuran dicuci dengan menggunakan buffer PBS dan dilapisi dengan protein hDMP1 rekombinan selama satu malam. Kemudian, sebanyak 50.000 sel hPDLSCs disemaikan ke dalam masing-masing sumur. Selanjutnya, sel-sel hPDLSC diinkubasi dan dirawat untuk mengikuti protokol pengujian.

8. Uji Proliferasi

Pelat 12 sumur dilapisi dengan protein hDMP1 rekombinan (1 dan 2 μ g/ml) selama semalam. hPDLSC diunggulkan dengan kepadatan 50.000 sel per sumur dalam pelat 24 sumur. Sel-sel dikultur pada DMP1 selama 24 dan 72 jam. Sel-sel dinilai untuk vitalitas sel dengan thiazolyl blue tetrazolium bromide. Kemudian 500 μ l larutan MTT (0,5 mg/ml) ditambahkan ke dalam masing-masing well, dilanjutkan dengan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C untuk memungkinkan terbentuknya formazan. Kemudian ditambahkan 500 μ l buffer Glycine: DMSO (1:9) untuk melarutkan kristal formazan. Mengukur absorbansi dilakukan pada 570 nm dalam pembaca pelat mikro.

9. Ekspresi Osteogenik

Sumur diinkubasi dengan DMP1 (0,5, 1, dan 2 μ l /ml) semalaman. Kemudian, hPDLSC dengan kepadatan 50.000 diunggulkan ke dalam sumur dan diinkubasi selama tiga hari. Total RNA diekstraksi dengan menggunakan reagen Isol -RNA Lysis, dan 1 μ g/ml RNA per sampel diubah menjadi cDNA menggunakan kit reverse transcriptase. RT-PCR kuantitatif dilakukan menggunakan mesin reaksi berantai polimerase real-time Lightcycler Nano. Primer ALP, BMP2, CBFA1, COL1, OPN, OSX, WNT3a (Tabel 4) digunakan untuk protokol ini, dan kondisi RT-PCR diatur pada denaturasi pada 94 °C selama 10 menit, pada 60 °C selama 10 detik untuk anil, dan ekstensi pada 72 °C selama 10 detik selama 45 siklus.

Tabel 4. Primer RT-PCR untuk ekspresi gen spesifik diferensiasi

Gen	Urutan	Referensi
PUNCAK GUNUNG	F: 5' CGAGATACAAGCACTC- CCACTTC 3' R: 5' CTGTTTCAGCTCGTACTG- CATGTC 3'	NM000478.3
CBFA1	F: 5' ATGATGACACTGC- CACCTCTGA 3' R: 5' GGCTGGATAGTGCATTC- GTG 3'	NM001024630.3
COL1	F: 5' GTGCTAAAGGTGCCAAT- GGT 3' R: 5' ACCAGGTTACCGCTGT- TAC 3'	NM000088.3
OSX	F: 5' GCCAGAAGCTGT- GAAACCTC 3' R: 5' GCTGCAAGCTCTCCATA- ACC 3'	NM001300837.1
OPN	F: 5' AGGAGGAGGCAGAGCACA 3' R: 5' CTGGTATGGCACAGGT- GATG 3'	NM001040060.1
WNT3a	F: 5' CTGTTGGGCCACAGTAT- TCC 3' R: 5' GGGCATGATCTCCACG- TAGT 3'	NM033131.3
BMP2	F; 5'CTCAGCGAGTTTGAGTT- GAGG 3' R; 5'GGTACAGGTCGAG- CATATAGGG 3'	NM-017178.1

10. Uji Klasifikasi

Sumur diinkubasi dengan hDMP1 rekombinan (2 μ l/ml) selama semalam. hPDLSC diunggulkan dengan 50.000 sel per sumur dalam Serum-Free Media (SFM) dan diinkubasi selama 4-6 jam. Sel-sel diubah menjadi Osteogenic Medium (OM) dan General Medium (GM) untuk kontrol. Mereka diinkubasi selama 14 hari, kemudian difiksasi dengan metanol selama 10 menit. Setelah dicuci dengan air deionisasi, sel diwarnai dengan larutan S merah alizarin 1% pada suhu kamar. Setiap spesimen dicuci dengan air deionisasi dan dikeringkan.

11. Analisis Data

Percobaan dilakukan dalam tiga ulangan. Analisis statistik dilakukan dengan Graph Pad 7 dan one-way ANOVA (*: $p < 0.05$, * *: $p < 0.01$).

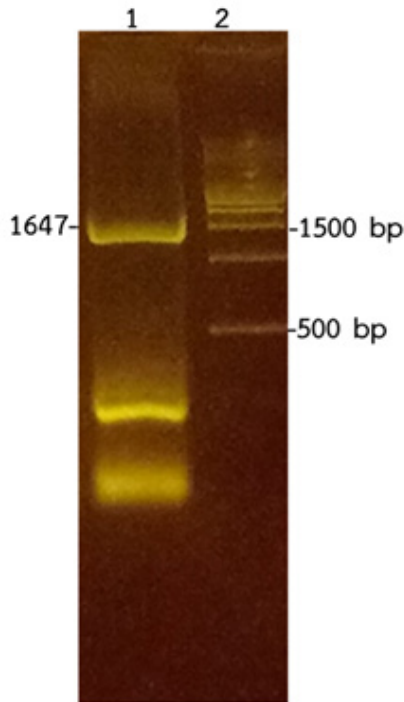


HASIL DAN PEMBAHASAN

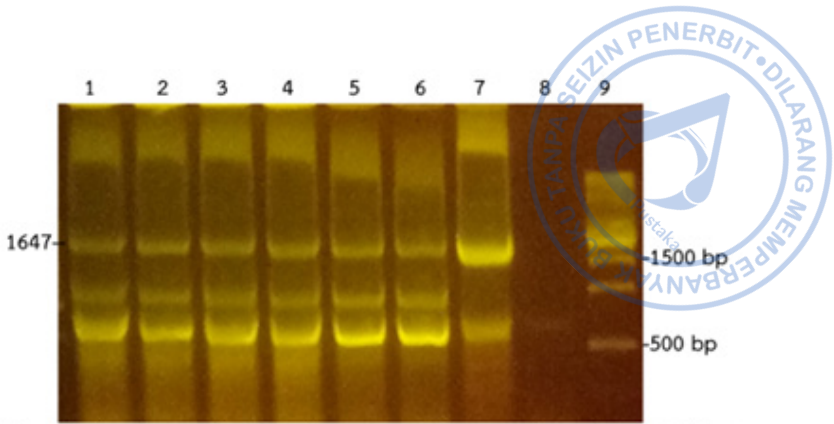
1. Optimalisasi Kodon dan Sintesis Gen

Urutan asam amino dari hDMP1 (ID Gen: 1758) dengan tag 8xHis pada ujung C dioptimalkan secara *in silico* untuk penggunaan kodon yang lebih disukai pada *N. benthamiana* dan disintesis oleh Bioneer Corp (Korea Selatan) (Gambar 4). Panjang penuh gen hDMP1 mengandung asam nukleotida 1674 bp dan 549 asam amino, termasuk sekuen modifikasi seperti tag poli-histidin (8x-Histidin). Tag poli-histidin memiliki fungsi untuk mendeteksi dan memurnikan protein. Deteksi tag histidin diperiksa dengan antibodi anti-histidin. Selain itu, hDMP1 dapat dideteksi dengan antibodi spesifik anti human DMP1. Tag poli-histidin sesuai untuk dimurnikan dengan kolom nikel (Knecht dkk., 2009).

diampifikasi dengan PCR (Gambar 5). Kemudian, gen hDMP1 diligasi ke dalam vektor mudah pGEM-T untuk memeriksa urutannya. Plasmid yang benar dikloning ke dalam *E. coli* strain DH10B (Gambar 6). *E. coli* DH10B adalah inang yang paling berguna untuk kloning. Ini telah direkayasa untuk pembangunan perpustakaan DNA yang besar. *E. coli* DH10B memiliki efisiensi yang tinggi untuk mentransformasi dan memelihara plasmid yang besar.



Gambar 5. Produk PCR dari amplifikasi hDMP1

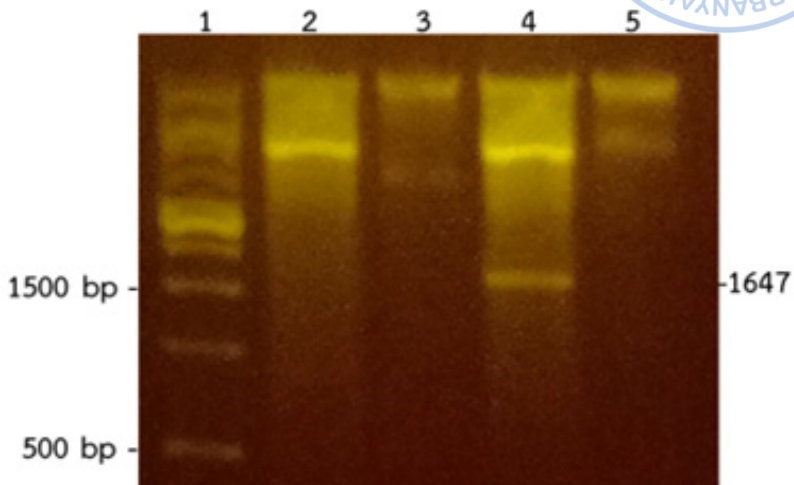


Gambar 6. Elektroforesis gel agarosa dari koloni PCR pGEMT-hDMP1 dari *E. coli* DH10B

Selanjutnya, urutan yang benar dari plasmid pGEMT-hDMP1 dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* dan *SacI* (Gambar 7) dan diligasi ke vektor ekspresi. Dalam percobaan ini, kami menggunakan vektor pET22b yang sesuai untuk diekspresikan dalam sistem prokariotik (Shafee & Lowe, 2017). Gen hDMP1 diligasi ke vektor pET22b (Gambar 8). Vektor pET sangat digunakan untuk memproduksi protein rekombinan pada *E. coli*. Plasmid ini memiliki banyak situs restriksi yang umum, tidak hanya di depan promotor T7 tetapi juga di tempat lain.

Selain itu, plasmid ini memiliki jumlah salinan yang sedang (~20-25 per sel) yang dapat mencegah hal-hal aneh terjadi karena jumlah salinan yang terlalu tinggi atau terlalu rendah. Vektor pET mengandung promotor T7, yang merupakan salah satu promotor terkuat yang dapat menghasilkan protein dalam jumlah besar (Pan SH dkk., 2000; Rosano & Ceccarelli, 2014; Riggs PD, 2018). Sebagai konsekuensinya, promotor T7 dapat sepenuhnya menginduksi

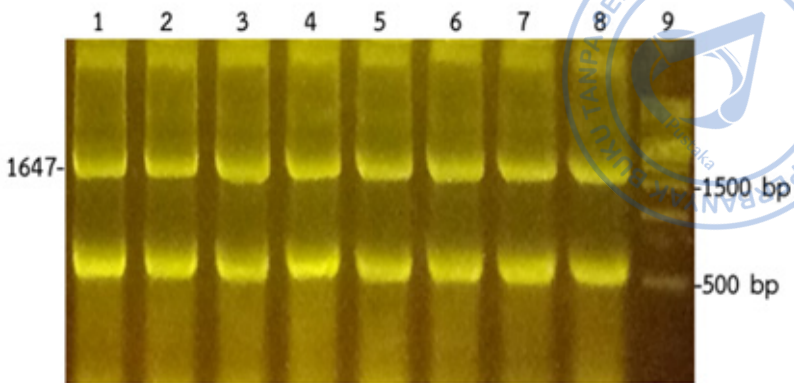
sumber daya sel untuk ekspresi gen target (Sadeghi dkk., 2007). Selanjutnya, pET22b-hDMP1 dikloning ke dalam E. coli DH10B. Selanjutnya, plasmid pET22b-hDMP1 ditransformasikan ke dalam E. coli strain Rosetta untuk diekspresikan (Gambar 7).



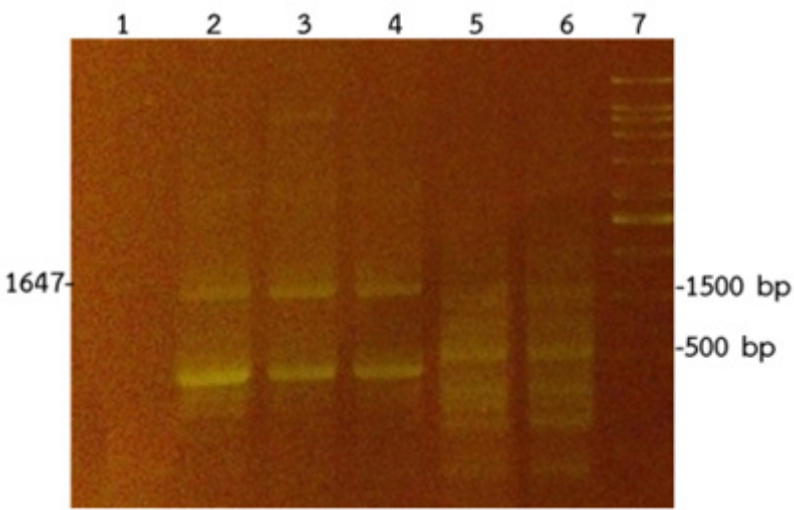
Gambar 7. Elektroforesis gel agarosa dari restriksi hDMP1-pGEM-T



Gambar 8. Peta vektor dari pET22b-hDMP1



Gambar 9. Elektroforesis gel agarosa dari koloni PCR pET22b-hDMP1 dari *E. coli* DH10B



Gambar 10. Elektroforesis gel agarosa dari koloni PCR pET22b-hDMP1 dari *E. coli* strain Rosetta

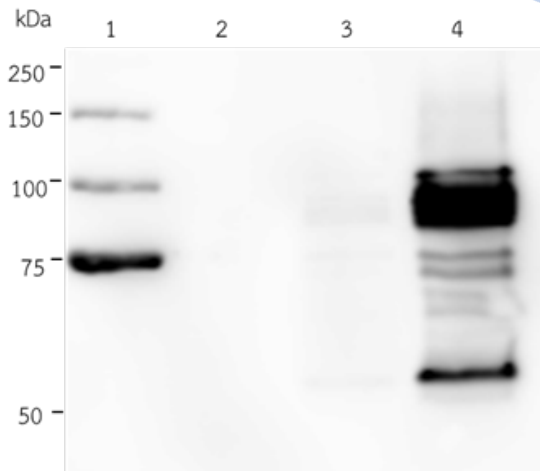
b. Ekspresi hDMP1 rekombinan

Beberapa strain *E. coli* telah direkayasa sebagai sistem ekspresi untuk protein rekombinan. Namun, *E. coli* strain Rosetta merupakan inang yang cocok untuk ekspresi gen prokariotik (Novy, 2001) yang sekarang menjadi salah satu strain *E. coli* yang paling banyak digunakan untuk memproduksi protein rekombinan. *E. coli* strain Rosetta mengandung RNA polimerase, yang digerakkan oleh ekspresi gen yang mengkode protein target dan mentranskripsi delapan kali lebih cepat daripada RNA polimerase *E. coli*. T7 RNA polimerase secara khusus mengenali promotor T7, yang mendorong ekspresi gen target dari plasmid (Baumgarten T dkk., 2018; Rosano GL, dkk., 2014). Oleh karena itu, kami menggunakan *E. coli* strain Rosetta untuk memproduksi hDMP1.

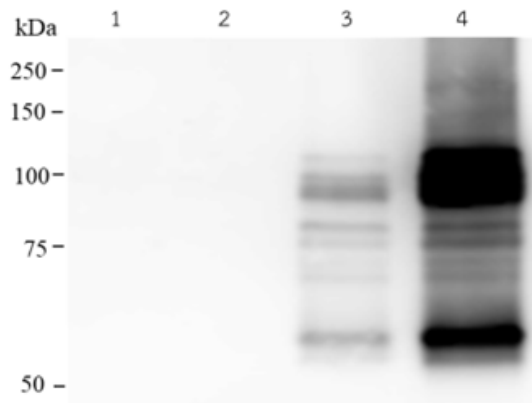
Dalam penelitian ini, ekspresi protein pada *E. coli* dilakukan dengan menggunakan western blotting dalam kondisi reduksi dan diperiksa dengan anti-histidin terkonjugasi-HRP (Gambar 11) dan antibodi anti-manusia DMP1 dan antibodi anti-kelinci IgG terkonjugasi-HRP. Ekspresi tersebut dibandingkan dengan sel *E. coli* Rosetta yang tidak diinduksi dan tidak diobati (tanpa gen penyisipan). Angka-angka ini menunjukkan dua pita dengan ukuran molekul sekitar 60 kDa dan 120 kDa, dan tidak diinduksi menunjukkan rendahnya ekspresi protein hDMP1. Namun, urutan hDMP1 diprediksi berukuran sekitar 60 kDa. Pada penelitian sebelumnya, DMP1 dalam larutan dapat mengalami dimerisasi untuk mencegah agregasi atau pengendapan lebih lanjut (He G, dkk., 2005).

Mengenai penelitian sebelumnya, DMP1 tikus rekombinan pada *E. coli* telah dilaporkan berukuran sekitar 61

kDa. Selanjutnya, fusi rekombinan rDMP1-GST pada *E. coli* menunjukkan berat molekul sekitar 90-95 kDa, dimana GST memiliki ukuran 26 kDa (Srinivasan dkk., 2009). Selain itu, kedua pita tersebut dapat mengindikasikan bentuk monomer dan dimer dari protein hDMP1.

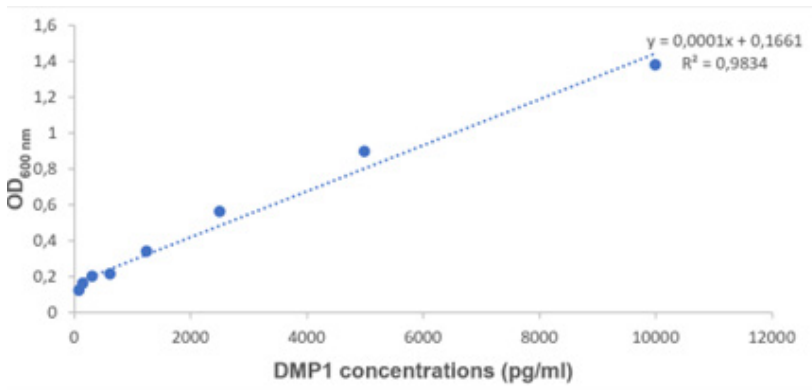


Gambar 11. Analisis Western blot ekspresi hDMP1 pada *E. coli*



Gambar 12. Analisis Western blot ekspresi hDMP1 pada *E. coli*

Ekspresi jumlah hasil protein hDMP1 rekombinan ditentukan dengan menggunakan kit Elisa hDMP1. hDMP1 rekombinan dari *E. coli* diekstraksi dan dimasukkan ke dalam sumuran. Berdasarkan kurva standar (Gambar 13), kuantifikasi protein dihitung (Tabel 5). Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil ekspresi hDMP1 rekombinan pada *E. coli* adalah 1,38 µg/ml.



Gambar 13. Kurva standar kuantifikasi protein DMP1

Tabel 5. Kuantifikasi ekspresi hasil dari hDMP1

Sampel	OD ₆₀₀	Media (ml) /Dapar (ml)	Ekspresi yield (µg/ml)
hDMP1 dari <i>E. coli</i>	0.901	20 /20	1.38
	0.826		
	0.860		
	0.833		

c. Optimalisasi ekspresi hDMP1

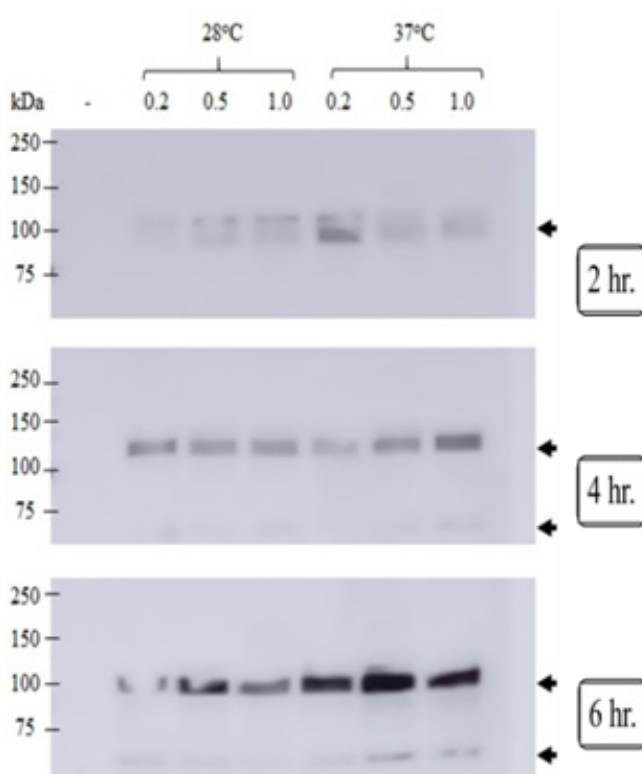
Setiap protein memiliki karakteristik yang berbeda, oleh karena itu, optimasi kondisi terbaik diperlukan untuk menghasilkan ekspresi tingkat tinggi. Pada penelitian ini konsentrasi IPTG, waktu inkubasi dan suhu dioptimalkan. IPTG memiliki efek mengontrol laju ekspresi, kelarutan, dan aktivitas protein. IPTG merangsang induksi promotor repressor lac yang secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi.

Sebaliknya, ekspresi protein lebih rendah jika tidak ada IPTG sebagai penginduksi. IPTG memiliki konsentrasi terbatas untuk meningkatkan protein rekombinan (Malik dkk., 2016; Zhang dkk., 2017). Pada percobaan ini, kami menggunakan berbagai konsentrasi IPTG (0,2, 0,5, dan 1 mM), dan ekspresi tertinggi DMP1 diperoleh pada konsentrasi akhir 0,5 mM IPTG (Gambar 14). Temuan ini konsisten dengan penelitian lain yang menunjukkan konsentrasi IPTG yang lebih rendah untuk menginduksi protein rekombinan.

Setelah menambahkan IPTG, ekspresi DMP1 diinkubasi pada suhu yang berbeda yaitu 28 dan 37°C selama 2, 4, dan 6 jam. Suhu merupakan parameter penting yang mempengaruhi tingkat ekspresi protein rekombinan (Ran dkk., 2015; Sadeghi dkk., 2011). Seperti yang ditunjukkan pada gambar 14 dari western blot, ekspresi tertinggi pada 37°C dikonfirmasi sebagai suhu optimal untuk ekspresi DMP1. Waktu inkubasi memiliki korelasi langsung tidak hanya dengan pertumbuhan bakteri tetapi juga dengan ekspresi protein (Sadeghi dkk., 2011; Zhang dkk., 2017).

Waktu yang singkat untuk kultur membuat bakteri tidak dapat tumbuh dengan baik dan mencapai kepadatan

yang sesuai. Sebaliknya, induksi dalam waktu yang lama mempengaruhi akumulasi protein dalam badan inklusi (Ran dkk., 2015; Zhang dkk., 2017). Itu mungkin menjadi alasan mengapa ekspresi hDMP1 meningkat dari 2 hingga 6 jam. Dalam penelitian ini, analisis western blot diperiksa dengan anti-histidin terkonjugasi-HRP. Hasilnya menegaskan bahwa kondisi optimal untuk menghasilkan hDMP1 rekombinan pada *E. coli* ditunjukkan pada 0,5 mM IPTG dan inkubasi pada 37°C selama 6 jam (Gambar 14).



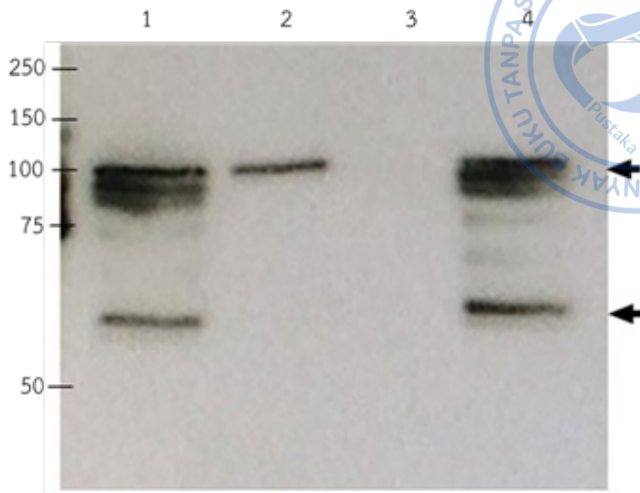
Gambar 14. Analisis Western blot untuk optimasi kondisi ekspresi hDMP1 rekombinan pada *E. coli*

Parameter yang digunakan adalah suhu kultur (28 dan 37°C), waktu inkubasi (2, 4 dan 6 jam), dan konsentrasi IPTG (0,2 mM, 0,5 mM, dan 1 mM) dengan kontrol negatif (E. coli tanpa pET22b-hDMP1).

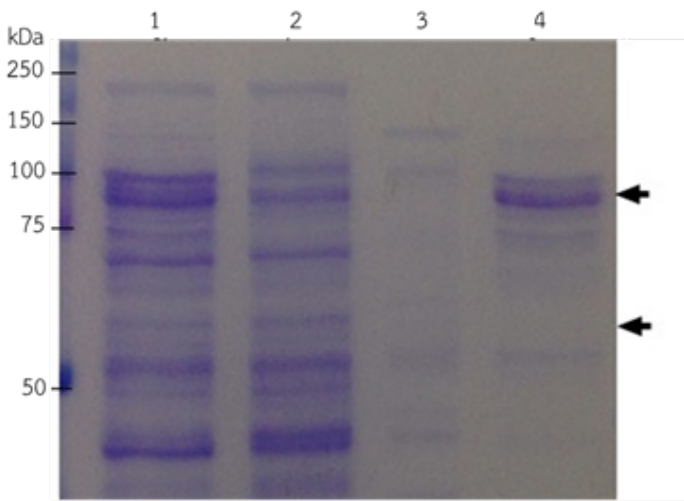
d. Pemurnian dari hDMP1 yang diproduksi E.coli

Urutan hDMP1 ditandai dengan poli-histidin yang dimurnikan dengan benar dengan metode kromatografi afinitas logam terimobilisasi (IMAC). hDMP1 yang diproduksi E. coli diperlukan untuk mengerem sel sebelum dimasukkan ke dalam kolom. Sel-sel dipecah dengan menggunakan sonikator untuk mengganggu membran sel dan melepaskan isi sel. Selanjutnya, sel dimasukkan ke dalam kolom dan dicuci dengan berbagai konsentrasi buffer pencuci (terdiri dari imidazol 20-50 mM) untuk pengoptimalan.

Buffer pencuci memiliki fungsi untuk melepaskan protein yang tidak spesifik. Oleh karena itu, pada proses elusi digunakan eluting buffer (yang berisi Imidazol 250 mM). Hasilnya, pemurnian berhasil dilakukan dengan menggunakan kolom Ni- NTA. Analisis Western blot dilakukan dengan anti-histidin terkonjugasi-HRP (Gambar 15). SDS- PAGE diwarnai dengan Coomassie brilliant blue (Gambar 16). Meskipun pada western blot muncul pita-pita yang mengalir, namun kami telah berhasil memurnikan hingga 80%.



Gambar 15. Analisis Western blot dari hDMP1 yang diproduksi E. coli

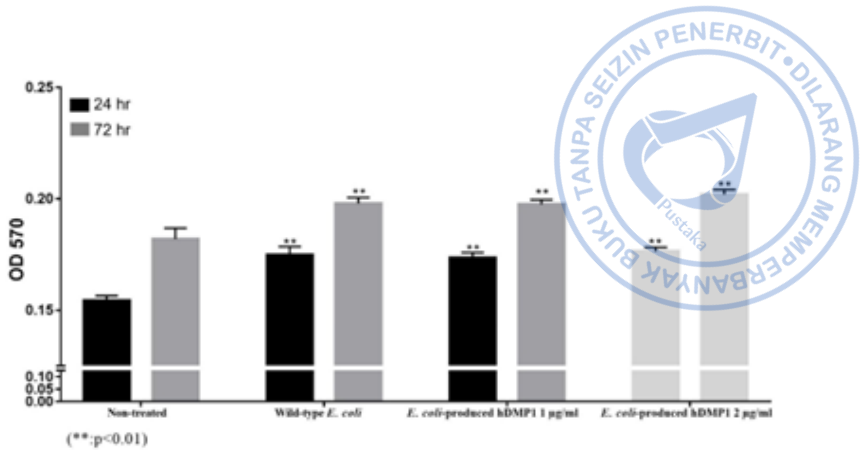


Gambar 16. Analisis SDS-PAGE dari pemurnian hDMP1 yang diproduksi E. coli

e. Uji proliferasi dari hDMP1 yang diproduksi E.coli

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) adalah pereaksi tetrazolium yang akan direduksi menjadi produk formazan oleh dehidrogenase mitokondria. Jumlah produk formazan merepresentasikan aktivitas metabolisme sel yang layak pada titik waktu tertentu. Dalam penelitian ini, pengaruh hDMP1 yang diproduksi E. coli terhadap viabilitas sel diselidiki dengan mengkultur hPDLSC. hDMP1 yang diproduksi E. coli dengan konsentrasi 1 g / ml dan 2 g / ml, dan E. coli yang tidak diobati (WT-E. coli) diperlakukan pada PDLSCs. Jumlah sel ditentukan dengan uji MTT setelah dikultur selama 24 dan 72 jam.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua protein secara signifikan merangsang proliferasi hPDLSCs. Namun, penelitian ini juga menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara viabilitas hPDLSC yang diberi perlakuan 1 µg/ml dan 2 µg/ml. Sejalan dengan penelitian sebelumnya, DMP1 dapat menginduksi proliferasi pada berbagai jenis sel (Hase dkk., 2015; Maglic dkk., 2015; Ye dkk., 2005). Selain itu, domain RGD dari DMP1 berspekulasi bahwa hal tersebut berkontribusi dalam meningkatkan proliferasi sel mirip odontoblas (Hase et al, 2005). Data ini mengkonfirmasi bahwa hDMP1 yang diproduksi E. coli tidak toksik terhadap hPDLSC (Gambar 17).



Gambar 17. Uji proliferasi hDMP1 yang diproduksi *E. coli* dalam hPDLSC.

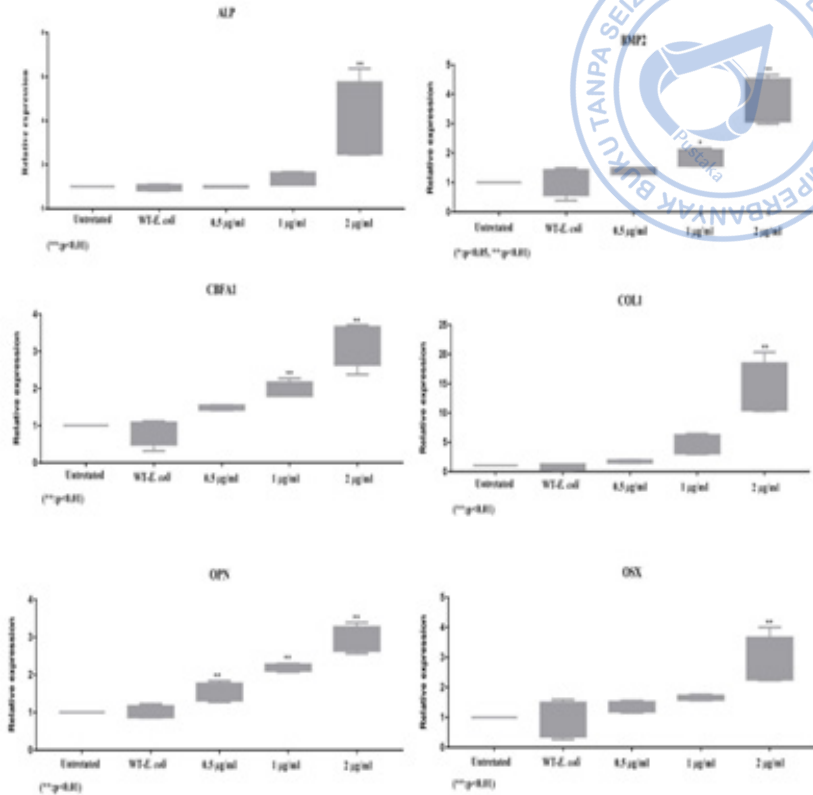
f. Osteogenik diferensiasi hDMP1 yang diproduksi *E.coli*

DMP1 dilaporkan diekspresikan dalam sel osteoblas dan odontoblas (Eapen et al., 2010; Tabatabaei FS, 2013; Feng et al., 2006). Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa DMP1 memiliki fungsi untuk memainkan regulasi penting untuk diferensiasi osteogenik pada sel dentin dan tulang (Rezai Rad et al., 2015). Oleh karena itu, hDMP1 rekombinan diuji lebih lanjut untuk menstimulasi gen-gen yang berhubungan dengan diferensiasi osteogenik pada hPDLSC. Sel punca ligamen periodontal (PDLSCs) sesuai untuk dipromosikan pada sel mirip sementoblas, adiposit, atau serat kolagen. Jaringan periodontal PDLSC dapat meregenerasi dentin reparatif melalui proses alami (Brent Schweitzer & Tabin, 2003).

Gen penanda osteogenik alkaline phosphate (ALP), osteopontin (OPN), osterix (OSX), kolagen tipe I (COL1), core binding factor alpha 1 (CBFA), bone morphogenetic

protein-2 (BMP2), dan gen penanda osteogenik Wnt3a dilakukan untuk menghitung ekspresinya dengan RT-qPCR.

Dalam penelitian ini, sel diperlakukan dengan 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hDMP1 yang diproduksi E. coli. MRNA dikumpulkan dan diselidiki untuk ekspresi gen ALP, BMP2, CBFA1, COL1, OPN, OSX, WNT3a dengan qRT-PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ permukaan yang dilapisi hDMP1 yang diproduksi oleh E. coli dapat meningkatkan ekspresi gen ALP, BMP2, CBFA1, COL1, OPN, OSX, dan WNT3a. Gen-gen yang berhubungan dengan osteogenik ini meningkat secara signifikan pada hPDLSC. DMP1 sebelumnya diekspresikan dalam E. coli dan menstimulasi gen Runx2 pada sel preosteoblas calvaria tikus MC3T3-E1 (Eapen et al., 2010 & Eapen et al., 2011). Data ini menunjukkan bahwa hDMP1 yang diproduksi E. coli dapat dengan kuat menginduksi diferensiasi osteogenik pada hPDLSC (Gambar 18).



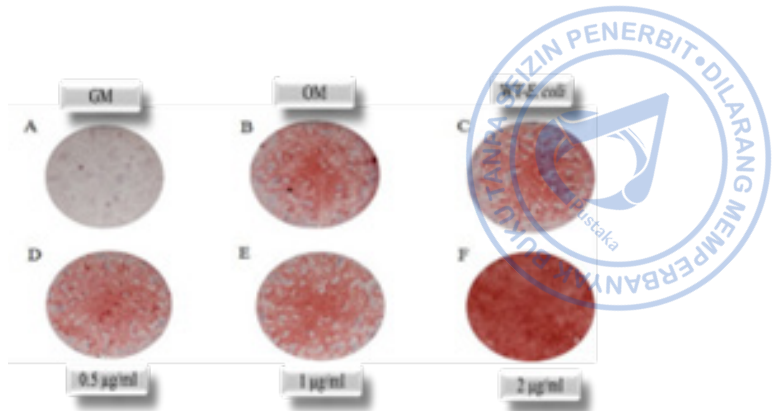
Gambar 18. hDMP1 yang diproduksi *E. coli* yang diinduksi diferensiasi osteogenik

g. Uji kalsifikasi dari hDMP1 yang diproduksi *E.coli*

Untuk mendukung efek diferensiasi osteogenik, hDMP1 yang diproduksi oleh *E. coli* diuji untuk mengetahui pengendapan kalsium pada hPDLSC. Untuk mengevaluasi dampaknya terhadap diferensiasi osteogenik, hPDLSC dikultur dalam media umum (GM) dan media osteogenik (OM). Media osteogenik terdiri dari asam askorbat dan dexametason.

Deksametason memiliki fungsi untuk meningkatkan penanda fenotipe pada sel osteoblas, sehingga dapat menstimulasi diferensiasi osteogenik pada penelitian *in vitro*. Asam askorbat adalah kofaktor enzim untuk menghidroksilasi prolin dan lisin dalam pro-kolagen (Langenbach & Handschel, 2013).

hPDLSC ditumbuhkan dalam medium umum dan medium osteogenik selama 14 hari. hPDLSC diwarnai dengan Alizarin Red S pada akhir percobaan. Hasilnya ditunjukkan pada Gambar 19 (A-F). Sel hPDLSCs yang dikultur dalam media umum (GM) tidak berwarna merah, tetapi sel berwarna merah muda ketika dikultur dalam media osteogenik. Ketika sel diperlakukan dengan protein yang dimurnikan dari *E. coli* tipe liar (WT-*E. coli*), 0,5 µg/ml, 1 µg/ml dan 2 µg/ml hDMP1 yang diproduksi oleh *E. coli* yang tumbuh dalam media osteogenik, sel juga menunjukkan warna merah muda yang mirip dengan sel yang tidak diberi perlakuan yang dikultur dalam media osteogenik. Namun, intensitas warna merah tertinggi muncul pada hDMP1 yang diproduksi *E. coli* pada 2 µg/ml, yang mengindikasikan adanya pengendapan kalsium. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa PDLSC memiliki kemampuan untuk menginduksi deposisi kalsium pada sel punca mesenkimal (Seo et al., 2004). Hasil ini menjelaskan bahwa rekombinan hDMP1 pada *E. coli* dapat meningkatkan deposisi kalsium pada hPDLSCs.



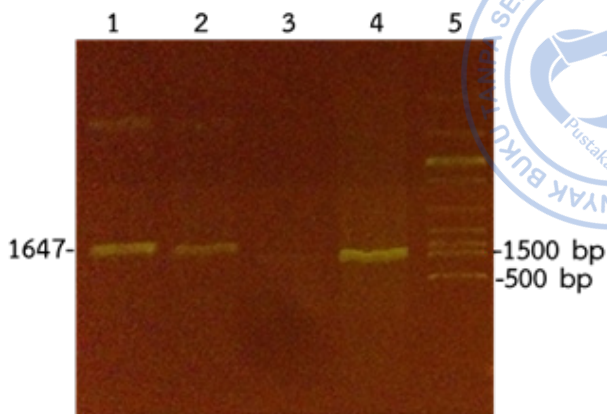
Gambar 19. Uji kalsifikasi hDMP1

Uji kalsifikasi hDMP1 yang diproduksi E. coli. (A) Sel kontrol yang tumbuh dalam medium umum (GM), (B) sel kontrol yang tumbuh dalam medium osteogenik (OM), (C) sel yang diberi perlakuan dengan protein yang dimurnikan dari WT-E. coli dalam medium osteogenik, (D- F) sel yang diberi perlakuan dengan 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, dan 2 $\mu\text{g/ml}$ hDMP1 yang dihasilkan E. coli dalam medium osteogenik.

3. hDMP1 yang diproduksi *Nicotiana bethamiana*

a. Kloning pBYR2e-hDMP1

Setelah mengkloning pGEMT-hDMP1 ke dalam E. coli DH10B, plasmid dipotong dan diligasi dengan enzim restriksi XbaI dan SacI (Gambar 20) ke dalam vektor pBYR2e. Daerah T- DNA dari gen hDMP1 (Gambar 21) dikodekan ke dalam vektor geminiviral pBYR2e (virus kerdil kacang kuning) untuk diekspresikan pada *N. benthamiana* (Huang dkk, 2009).



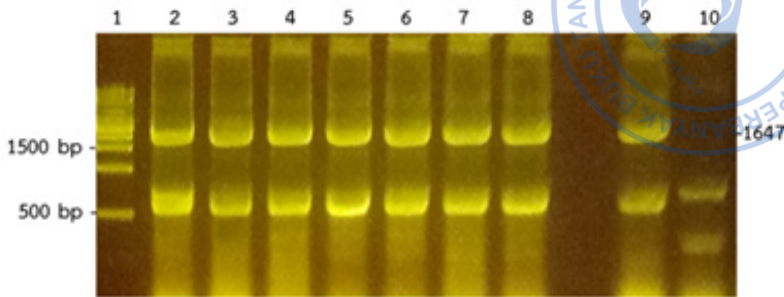
Gambar 20. Elektroforesis gel agarosa dari restriksi pGEMT-hDMP1



Gambar 21. Representasi skematis dari daerah T-DNA dalam vektor geminiviral

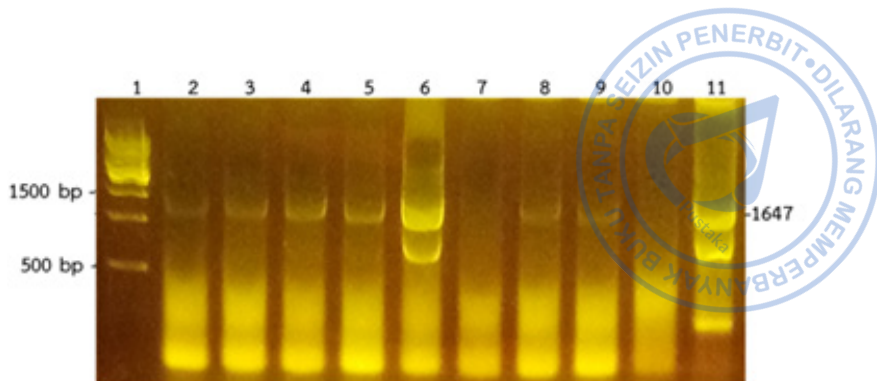
Geminivirus memiliki mesin replikasi DNA untai tunggal (ssDNA) yang dapat meningkatkan jumlah salinan dan tingkat ekspresi. Dengan mekanisme lingkaran bergulir dari DNA untai ganda memfasilitasi template untuk transkripsi pada frame pembacaan terbuka (Mor dkk., 2003). T-DNA berada pada batas kiri (LB) dan batas kanan (RB). T-DNA dari pBYR2e mengandung promotor 35S virus mosaik kembang kol dimerik (CaMV 35S) (Regnard et al., 2010) Tag urutan yang diekspresikan - panjang penuh (Est 3' FL), promotor tembakau RB7 (Rb 7), protein inisiasi replikasi (C2 / C1), daerah intergenik panjang (LIR), daerah intergenik pendek

(SIR), P19-Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV). Kemudian, itu dikloning ke dalam *E. coli* DH10B (Gambar 22).



Gambar 22. Elektroforesis gel agarosa dari koloni PCR pBYR2e-hDMP1 dari *E. coli* DH10B

Agrobacterium tumefaciens adalah fitopatogen tanah yang bertanggung jawab atas penyakit empedu tajuk. Biasanya digunakan untuk memasukkan gen asing ke dalam sel tanaman dan ditransformasikan oleh plasmid bakteri. Namun, T-DNA adalah bagian kecil yang terlokalisasi dalam plasmid pemicu tumor (Ti) dan dimasukkan ke dalam inti r genom tanaman. Wilayah ini menghasilkan dan memediasi transpor T-DNA. Selain itu, *A. tumefaciens* secara alami mengandung plasmid Ti yang menjadi vektor biner yang terutama terdiri dari beberapa situs endonuklease restriktif yang unik (Gelvin, 2003; Kim Veena & Gelvin, 2007). Dengan demikian, hDMP1-pBRY2e ditransformasikan ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 dengan menggunakan metode elektroporasi (Gambar 23).



Gambar 23. Elektroforesis gel agarosa dari koloni PCR pBYR2e-hDMP1 dari *A. tumefaciens* GV3101

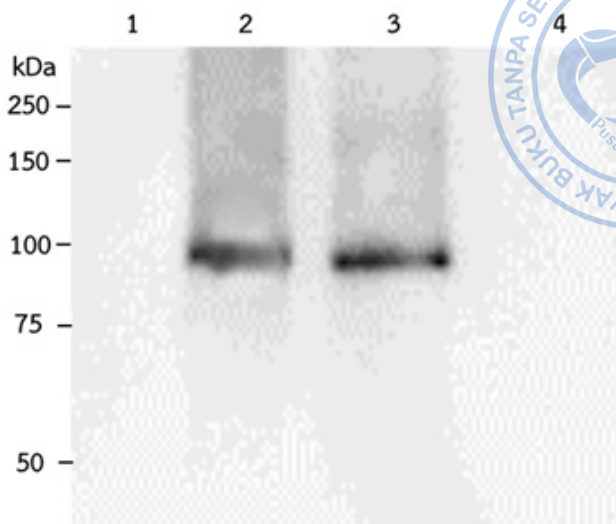
b. Ekspresi hDMP1 rekombinan

Tembakau memiliki beberapa manfaat dan yang paling berguna untuk infiltrasi agrobakteri. Tembakau memiliki banyak spesies yang telah digunakan untuk ekspresi sementara. Namun, *N. benthamiana* telah menunjukkan ekspresi protein tingkat tertinggi dengan menggunakan promotor 35S daripada spesies *Nicotiana* lainnya (Sheludko dkk., 2007). Oleh karena itu, kami menggunakan *N. benthamiana* untuk mengekspresikan hDMP1 rekombinan.

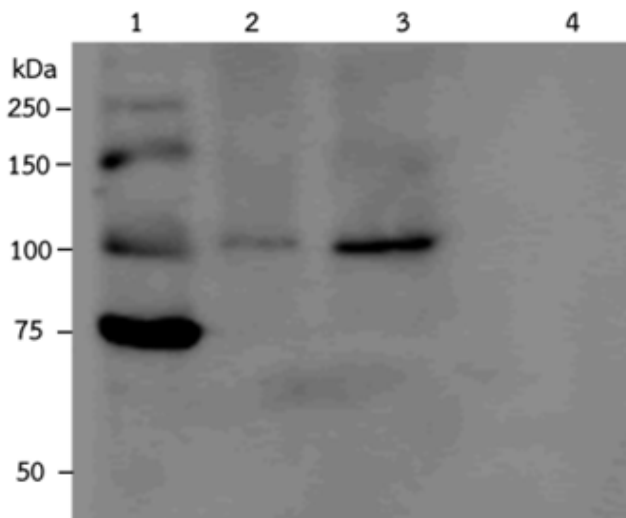
Protein hDMP1 pada *N. benthamiana* diperlakukan dalam kondisi reduksi dan non-reduksi, kemudian dibandingkan dengan ekstrak tanaman pada *N. benthamiana* tipe liar (tanaman yang tidak terinfeksi). Ekspresi tersebut dikonfirmasi dengan menggunakan western blots, yang diperiksa dengan antibodi anti-dan manusia DMP1 kelinci (Gambar 24) dan anti-histidin terkonjugasi-HRP (Gambar 25). Pita hDMP1 rekombinan pada *N. benthamiana* terdeteksi sekitar 100 kDa. Gambar tersebut menunjukkan bahwa pola tidak berbeda antara kondisi reduksi dan non-reduksi. Namun,

ukuran protein lebih tinggi dari ukuran yang diharapkan yaitu 60 kDa yang mengindikasikan adanya modifikasi pasca translasi.

Data ini didukung oleh penelitian sebelumnya di mana modifikasi DMP1 tikus dapat meningkatkan ukuran molekul ini menjadi 160-210 kDa, seperti yang ditunjukkan oleh analisis immunoblotting dengan antibodi anti-DMP1 (Butler dkk., 2009). Selain itu, DMP1 tikus diselidiki melalui western blots menggunakan antibodi anti-dmp1 tikus dan menunjukkan ukuran 130-150 kDa (Terasawa M dkk., 2004). Selanjutnya, glikosilasi DMP1 tikus telah menunjukkan ukuran 89-180 kDa (Sun Y dkk., 2015). Berat molekul DMP1 yang berbeda dipengaruhi oleh modifikasi pasca-translasi, yang dapat meningkatkan berat molekul protein (Terasawa M dkk., 2004). DMP1 adalah salah satu anggota SIBLING yang sangat terfosforilasi. Selain itu, DMP1 mengandung banyak situs untuk glikosilasi (George A dkk., 1993; Qin C dkk., 2004; Qin dkk., 2003; Tartaix dkk., 2004) (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13316>).

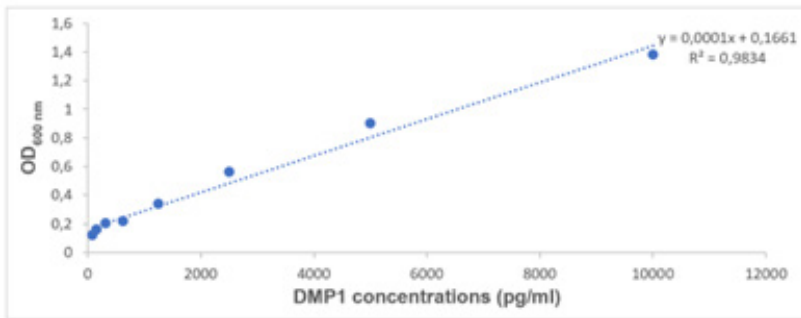


Gambar 24. Analisis Western blot ekspresi hDMP1 pada *N. benthamiana*



Gambar 25. Analisis Western blot ekspresi hDMP1 pada *N. benthamiana*

Ekspresi jumlah hasil protein hDMP1 rekombinan dikuantifikasi dengan menggunakan kit Elisa hDMP1. hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* diukur menurut kurva standar (Gambar 26). Ekspresi hDMP1 rekombinan dihitung (Tabel 6). Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil ekspresi hDMP1 rekombinan pada *N. benthamiana* adalah 0,3 µg/g daun segar.



Gambar 26. Kurva standar kuantifikasi protein DMP1

Tabel 6. Kuantifikasi ekspresi hasil dari hDMP1 yang diproduksi oleh *N. benthamiana*

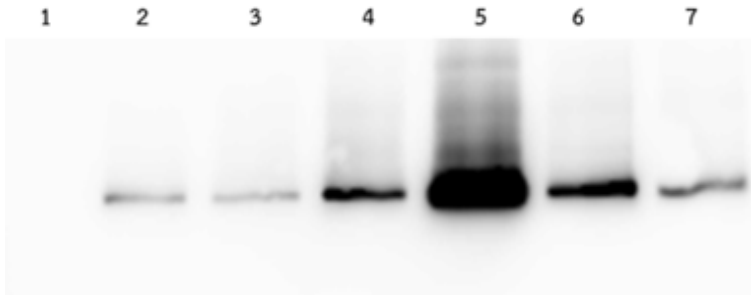
Sampel	OD _{600 nm}	Daun (g)/ Dapar (ml)	Nilai yield (µg/g)
hDMP1 dari tumbuhan	0.317	50/100	0.3
	0.323		
	0.318		
	0.317		

c. Optimalisasi ekspresi hDMP1

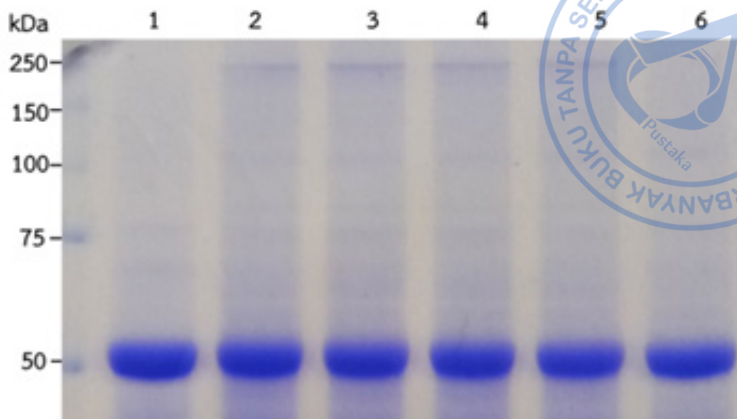
Memproduksi protein rekombinan pada tanaman juga memiliki parameter penting yang dapat mempengaruhi tingkat ekspresi. Beberapa penelitian telah berusaha menerapkan hari

pasca infiltrasi dan kepadatan kultur sel *A. tumefaciens* untuk meningkatkan jumlah protein rekombinan yang dihasilkan pada tanaman (Cao dkk., 2017; Norkunas dkk., 2018).

Dalam penelitian ini, kami memvariasikan kepadatan *A. tumefaciens* GV3101 (OD₆₀₀) dan hari setelah infiltrasi (dpi). Konsentrasi *A. tumefaciens* 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 diinfiltrasi. Untuk menentukan tingkat ekspresi, western blot diperiksa dengan anti-histidin terkonjugasi-HRP dan mengkonfirmasi ekspresi tertinggi pada OD₆₀₀ 0,4 (Gambar 27). Pita-pita SDS-PAGE (Gambar 28) diwarnai dengan Coomassie brilliant blue dan didigitalisasi dengan memindai file jpg dengan ImageJ. Kemiripan puncak-puncak tersebut mengindikasikan bahwa jumlah total protein dalam sampel tidak berbeda secara signifikan.



Gambar 27. Analisis Western blot dari optimasi OD₆₀₀ *A. tumefaciens* pada *N. benthamiana*

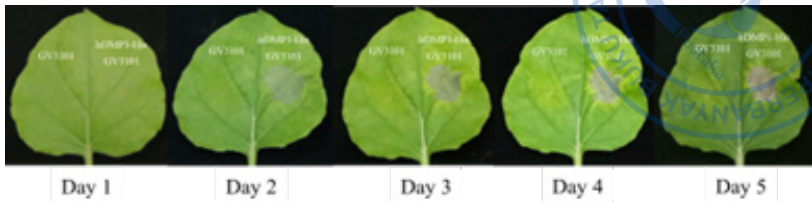


Gambar 28. Analisis SDS-PAGE untuk optimasi OD600 dari *A. tumefaciens* pada *N. benthamiana*

Untuk mengoptimalkan hari pasca infiltrasi, larutan *A. tumefaciens* OD600 0.4 diinfiltrasikan ke dalam daun *N. benthamiana*. Kemudian, daun dikumpulkan pada hari ke 1-5 hari setelah infiltrasi (dpi). Pada Gambar 29, terlihat gejala nekrosis pada daun pada hari ke-2 dpi. Percobaan ini juga dibandingkan dengan *A. tumefaciens* GV3101 wild type (tanpa gen interest) yang tidak menunjukkan efek nekrosis pada daun. Hari panen setelah diinfiltrasi diselidiki dengan analisis western blot dan SDS-PAGE. Analisis SDS-PAGE (Gambar 30) diwarnai dengan Coomassie brilliant blue. Gel didigitalisasi dengan ImageJ untuk mengukur total protein terlarut.

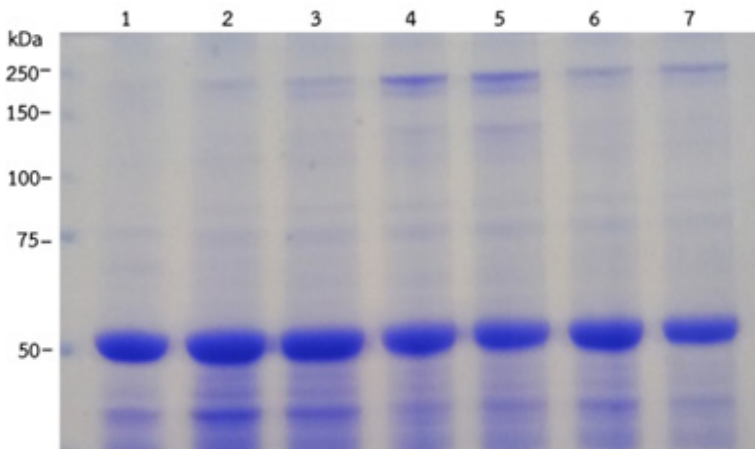
Data menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dari protein terlarut yang dimuat ke dalam setiap gel. Kemudian, analisis western blot dilakukan dengan anti-histidin terkonjugasi-HRP. Pita yang kuat muncul pada hari ke-2 dpi.

Oleh karena itu, kami menyimpulkan bahwa ekspresi tingkat tinggi adalah hari ke-2 dpi (Gambar 31).

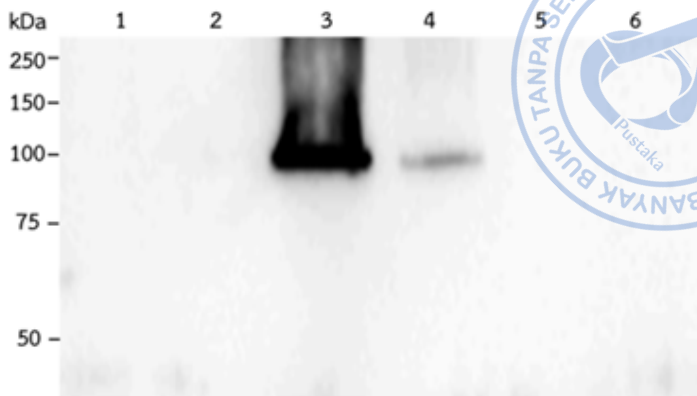


Gambar 29. Gejala nekrosis pada daun *N. benthamiana*.

Sisi kiri: diinfiltrasi dengan *A. tumefaciens* tanpa penyisipan pBYR2e-hDMP1 OD600 0.4. Sisi kanan: diinfiltrasi dengan *A. tumefaciens* yang diinfeksi pBYR2e-hDMP1 OD600 0.4.



Gambar 30. Analisis SDS-PAGE dari optimasi hari setelah infiltrasi (dpi) pada *N. benthamiana*



Gambar 31. Analisis Western blot untuk optimasi hari setelah infiltrasi (dpi) pada *N. benthamiana*.

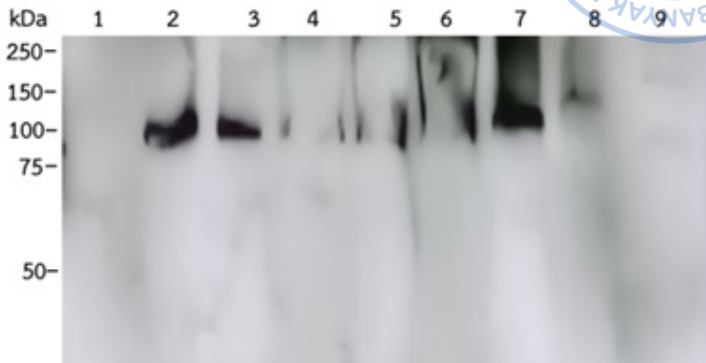
Lajur 1: tanaman yang tidak terinfiltrasi (WT), lajur 2 1 dpi, lajur 3: 2 dpi, jalur 4: 3 dpi, jalur 5: 4 dpi, jalur 6: 5 dpi.

d. Pemurnian dari hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana*

Daun *N. benthamiana* secara alami menghasilkan Ribulosa-1,5-bisfosfat karboksilase / oksigenase (RuBisCO). Oleh karena itu, sebelum dimasukkan ke dalam kolom Ni-NTA, RuBisCO harus dihilangkan. Metode umum untuk menghapus RuBisCO adalah pengendapan amonium sulfat. Amonium sulfat adalah bahan kimia inert yang tidak akan mengubah sifat protein.

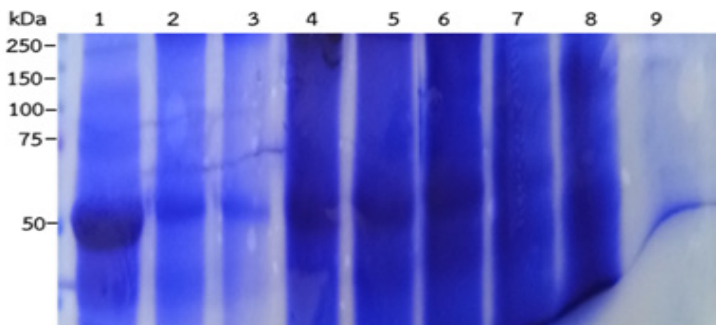
RuBisCO diendapkan dengan amonium sulfat. Konsentrasi amonium sulfat yang tepat yang dapat mengendapkan RuBisCO dan hDMP1, dioptimalkan dan dideteksi dengan blotting dan SDS-PAGE. Analisis Western blot diperiksa dengan anti-histidin terkonjugasi-HRP (Gambar

32). Analisis SDS diwarnai dengan Coomassie brilliant blue (Gambar 33). Dengan demikian, hasil penelitian menunjukkan bahwa RuBisCO dan hDMP1 diendapkan pada konsentrasi amonium sulfat 35% dan 80%, masing-masing (Gambar 34 dan Gambar 35).



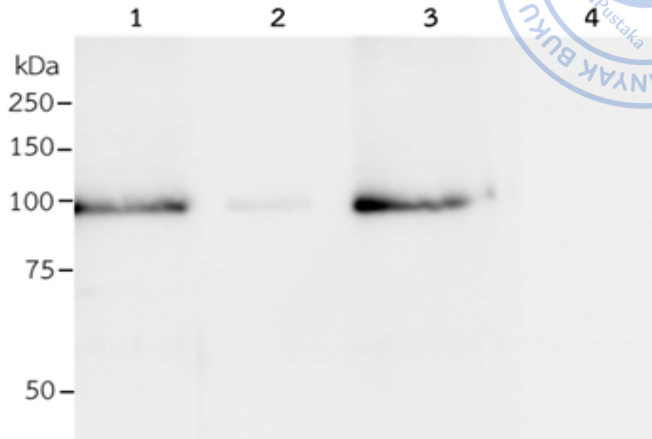
Gambar 32. Analisis Western blot untuk optimasi konsentrasi amonium sulfat.

Lajur 1: tanaman yang tidak diinfiltrasi (WT), lajur 2: ekstrak kasar, lajur 3 20%, lajur 4: 30%, jalur 5: 40%, jalur 6: 50%, jalur 7: 60%, jalur: 8: 70%, jalur: supernatan.



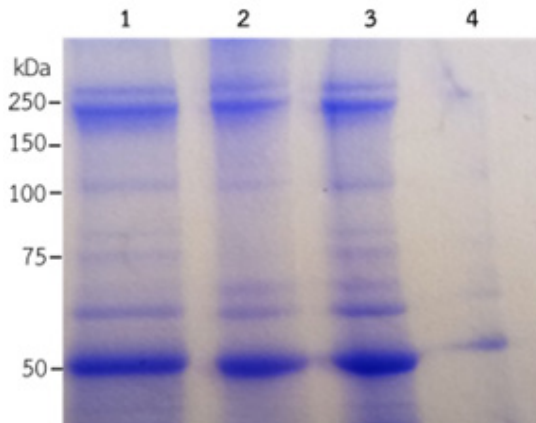
Gambar 33. Analisis SDS-PAGE dari optimasi konsentrasi pengendapan amonium sulfat curah hujan.

Lajur 1: tanaman yang tidak diinfiltrasi (WT), lajur 2: ekstrak kasar, lajur 3 20%, lajur 4: 30%, jalur 5: 40%, jalur 6: 50%, jalur 7: 60%, jalur: 8: 70%, jalur: supernatan.



Gambar 34. Analisis Western blot dari presipitasi hDMP1.

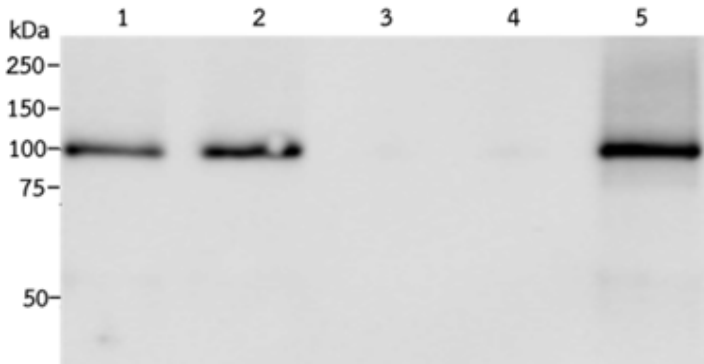
Lajur 1: ekstrak kasar, lajur 2: 35%, lajur 4: 80%, jalur 5: supernatan.



Gambar 35. Analisis SDS-PAGE dari pengendapan hDMP1.

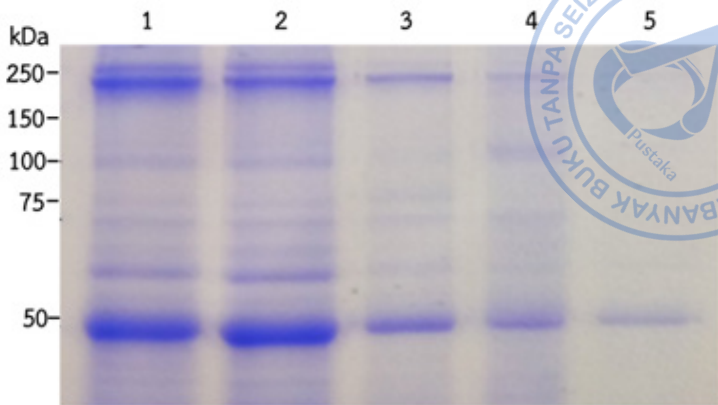
Lajur 1: ekstrak kasar, lajur 2: 35%, lajur 3: ekstrak kasar, lajur 4 80%, jalur 5: supernatan.

Kolom kromatografi afinitas nikel dikembangkan untuk memurnikan hDMP1. Pelet 80% disuspensikan dalam buffer ekstraksi dan disaring untuk menghilangkan partikel. Kemudian, dimasukkan ke dalam kolom Ni-NTA. Proses pemurnian dicuci dengan buffer pencuci dan dielusi dengan buffer eluting (Gambar 36). Sebagai hasil SDS-PAGE (Gambar 3437), gel diwarnai dengan pewarnaan Coomassie dan menunjukkan adanya RuBisCO pada fraksi elusi, namun dengan pengendapan amonium sulfat berhasil menurunkan jumlah RuBisCO.



Gambar 36. Analisis Western blot dari pemurnian hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana*.

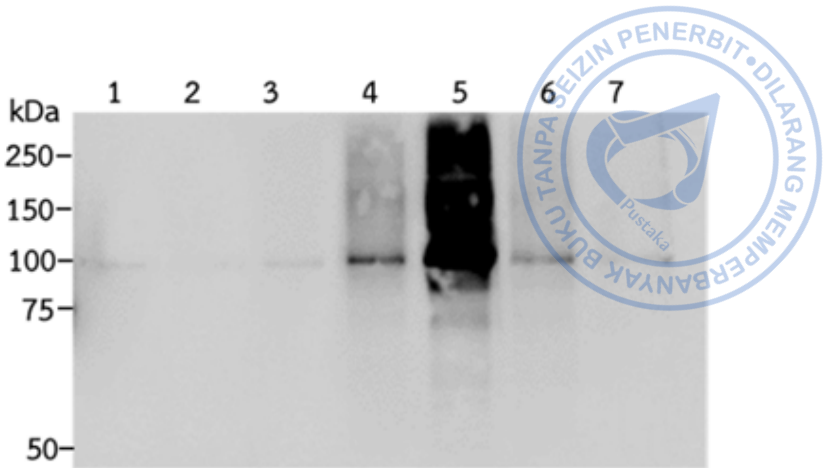
Lajur 1: ekstrak kasar, lajur 2: pelet 80%, lajur 3: aliran, lajur 4: pencucian, lajur 5: elusi.



Gambar 37. Analisis SDS-PAGE untuk pemurnian hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana*.

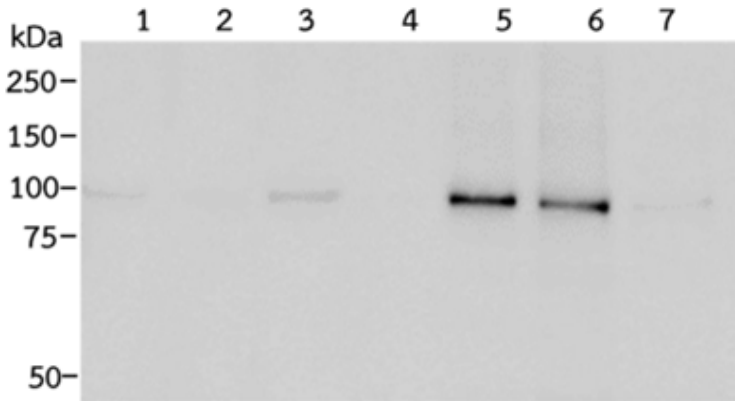
Lajur 1: ekstrak kasar, lajur 2: pelet 80%, lajur 3: aliran, lajur 4: cuci, lajur 5: elute.

Untuk melihat efek pengendapan amonium sulfat, dibandingkan dengan pemurnian normal (tanpa pengendapan). Western blot yang diperiksa dengan anti-histidin terkonjugasi-HRP dan SDS-PAGE yang diwarnai dengan Coomassie brilliant blue dilakukan untuk analisis protein. Data kami menunjukkan bahwa pemurnian dengan pengendapan mengumpulkan sejumlah besar protein hDMP1 rekombinan (Gambar 38) daripada pemurnian normal (Gambar 39). Dengan demikian, data SDS-PAGE menunjukkan jumlah RubisCO yang lebih sedikit pada pemurnian dengan pengendapan (Gambar 40) daripada pemurnian normal (Gambar 41). Hasil ini menyimpulkan bahwa pemurnian dengan pengendapan amonium sulfat diindikasikan lebih bermanfaat untuk memurnikan hDMP1 rekombinan daripada pemurnian normal (tanpa pengendapan).



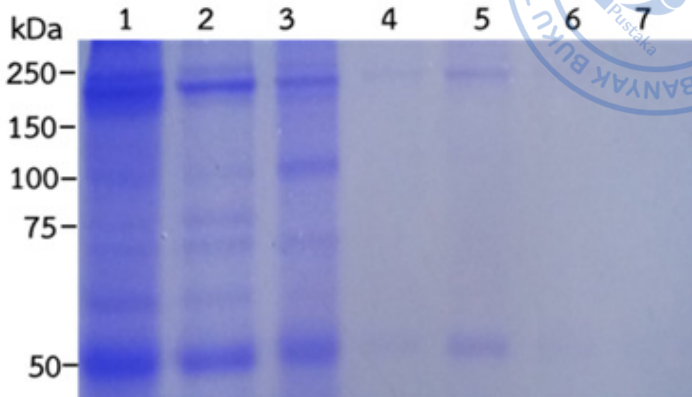
Gambar 38. Analisis Western blot pemurnian hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* (pengendapan).

Lajur 1: ekstrak kasar, lajur 2: aliran, lajur 3: pencucian, lajur 4: elute 1, lajur 5: elute 2, lajur 6: elute 3, lajur 7: elute 4.



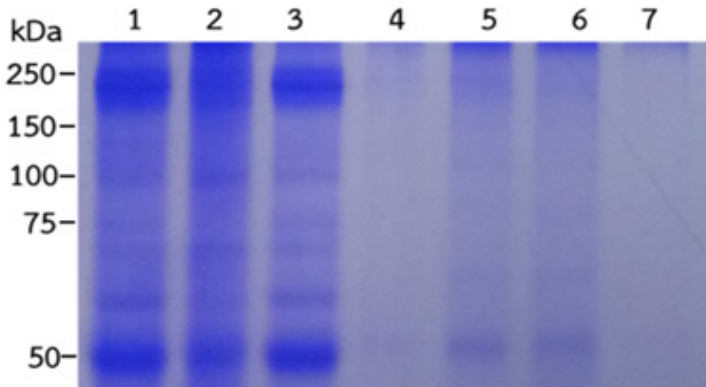
Gambar 39. Analisis Western blot pemurnian hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* (tanpa pengendapan).

Lajur 1: ekstrak kasar, lajur 2: aliran, lajur 3: pencucian,
lajur 4: eluen 1, lajur 5: eluen 2, lajur 6: eluen 3, lajur 7: eluen 4.



Gambar 40. Analisis SDS PAGE dari pemurnian hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* (pengendapan).

Lajur 1: ekstrak kasar, lajur 2: aliran, lajur 3: pencucian,
lajur 4: elute 1, lajur 5: elute 2, lajur 6: elute 3, lajur 7: elute 4.

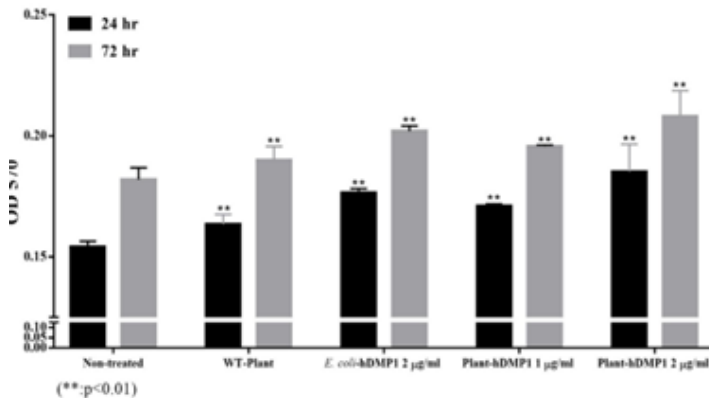


Gambar 41. Analisis SDS PAGE dari pemurnian hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* (tanpa pengendapan).

Lajur 1: ekstrak kasar, lajur 2: aliran, lajur 3: pencucian, lajur 4: elute 1, lajur 5: elute 2, lajur 6: elute 3, lajur 7: elute 4.

e. Uji proliferasi dari hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana*

Pengaruh hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* terhadap viabilitas sel diselidiki dalam hPDLSC. hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* (1 dan 2 $\mu\text{g/ml}$) dibandingkan dengan yang diproduksi *E. coli* (2 $\mu\text{g/ml}$). Tanaman yang tidak terinfeksi murni (WT) digunakan sebagai kontrol negatif. Jumlah hPDLSCs ditentukan dengan uji MTT setelah dikultur selama 24 dan 72 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua jenis protein rekombinan secara signifikan meningkatkan jumlah hPDLSCs. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara viabilitas hPDLSC yang diberi perlakuan 1 $\mu\text{g/ml}$ dan 2 $\mu\text{g/ml}$. Namun, hPDLSC yang diperlakukan dengan hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* menunjukkan tingkat kelangsungan hidup tertinggi. Data ini mengkonfirmasi bahwa hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* tidak bersifat toksik terhadap hPDLSC (Gambar 42).



Gambar 42. Uji proliferasi hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* dalam hPDLSC.

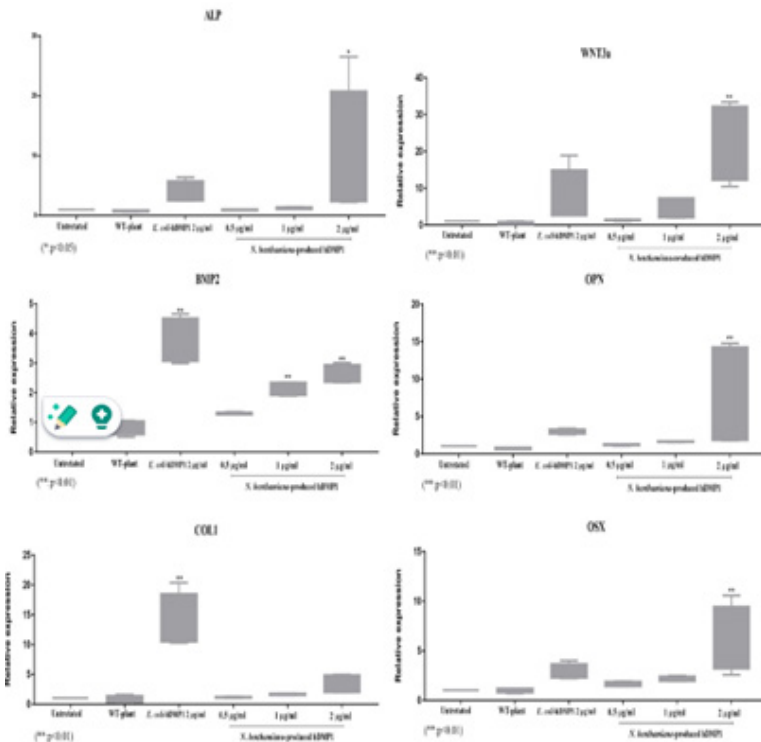
f. Osteogenik diferensiasi hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana

Tingkat ekspresi gen osteogenik, termasuk alkaline phosphate (ALP), osteopontin (OPN), osterix (OSX), kolagen tipe I (COL1), core binding factor alpha 1 (CBFA), bone morphogenetic protein-2 (BMP2), dan Wnt3a, diperiksa dengan menggunakan PCR waktu nyata. Sel punca ligamen periodontal manusia (hPDLSC) dikultur pada pelat kultur yang dilapisi 0,5 µg/m, 1 µg/ml dan 2 µg/ml hDMP1 yang diproduksi oleh N. benthamiana, 2 µg/ml hDMP1 yang diproduksi oleh E. coli, dan tanaman tipe liar selama tiga hari.

MRNA diekstraksi dan dilakukan analisis RT-PCR untuk memeriksa ekspresi gen. Tingkat ekspresi gen-gen ini dibandingkan dengan sel yang tidak diberi perlakuan dan yang diberi perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana secara signifikan dapat menginduksi ekspresi gen ALP, BMP2, CBFA1, OSX, WNT3a, dan OPN (Gambar 43). Data ini menunjukkan bahwa hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana memiliki efek yang lebih tinggi terhadap diferensiasi osteogenik daripada hDMP1 yang diproduksi E. coli. Data ini mungkin merupakan efek dari modifikasi pasca-translasi yang mempengaruhi peningkatan aktivitas atau pengikatan pada reseptor.

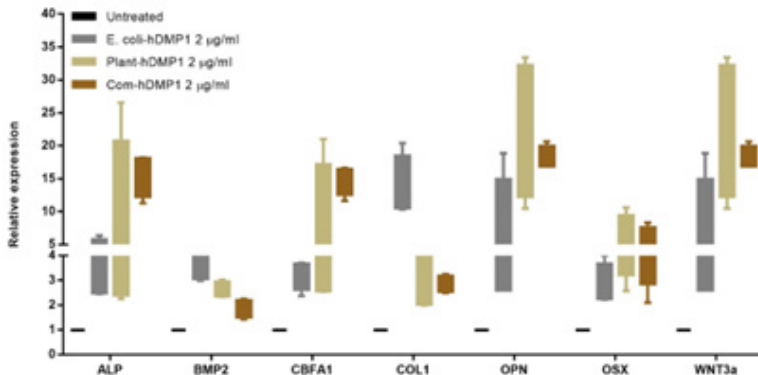
Penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa glikosilasi DMP1 seperti DMP1-PG (DMP1-S89) meningkatkan laminin dan ZO1. DMP1-PG meningkatkan tingkat ekspresi mRNA Runx2 dan ALP dari sel punca mesenkimial tulang (BMSC) yang dibandingkan dengan wild type (WT). Selain itu, DMP1-PG menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi untuk penyembuhan patah tulang dengan

mendorong kondrogenesis model tikus dibandingkan dengan kelompok WT. Selain itu, phosphorylated-DMP1 menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi sebagai nukleator HA dibandingkan tanpa modifikasi, dan menginduksi pembentukan susunan paralel kristalit dengan sumbu C yang sejajar. (Cai dkk., 2019; Eapen dkk., 2010; Tabatabaei dkk., 2013; Xue dkk., 2019). Data ini menunjukkan bahwa modifikasi pasca-translasi hDMP1 memiliki potensi untuk meningkatkan diferensiasi osteogenik sel.



Gambar 43. hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* menginduksi diferensiasi osteogenik. Penanda gen: ALP, BMP2, CBFA1, COL1, OSX, WNT3a, dan OPN.

Efek diferensiasi osteogenik dari hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* dibandingkan dengan hDMP1 komersial (yang diproduksi pada sel mieloma tikus). Berdasarkan data pada grafik (Gambar 44) menunjukkan ekspresi tertinggi pada hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* pada gen ALP, BMP2, CBFA1, OSX, WNT3a, dan OPN dibandingkan dengan hDMP1 yang diproduksi *E. coli* dan hDMP1 komersial. Mendukung konsep bahwa protein yang diproduksi oleh tanaman dapat mempengaruhi perilaku seluler yang mirip dengan protein yang diproduksi dalam sel mamalia. Sel ligamen periodontal manusia telah terbukti memiliki karakteristik sel punca mesenkim dan memainkan peran penting dalam perbaikan dan regenerasi jaringan periodontal, termasuk tulang alveolar (Carter, SSD 2017 & Li, Z. 2014).

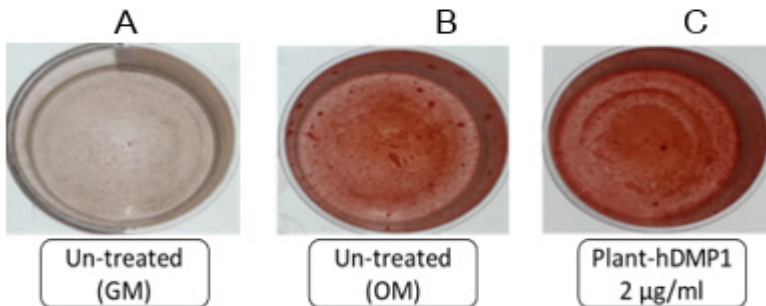


Gambar 44. Ringkasan protein hDMP1 rekombinan yang menginduksi diferensiasi osteogenik. Penanda gen: ALP, BMP2, CBFA1, COL1, OSX, WNT3a, dan OPN.

g. Uji kalsifikasi dari hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana

Pengaruh hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana terhadap kalsifikasi in vitro diperiksa. hPDLSC dikultur pada permukaan yang dilapisi dengan hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana sebanyak 2 µg/ml dalam medium osteogenik (OM) dan dibandingkan dengan sel yang tidak diobati. hPDLSC dalam medium umum (GM) digunakan sebagai kontrol negatif. Larutan alizarin red S digunakan untuk pewarnaan setelah dikultur selama 14 hari. Hasilnya menunjukkan bahwa sel yang tidak diobati dalam medium umum tidak menunjukkan deposisi kalsium.

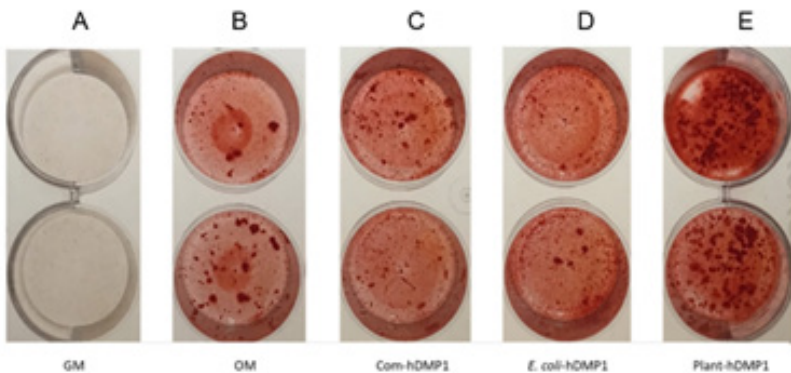
Menariknya, hPDLSC dalam medium osteogenik menunjukkan warna merah, yang diindikasikan sebagai pewarnaan alizarin red S yang positif. Namun, hDMP1 yang diproduksi oleh N. benthamiana menunjukkan intensitas warna merah yang lebih tinggi daripada sel yang tidak diobati (Gambar 45). Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa sel pulpa dan MCT3-E1 menunjukkan adanya pengendapan kalsium setelah diinkubasi selama 14 hari (Eapen et al., 2010; Widbiller dkk., 2018).



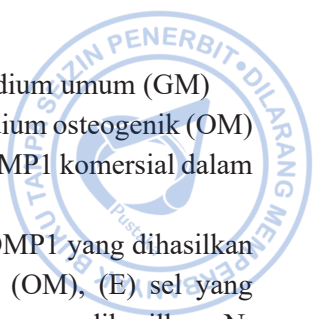
Gambar 45. Uji kalsifikasi hDMP1 yang diproduksi N. benthamiana.

- (A) Sel kontrol yang tumbuh dalam medium umum (GM)
- (B) sel kontrol yang tumbuh dalam medium osteogenik (OM)
- (C) sel yang diberi perlakuan 2 $\mu\text{g/ml}$ hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* dalam medium osteogenik (OM).

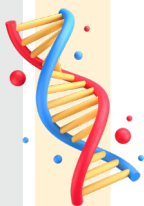
Efek pengendapan kalsifikasi dalam hPDLSC dari hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana*, hDMP1 yang diproduksi *E. coli*, dan hDMP1 komersial dibandingkan. Sel yang tidak diobati dikultur dalam media osteogenik (OM) dan media umum (GM) sebagai kontrol. hPDLSC diwarnai dengan larutan Alizarin red S setelah dikultur selama 14 hari. Data ini menunjukkan bahwa warna merah muncul pada medium osteogenik (OM). Namun, hDMP1 yang diproduksi oleh tanaman menunjukkan tingkat pengendapan kalsium yang lebih tinggi daripada hDMP1 yang diproduksi oleh *E. coli* dan hDMP1 komersial (Gambar 46). Terkait dengan penelitian sebelumnya, sel punca mesenkimal tulang (BMSC) dalam media osteogenik menunjukkan area bernoda mineralisasi yang lebih besar pada DMP1-PG daripada kelompok WT (dkk., 2019).



Gambar 46. Ringkasan uji kalsifikasi protein hDMP1 rekombinan.

- 
- (A) Sel kontrol yang tumbuh dalam medium umum (GM)
 - (B) sel kontrol yang tumbuh dalam medium osteogenik (OM)
 - (C) sel yang diobati dengan 2 $\mu\text{g/ml}$ hDMP1 komersial dalam medium osteogenik (OM)
 - (D) sel yang diobati dengan 2 $\mu\text{g/ml}$ hDMP1 yang dihasilkan *E. coli* dalam medium osteogenik (OM), (E) sel yang diobati dengan 2 $\mu\text{g/ml}$ hDMP1 yang dihasilkan *N. benthamiana* dalam medium osteogenik (OM).

Singkatnya, hDMP1 telah berhasil diproduksi di *N. benthamiana*. Hasil penelitian menunjukkan protein 100 kDa yang mengindikasikan adanya modifikasi pasca translasi. Selanjutnya, hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* dapat meningkatkan ekspresi penanda gen yang terkait dengan diferensiasi osteogenik dan deposisi kalsium pada hPDLSC. Namun, hasil ini juga mengkonfirmasi bahwa hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* dapat menginduksi diferensiasi osteogenik dan pengendapan kalsium yang lebih tinggi pada hPDLSCs daripada hDMP1 yang diproduksi *E. coli*. Selain itu, hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* sangat potensial sebagai kandidat baru untuk rekayasa jaringan sebagai molekul induktif. Namun, penelitian lebih lanjut untuk mendeteksi modifikasi pasca-translasi dan mekanisme molekuler hDMP1 pada diferensiasi osteogenik masih perlu diteliti.

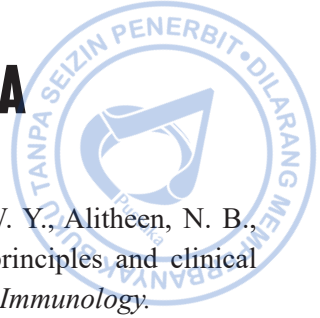


PENUTUP

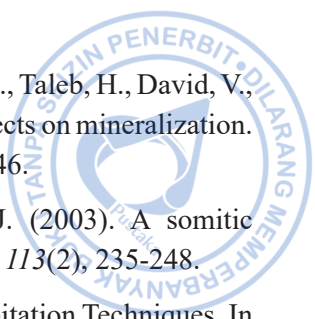
hDMP1 rekombinan telah diekspresikan secara produktif dalam hDMP1 yang diproduksi *E. coli* dan hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana*. hDMP1 rekombinan yang diproduksi di *E. coli* dan *N. benthamiana* menunjukkan pola yang berbeda. hDMP1 yang diproduksi *E. coli* menghasilkan 60 kDa dan 120. Protein hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* menunjukkan 100 kDa yang mengindikasikan adanya modifikasi pasca-translasi.

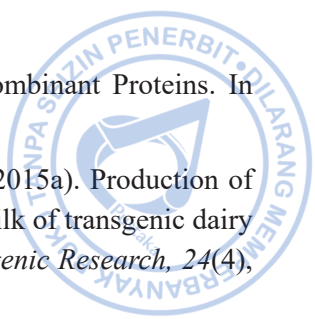
Protein hDMP1 rekombinan dapat menginduksi diferensiasi osteogenik dan pengendapan kalsium pada hPDLSC. Namun, hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* dapat menginduksi diferensiasi osteogenik dan deposisi kalsium lebih baik daripada hDMP1 yang diproduksi *E. coli*. Oleh karena itu, hDMP1 yang diproduksi *N. benthamiana* memiliki potensi untuk digunakan sebagai molekul induktif dalam rekayasa jaringan tulang.

DAFTAR PUSTAKA



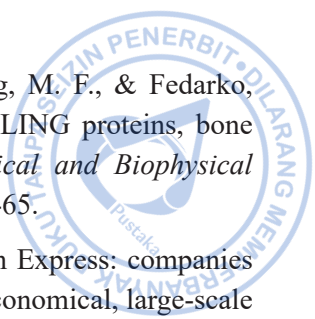
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B., & Hamid, M. (2012). scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical and Developmental Immunology*.
- Akter, F. (2016). Principles of Tissue Engineering. In *Tissue Engineering Made Easy* (pp. 3-16).
- Al-Qtaitat, A. I. (2014). A Review of Non-Collagenous Proteins; their Role in Bone. *American Journal of Life Sciences*, 2(6).
- Aumailley M, M. K., von der Mark H, Timpl R. (1989). Cell attachment properties of collagen type VI and Arg-Gly-Asp dependent binding to its $\alpha 2$ (VI) and $\alpha 3$ (VI) chains. *Experimental Cell Research*, 181(2), 463-474.
- Baumgarten T, Ytterberg AJ, Zubarev RA, de Gier JW. Optimizing recombinant protein production in the Escherichia coli periplasm alleviates stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018 Jun 15;84(12):e00270-18.
- Beniash, E., Deshpande, A. S., Fang, P. A., Lieb, N. S., Zhang, X., & Sfeir, C. S. (2011). Possible role of DMP1 in dentin mineralization. *Journal of Structural Biology*, 174(1), 100-106.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., . . . Schäfer, F. (2009). Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). In *Guide to Protein Purification, 2nd Edition* (pp. 439-473).
- Bonander, N., & Bill, R. M. (2012). Optimising yeast as a host for recombinant protein production (review). *Methods in Molecular Biology*, 866, 1-9.

- 
- Boskey, A. L., Chiang, P., Fermanis, A., Brown, J., Taleb, H., David, V., & Rowe, P. S. (2010). MEPE's diverse effects on mineralization. *Calcified Tissue International*, 86(1), 42-46.
- Brent, A. E., Schweitzer, R., & Tabin, C. J. (2003). A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell*, 113(2), 235-248.
- Burgess, R. R. (2009). Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. In *Guide to Protein Purification, 2nd Edition* (pp. 331-342).
- Butler, W. T., Brunn, J. C., & Qin, C. (2009). Dentin Extracellular Matrix (ECM) Proteins: Comparison to Bone ECM and Contribution to Dynamics of Dentinogenesis. *Connective Tissue Research*, 44(1), 171-178.
- Cai, M., Li, J., Yue, R., Wang, Z., & Sun, Y. (2019). Glycosylation of DMP1 maintains cranial sutures in mice. *Journal of Oral Rehabilitation*.
- Cao, D. V., Pamplona, R. S., Kim, J., Oh, Y. K., Cho, S.-K., Ahn, J., . . . Boo, K.-H. (2017). Optimization of Agrobacterium-mediated transient expression of heterologous genes in spinach. *Plant Biotechnology Reports*, 11(6), 397-405.
- Carter SS, Costa PF, Vaquette C, Ivanovski S, Hutmacher DW, Malda J. Additive biomanufacturing: an advanced approach for periodontal tissue regeneration. *Annals of biomedical engineering*. 2017 Jan 1;45(1):12-22.
- Chen, J., Lin, B., Huang, Q., Hu, L., Zhuo, K., & Liao, J. (2017). A novel *Meloidogyne graminicola* effector, MgGPP, is secreted into host cells and undergoes glycosylation in concert with proteolysis to suppress plant defenses and promote parasitism. *PLOS Pathogens*, 13(4), e1006301.

- 
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2016). Recombinant Proteins. In *Biotechnology* (pp. 335-363).
- Cooper, C. A., Maga, E. A., & Murray, J. D. (2015a). Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future. *Transgenic Research*, 24(4), 605-614.
- Dalton, A. C., & Barton, W. A. (2014). Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Science*, 23(5), 517-525.
- Daniell H SS, & K, W. (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in plant science*, 6 (5), 219-226.
- De Isla, N., Huseltein, C., Jessel, N., Pinzano, A., Decot, V., Magdalou, J., . . . Stoltz, J. F. (2010). Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 20(3), 127-133.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306.
- Deribe, Y. L., Pawson, T., & Dikic, I. (2010). Post-translational modifications in signal integration. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(6), 666-672.
- Deshpande, A. S., Fang, P. A., Zhang, X., Jayaraman, T., Sfeir, C., & Beniash, E. (2011). Primary structure and phosphorylation of dentin matrix protein 1 (DMP1) and dentin phosphophoryn (DPP) uniquely determine their role in biomineralization. *Biomacromolecules*, 12(8), 2933-2945.

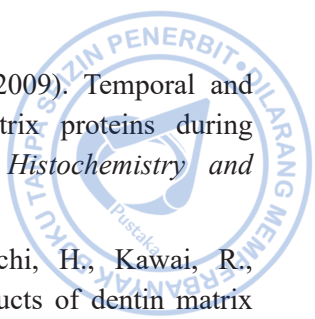
- Dolgova, A. S., & Dolgov, S. V. (2019). Matrix attachment regions as a tool to influence plant transgene expression. *3 Biotech*, 9(5), 176.
- Duong LT, R. G. (1998). Integrin-mediated signalling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. . *Front Biosci*, 1(3), 757-768.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., . . . Blattner, F. R. (2008). The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2597-2606.
- Eapen AS, S. P., Song Y, Ravindran S, Ramachandran A, Tiruppathi C, George A. (2010). Calcium-mediated stress kinase activation by DMP1 promotes osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 194, 255–260.
- Eapen, A., Ramachandran, A., Pratap, J., & George, A. (2011). Activation of the ERK1/2 mitogen-activated protein kinase cascade by dentin matrix protein 1 promotes osteoblast differentiation. *Cells Tissues Organs*, 194(2-4), 255-260.
- Eapen, A., Sundivakkam, P., Song, Y., Ravindran, S., Ramachandran, A., Tiruppathi, C., & George, A. (2010). Calcium-mediated stress kinase activation by DMP1 promotes osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36339-36351.
- El-Battari, A., Prorok, M., Angata, K., Mathieu, S., Zerfaoui, M., Ong, E., . . . Fukuda, M. (2003). Different glycosyltransferases are differentially processed for secretion, dimerization, and autoglycosylation. *Glycobiology*, 13(12), 941-953.
- Emery, J. C., McDonald, P. J., & O’leary, R. (2018). Protein purification. In: Google Patents.

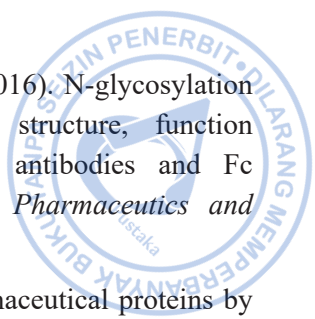
- F Tabatabaei FS, A. J., Kashi TS, Khazaei M, Kajbafzadeh AM, Ghanbari Z. (2013). Effect of dentine matrix proteins on human endometrial adult stem-like cells: in vitro regeneration of odontoblasts cells. *Archives of Oral Biology*, 58(7), 871-879.
- Fahimeh S.Tabatabaei, J. A., Tahereh S. Jafarzadeh Kashi, MozafarKhazaei, Abdol-MohammadKajbafzadeh, ZinatGhanbarif. (2013). Effect of dentine matrix proteins on human endometrial adult stem-like cells: in vitro regeneration of odontoblasts cells. . *Archives of oral biology.*, Jul 1; 58((7)), 871-879.
- Fedarko, N. S., Fohr, B., Robey, P. G., Young, M. F., & Fisher, L. W. (2000). Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16666-16672.
- Feng, J. Q., Huang, H., Lu, Y., Ye, L., Xie, Y., Tsutsui, T. W., . . . Mishina, Y. (2003). The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *Journal of Dental Research*, 82(10), 776-780.
- Feng, J. Q., Ward, L. M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., . . . White, K. E. (2006). Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nature genetics*, 38(11), 1310-1315.
- Feng, J. Q., Zhang, J., Dallas, S. L., Lu, Y., Chen, S., Tan, X., . . . Macdougall, M. (2002). Dentin matrix protein 1, a target molecule for Cbfa1 in bone, is a unique bone marker gene. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(10), 1822-1831.
- Fernandez-Yague, M. A., Abbah, S. A., McNamara, L., Zeugolis, D. I., Pandit, A., & Biggs, M. J. (2015). Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, 1-29.

- 
- Fisher, L. W., Torchia, D. A., Fohr, B., Young, M. F., & Fedarko, N. S. (2001). Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(2), 460-465.
- Fitzgerald, D. A. (2003). Revving up the Green Express: companies explore the use of transgenic plants for economical, large-scale protein expression. *The Scientist*, 17(14), 45-48.
- Foss, D. V., Schirle, N. T., MacRae, I. J., & Pezacki, J. P. (2019). Structural insights into interactions between viral suppressor of RNA silencing protein p19 mutants and small RNAs. *FEBS Open Bio*, 9(6), 1042-1051.
- Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*(6), 253.
- Gaciarz, A., Khatri, N. K., Velez-Suberbie, M. L., Saaranen, M. J., Uchida, Y., Keshavarz-Moore, E., & Ruddock, L. W. (2017). Efficient soluble expression of disulfide bonded proteins in the cytoplasm of Escherichia coli in fed-batch fermentations on chemically defined minimal media. *Microb Cell Fact*, 16(1), 108.
- Gaciarz, A., Veijola, J., Uchida, Y., Saaranen, M. J., Wang, C., Horkko, S., & Ruddock, L. W. (2016). Systematic screening of soluble expression of antibody fragments in the cytoplasm of E. coli. *Microbial Cell Factories*, 15, 22.
- Gajanan V. Kulkarni, B. C., James P. Malone, A. Sampath Narayanan, Anne George, Arthur Veis. (1999). Promotion of selective cell attachment by the RGD sequence in dentine matrix protein 1. *Archives of Oral Biology*, Jun 1;45(6), 475-484.

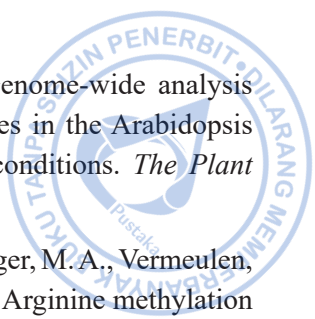
- Gajjeraman, S., Narayanan, K., Hao, J., Qin, C., & George, A. (2007). Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1193-1204.
- Galvao-Moreira, L. V., & Branco-de-Almeida, L. S. (2016). Letter to the Editor: Impact of Overloading on Temporomandibular Joint Osteoarthritis. *Journal of Dental Research*, 95(1), 119.
- Garneau-Tsodikova, K. D. G. a. S. (2010). Posttranslational Modification of Proteins. *Chemistry and Biology*, 5, 433-468.
- Gattineni, J., Bates, C., Twombly, K., Dwarakanath, V., Robinson, M. L., Goetz, R., . . . Baum, M. (2009). FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 297(2), 282-291.
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37.
- George A, & A, V. (2008). Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chemical Reviews*, Oct 3 108 (11), 4670-4693.
- George A, S. B., Simonian PA, & A, V. (1993). Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *Journal of Biological Chemistry*, Jun 15(268 (17)), 12624-12630.
- George A, S. B., Simonian PA, Veis A. (1993). Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12624-12630.

- Gerasimova, S. V., Smirnova, O. G., Kochetov, A. V., & Shumnyi, V. K. (2016). Production of recombinant proteins in plant cells. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(1), 26-37.
- Gibson, M. P., Zhu, Q., Wang, S., Liu, Q., Liu, Y., Wang, X., . . . Lu, Y. (2013). The rescue of dentin matrix protein 1 (DMP1)-deficient tooth defects by the transgenic expression of dentin sialophosphoprotein (DSPP) indicates that DSPP is a downstream effector molecule of DMP1 in dentinogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(10), 7204-7214.
- Gleba, Y., Klimyuk, V., & Marillonnet, S. (2005). Magniffection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 23(17-18), 2042-2048.
- Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., . . . Gunsalus, K. C. (2008). Protein production and purification. *Nature Methods*, 5(2), 135-146.
- Greene, J. J. (2004). Host cell compatibility in protein expression. In *Recombinant Gene Expression*. Humana press, 3-14.
- Gulseren, G., Yasa, I. C., Ustahuseyin, O., Tekin, E. D., Tekinay, A. B., & Guler, M. O. (2015). Alkaline Phosphatase-Mimicking Peptide Nanofibers for Osteogenic Differentiation. *Biomacromolecules*, 16(7), 2198-2208.
- H.F. Rios, L. Y., V. Dusevich, D. Eick, L.F. Bonewald, J.Q. Feng. (2005). DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *Journal Musculoskelet Neuronal Interact*, 5(4), 325-327.
- Hao, J., Narayanan, K., Muni, T., Ramachandran, A., & George, A. (2007). Dentin matrix protein 4, a novel secretory calcium-binding protein that modulates odontoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15357-15365.

- 
- Hao, J., Ramachandran, A., & George, A. (2009). Temporal and spatial localization of the dentin matrix proteins during dentin biomineralization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(3), 227-237.
- Hase, N., Ozeki, N., Hiyama, T., Yamaguchi, H., Kawai, R., Kondo, A., . . . Mogi, M. (2015). Products of dentin matrix protein-1 degradation by interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinase-3 promote proliferation of odontoblastic cells. *BioScience Trends*, 9(4), 228-236.
- He G, Gajjerman S, Schultz D, Cookson D, Qin C, Butler WT, . . . A, G. (2005). Spatially and temporally controlled biomineralization is facilitated by interaction between self-assembled dentin matrix protein 1 and calcium phosphate nuclei in solution. *Biochemistry, Dec 13*(44 (49)), 16140-16148.
- He, G., & George, A. (2004). Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11649-11656.
- He, G., Dahl, T., Veis, A., & George, A. (2003). Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nature Materials*, 2(8), 552-558.
- He, Y., Wang, K., & Yan, N. (2014). The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins. *Protein Cell*, 5(9), 658-672.
- Hendow, E. K., Guhmann, P., Wright, B., Sofokleous, P., Parmar, N., & Day, R. M. (2016). Biomaterials for hollow organ tissue engineering. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 9, 3.

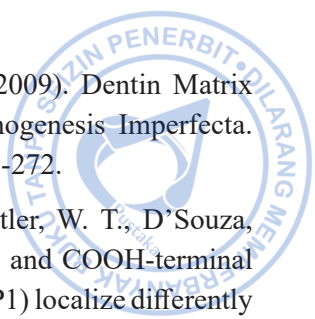
- 
- Higel, F., Seidl, A., Sorgel, F., & Friess, W. (2016). N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 100, 94-100.
- Houdebine, L. M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(2), 107-121.
- Howe, C., 2007. Gene Cloning and Manipulation Second Edition.
- Huang, Z., Chen, Q., Hjelm, B., Arntzen, C., & Mason, H. (2009). A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(4), 706-714.
- Hyne, R. (2009). The Extracellular Matrix: Biomaterials for Tissue Engineerin. *Spatial Cell Biology*, 326 1216-1219.
- Jenkins, N., & Curling, E. M. (1994). Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme and microbial technology*, 16(5), 354-364.
- Jiang, P., Zhang, K., Ding, Z., He, Q., Li, W., Zhu, S., . . . Li, K. (2018). Characterization of a strong and constitutive promoter from the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene AtSCPL30 as a potential tool for crop transgenic breeding. *BMC Biotechnology*, 18(1), 59.
- Jing, B., Zhang, C., Liu, X., Zhou, L., Liu, J., Yao, Y., . . . Sun, Y. E. (2018). Glycosylation of dentin matrix protein 1 is a novel key element for astrocyte maturation and BBB integrity. *Protein Cell*, 9(3), 298-309.

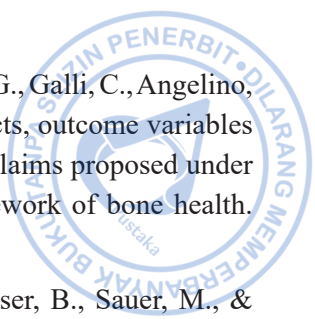
- Julian K -C. Ma, E. B., Ralph Bock, Paul Christou, Philip J. Dale, Philip J. Dix, Rainer Fischer, Judith Irwin, Richard Mahoney, Mario Pezzotti, Stefan Schillberg, Penny Sparrow, Eva Stoger, Richard M. Twyman. (2005). Molecular farming for new drugs and vaccines. *EMBO reports*, Jul 1;6(7), 593-599.
- Kaelin, W. G. (2005). Proline hydroxylation and gene expression. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 115-128.
- Kang, S. W., Kim, J. S., Park, K. S., Cha, B. H., Shim, J. H., Kim, J. Y., . . . Lee, S. H. (2011). Surface modification with fibrin/hyaluronic acid hydrogel on solid-free form-based scaffolds followed by BMP-2 loading to enhance bone regeneration. *Bone*, 48(2), 298-306.
- Karen L. Hirst, Darrin Simmons, Jian Feng, Helen Aplin, Michael J. Dixon, & MacDougall, M. (1997). Elucidation of the Sequence and the Genomic Organization of the Human Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1 (DMP1) Gene: Exclusion of the Locus from a Causative Role in the Pathogenesis of Dentinogenesis Imperfecta Type II. *Genomics*, 42, 38–45.
- Karg, S. R., & Kallio, P. T. (2009). The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnology Advances*, 27(6), 879-894.
- Karlaftis V, Perera S, Monagle P, Ignjatovic V. Importance of post-translational modifications on the function of key haemostatic proteins. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2016 Jan 1;27(1):1-4.
- Kim, S. G., Lee, D. S., Lee, S., & Jang, J. H. (2015). Osteocalcin/fibronectin-functionalized collagen matrices for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(6), 2133-2140.

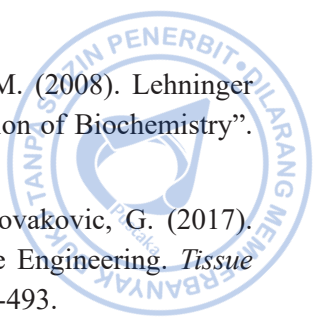
- 
- Kim, S. I., Veena, & Gelvin, S. B. (2007). Genome-wide analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration sites in the *Arabidopsis* genome generated under non-selective conditions. *The Plant Journal*, 51(5), 779-791.
- Kirmizis, A., Santos-Rosa, H., Penkett, C. J., Singer, M. A., Vermeulen, M., Mann, M., . . . Kouzarides, T. (2007). Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature*, 449(7164), 928-932.
- Knecht, S., Ricklin, D., Eberle, A. N., & Ernst, B. (2009). Oligohistags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. *Journal of Molecular Recognition*, 22(4), 270-279.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705.
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Daskocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6 Pt 2), 1024-1042.
- Kulkarni GV, C. B., Malone JP, Narayanan AS, George A. (2000). Promotion of selective cell attachment by the RGD sequence in dentine matrix protein 1. *Archives of Oral Biology*, 45(6), 475-484.
- Kulkarni GV, Chen B, Malone JP, Narayanan AS, & A., G. (2000). Promotion of selective cell attachment by the RGD sequence in dentine matrix protein 1. *Archives of Oral Biology*, 1(6), 475-484.
- Langenbach, F., & Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(5), 117.

- Lee, J. H., Kim, C. S., Choi, K. H., Jung, U. W., Yun, J. H., Choi, S. H., & Cho, K. S. (2010). The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in *Escherichia coli*. *Biomaterials*, 31(13), 3512-3519.
- Lee, J. W., Yamaguchi, A., & Iimura, T. (2014). Functional heterogeneity of osteocytes in FGF23 production: the possible involvement of DMP1 as a direct negative regulator. *Bonekey Reports*, 3, 543.
- Levengood, S. L., & Zhang, M. (2014a). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161-3184.
- Li Z, Jiang CM, An S, Cheng Q, Huang YF, Wang YT, Gou YC, Xiao L, Yu WJ, Wang J. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral diseases*. 2014 Jan;20(1):25-34.
- Lien, Y. C., Kung, H. N., Lu, K. S., Jeng, C. J., & Chau, Y. P. (2008). Involvement of endoplasmic reticulum stress and activation of MAP kinases in B-lapachone-induced human prostate cancer cell apoptosis. *Histology & Histopathology*, 23, 1299-1308.
- Lin, S., & Feng, J. J. Q. (2015). Molecular Genetics Of Pediatric Orthopaedic Disorders “DMP-1 in Postnatal Bone Development”. *Springer New York Heidelberg Dordrecht London*, 57-70.
- Ling, Y., Rios, H. F., Myers, E. R., Lu, Y., Feng, J. Q., & Boskey, A. L. (2005). DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(12), 2169-2177.

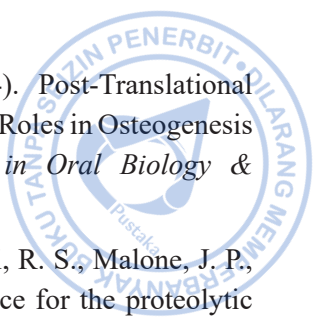
- Liu, J., Qian, C., & Cao, X. (2016). Post-Translational Modification Control of Innate Immunity. *Immunity*, 45(1), 15-30.
- Liu, S., Gupta, A., & Quarles, L. D. (2007). Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone–kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 16(4), 329-335.
- Liz J. Richter, Y. T., Charles J. Arntzen, and Hugh S. Mason. (2000). Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnology*, 2000 Nov;18((11)), 1167.
- Lorenz-Depiereux, B., Bastepe, M., Benet-Pages, A., Amyere, M., Wagenstaller, J., Muller-Barth, U., . . . Strom, T. M. (2006). DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nature Genetics*, 38(11), 1248-1250.
- Lu, Y., Ye, L., Yu, S., Zhang, S., Xie, Y., McKee, M. D., . . . Feng, J. Q. (2007). Rescue of odontogenesis in Dmp1-deficient mice by targeted re-expression of DMP1 reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition in vivo. *Developmental Biology*, 303(1), 191-201.
- Lu, Y., Yuan, B., Qin, C., Cao, Z., Xie, Y., Dallas, S. L., . . . Feng, J. Q. (2011). The biological function of DMP-1 in osteocyte maturation is mediated by its 57-kDa C-terminal fragment. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), 331-340.
- Luckow, V. A., & Summers, M. D. (1998). Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnology and Bioengineering*, 6, 47.

- 
- Macedougall, M., Gu, T. T., & Simmons, D. (2009). Dentin Matrix Protein-1, A Candidate Gene for Dentinogenesis Imperfecta. *Connective Tissue Research*, 35(1-4), 267-272.
- Maciejewska, I., Cowan, C., Svoboda, K., Butler, W. T., D'Souza, R., & Qin, C. (2009). The NH2-terminal and COOH-terminal fragments of dentin matrix protein 1 (DMP1) localize differently in the compartments of dentin and growth plate of bone. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(2), 155-166.
- Maglic, D., Stovall, D. B., Cline, J. M., Fry, E. A., Mallakin, A., Taneja, P., . . . Inoue, K. (2015). DMP1beta, a splice isoform of the tumour suppressor DMP1 locus, induces proliferation and progression of breast cancer. *The Journal of Pathology*, 236(1), 90-102.
- Maldonado, L. M., Hernandez, V. E., Rivero, E. M., Barba de la Rosa, A. P., Flores, J. L., Acevedo, L. G., & De Leon Rodriguez, A. (2007). Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in Escherichia coli using response surface methodology: the case of human interferon beta. *Biomolecular Engineering*, 24(2), 217-222.
- Malik, A., Alsenaidy, A. M., Elrobh, M., Khan, W., Alanazi, M. S., & Bazzi, M. D. (2016). Optimization of expression and purification of HSPA6 protein from Camelus dromedarius in E. coli. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(3), 410-419.
- Mann, M., & Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, 21(3), 255.
- Mariam, S. H. S., Ooi, C. W., Tan, W. S., Janna, O. A., Arbakariya, A., & Tey, B. T. (2015). Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. *Separation and Purification Technology*, 144, 133-138.

- 
- Martini, D., Guareschi, C., Biasini, B., Bedogni, G., Galli, C., Angelino, D., . . . Del Rio, D. (2018). Claimed effects, outcome variables and methods of measurement for health claims proposed under Regulation (EC) 1924/2006 in the framework of bone health. *PharmaNutrition*, 6(1), 17-36.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., & Porro, D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. *Methods in Molecular Biology*, 824, 329-358.
- Matthews, C. B., Wright, C., Kuo, A., Colant, N., Westoby, M., & Love, J. C. (2017). Reexamining opportunities for therapeutic protein production in eukaryotic microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(11), 2432-2444.
- Monique Aumailley, K. M., & Helga Von Der Mark, A. R. T. (1989). Cell Attachment Properties of Collagen Type VI and Arg-Gly-Asp Dependent Binding to its $\alpha 2(VI)$ and $\alpha 3(VI)$ Chains *Experimental Cell Research*, 181, 463-474.
- Mor, T. S., Moon, Y. S., Palmer, K. E., & Mason, H. S. (2003). Geminiviral vectors for high-level expression of foreign proteins in plant cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(4), 430-437.
- Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8), 773-785.
- Narayanan, K., Ramachandran, A., Hao, J., He, G., Park, K. W., Cho, M., & George, A. (2003). Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca^{2+} store. *The journal of Biological Chemistry*, 278(19), 17500-17508.

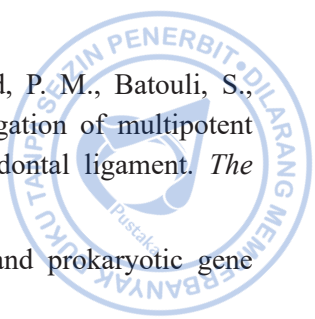
- 
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). Lehninger principles of biochemistry.”The Foundation of Biochemistry”. *Macmillan Education*, 1-1119.
- Ng, J., Spiller, K., Bernhard, J., & Vunjak-Novakovic, G. (2017). Biomimetic Approaches for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 23(5), 480-493.
- Nishino, J., Yamazaki, M., Kawai, M., Tachikawa, K., Yamamoto, K., Miyagawa, K., . . . Michigami, T. (2017). Extracellular Phosphate Induces the Expression of Dentin Matrix Protein 1 Through the FGF Receptor in Osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(5), 1151-1163.
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., & Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, 14, 71.
- Novy, R. (2001). Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Innovations*, 12, 1-3.
- Ogbureke, K. U., Nikitakis, N. G., Warburton, G., Ord, R. A., Sauk, J. J., Waller, J. L., & Fisher, L. W. (2007). Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. *Oral Oncology*, 43(9), 920-932.
- Osathanon, T., Ritprajak, P., Nowwarote, N., Manokawinchoke, J., Giachelli, C., & Pavasant, P. (2013). Surface-bound orientated Jagged-1 enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. *Journal Biomedical Material Research A*, 101(2), 358-367.
- Osborne, C., & Brooks, S. A. (2006). SDS-PAGE and Western blotting to detect proteins and glycoproteins of interest in breast cancer research, In *Breast Cancer Research Protocols. Humana Press, Totowa*, 217-229

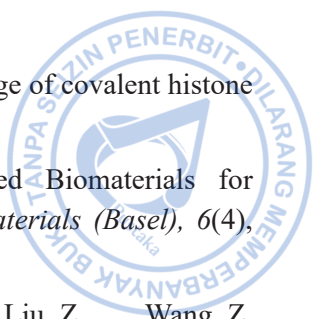
- Oya, K., Ishida, K., Nishida, T., Sato, S., Kishino, M., Hirose, K., . . . Toyosawa, S. (2017). Immunohistochemical analysis of dentin matrix protein 1 (Dmp1) phosphorylation by Fam20C in bone: implications for the induction of biomineralization. *Histochemistry and Cell Biology*, 147(3), 341-351.
- Padovano, J. D., Ravindran, S., Snee, P. T., Ramachandran, A., Bedran-Russo, A. K., & George, A. (2015). DMP1-derived peptides promote remineralization of human dentin. *Journal of Dental Research*, 94(4), 608-614.
- Palomares LA, Estrada-Moncada S, & OT, R. (2004). Production of recombinant proteins. *Humana Press*, 15-51.
- Pan SH, Malcolm BA. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *Biotechniques*. 2000 Dec;29(6):1234-8.
- Peng Y, He Y, Wu Z, L. J., & C, L. (2014). Screening and optimization of low-cost medium for *Pseudomonas putida* Rs-198 culture using RSM. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 1229-1237.
- Phoolcharoen, W., Prehaud, C., van Dolleweerd, C. J., Both, L., da Costa, A., Lafon, M., & Ma, J. K. (2017). Enhanced transport of plant-produced rabies single-chain antibody-RVG peptide fusion protein across an in cellulo blood-brain barrier device. *Plant Biotechnology Journal*, 15(10), 1331-1339.
- Qin C, B. O., Butler WT. (2004). Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(3), 126-136.
- Qin C, D. S. R., Feng JQ. (2007). Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *Journal of Dental Research*, 86(12), 1134-1141.

- 
- Qin, C., Baba, O., & Butler, W. T. (2004). Post-Translational Modifications of Sibling Protein and Ther Roles in Osteogenesis and Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(3), 126-136.
- Qin, C., Brunn, J. C., Cook, R. G., Orkiszewski, R. S., Malone, J. P., Veis, A., & Butler, W. T. (2003). Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34700-34708.
- Quarles, L. D. (2012). Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease. *Experimental Cell Research*, 318(9), 1040-1048.
- Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., . . . Dikic, I. (2009). Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell*, 136(6), 1098-1109.
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., . . . Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, 520(7546), 186-191.
- Rattanapisit, K., Abdulheem, S., Chaikawkaew, D., Kubera, A., Mason, H. S., Ma, J. K., . . . Phoolcharoen, W. (2017). Recombinant human osteopontin expressed in Nicotiana benthamiana stimulates osteogenesis related genes in human periodontal ligament cells. *Scientific Reports*, 7(1), 17358.
- Rattanapisit, K., Srijangwad, A., Chuanasa, T., Sukrong, S., Tantituvanont, A., Mason, H. S., . . . Phoolcharoen, W. (2017). Rapid Transient Production of a Monoclonal Antibody Neutralizing the Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) in Nicotiana benthamiana and Lactuca sativa. *Planta Medica*, 83(18), 1412-1419.

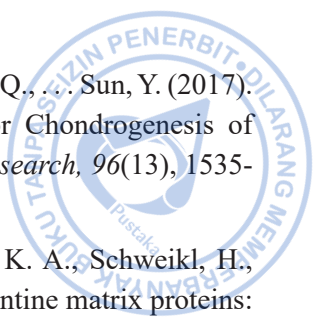
- Regnard, G. L., Halley-Stott, R. P., Tanzer, F. L., Hitzeroth, II, & Rybicki, E. P. (2010). High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminiviral shuttle vector. *Plant Biotechnology Journal*, 8(1), 38-46.
- Rezai Rad, M., Liu, D., He, H., Brooks, H., Xiao, M., Wise, G. E., & Yao, S. (2015). The role of dentin matrix protein 1 (DMP1) in regulation of osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells (DFSCs). *Archives of Oral Biology*, 60(4), 546-556.
- Riggs PD. Overview of Protein Expression Vectors for E. coli. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2018 Nov;17(1):e23.
- Rodan, L. T. D. a. G. A. (1998). Integrin-Mediated Signalling In The Regulation Of Osteoclast Adhesion And Activation. *Frontiers in Bioscience*, 1, 757-768.
- Rodriguez-Vazquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zuniga, R., Saldana-Koppel, D. A., & Quinones-Olvera, L. F. (2015). Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Research International*, 2015, 821279.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.
- Rosenthal, A. K. (2007). The role of noncollagenous proteins in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5), 449-453.
- Rowe, P. S., Kumagai, Y., Gutierrez, G., Garrett, I. R., Blacher, R., Rosen, D., . . . Mundy, G. R. (2004). MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minhibin. *Bone*, 34(2), 303-319.

- S. Toyosawas, S. S., T. Fujiwara, T. Ooshima, A. Sato, N. Ijuhin, T. Komoria. (2001). Dentin Matrix Protein 1 Is Predominantly Expressed in Chicken and Rat Osteocytes But Not in Osteoblasts. *Journal of Bone And Mineral Research*, 16(11), 2017-2016.
- Sadeghi, H. M. M., Dormiani, K., Khazaie, Y., Rabbani, M., & Moazen, F. (2007). Cloning and expression of a human tissue plasminogen activator variant: K2S in Escherichia coli. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 946-949.
- Sadeghi, H. M. M., Rabbani, M., Rismani, E., Moazen, F., Khodabakhsh, F., Dormiani, K., & Khazaei, Y. (2011). Optimization of the expression of reteplase in Escherichia coli. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 87-92.
- Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1-2), 249-264.
- Sangeeta N. Bhatia, G. H. U., Kenneth S. Zaret, Ira J. Fox. (2014). Cell and tissue engineering for liver disease. *Science Translational Medicine*, 16;6((245)), 245sr242-.
- Schneider, H. K. (2013). Quantitative analysis of proteins facilitating fatty acid uptake: CD36, Caveolin-1, FATP4 and ACSL1 *Doctoral Dissertation*.
- Seetha R. Thotakura, Narayanan Karthikeyan, Taryn Smith, Kai Liu, & George, A. (2000). Cloning and Characterization of Rat Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) Gene and Its 5'-Upstream Region. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (14)(7), 10272–10277.

- 
- Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., . . . Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*, 364(9429), 149-155.
- Shafee, T., & Lowe, R. (2017). Eukaryotic and prokaryotic gene structure. *WikiJournal of Medicine*, 4(1).
- Sheludko, Y. V., Sindarovska, Y. R., Gerasymenko, I. M., Bannikova, M. A., & Kuchuk, N. V. (2007). Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(3), 608-614.
- Shrivats, A. R., McDermott, M. C., & Hollinger, J. O. (2014). Bone tissue engineering: state of the union. *Drug Discovery Today*, 19(6), 781-786.
- Spiestersbach, A., Kubicek, J., Schafer, F., Block, H., & Maertens, B. (2015). Purification of His-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology*, 559, 1-15.
- Srinivasan, R., Chen, B., Gorski, J. P., & George, A. (2009). Recombinant Expression and Characterization of Dentin Matrix Protein 1. *Connective Tissue Research*, 40(4), 251-258.
- Staines, K. A., MacRae, V. E., & Farquharson, C. (2012). The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *Journal of Endocrinology*, 214(3), 241.
- Steiglitz, B. M., Ayala, M., Narayanan, K., George, A., & Greenspan, D. S. (2004). Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 980-986.

- 
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41.
- Sun, J., & Tan, H. (2013). Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)*, 6(4), 1285-1309.
- Sun, Y., Weng, Y., Zhang, C., Liu, Y., Kang, C., Liu, Z., . . . Wang, Z. (2015). Glycosylation of Dentin Matrix Protein 1 is critical for osteogenesis. *Scientific Reports*, 5(1).
- Tagliabracci, V. S., Engel, J. L., Wen, J., Wiley, S. E., Worby, C. A., Kinch, L. N., . . . Dixon, J. E. (2012). Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science*, 336(6085), 1150-1153.
- Taniguchi, T., Woodward, A. M., Magnelli, P., McColgan, N. M., Lehoux, S., Jacobo, S. M. P., . . . Argueso, P. (2017). N-Glycosylation affects the stability and barrier function of the MUC16 mucin. *Journal of Biological Chemistry*, 292(26), 11079-11090.
- Tartaix, P. H., Doulaverakis, M., George, A., Fisher, L. W., Butler, W. T., Qin, C., . . . Boskey, A. L. (2004). In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18115-18120.
- Terasawa, M., Shimokawa, R., Terashima, T., Ohya, K., Takagi, Y., & Shimokawa, H. (2004). Expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) in nonmineralized tissues. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 22(5), 430-438.
- Thomas Bruce R VDA, & K, B. (2002). Production of therapeutic proteins in plants. *UCANR Publications*, 1.

- Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., . . . Iwai, K. (2009). Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nature Cell Biology*, 11(2), 123-132.
- Toyosawa, S., Shintani, S., Fujiwara, T., Ooshima, T., Sato, A., Ijuhin, N., & Komori, T. (2001). Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(11), 2017-2026.
- Twyman, R. M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., & Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, 21(12), 570-578.
- Ullrich, A., & Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61(2), 203-212.
- V. Yusibov, D. C. H., S.V. Spitsin, N. Fleysh, R.B. Kean, T. Mikheeva, D. Deka, Aenlle, K. K. A. Karasev, S.Cox, J. Randall, H. Koprowski. (2002). Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine*, 20, 3155–3164.
- Viktorova, J., Jandova, Z., Madlenakova, M., Prouzova, P., Bartunek, V., Vrchotova, B., . . . Macek, T. (2016). Native Phytoremediation Potential of *Urtica dioica* for Removal of PCBs and Heavy Metals Can Be Improved by Genetic Manipulations Using Constitutive CaMV 35S Promoter. *PLoS One*, 11(12), e0167927.
- Walsh, G., & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1241-1252.

- 
- Weng, Y., Liu, Y., Du, H., Li, L., Jing, B., Zhang, Q., . . . Sun, Y. (2017). Glycosylation of DMP1 Is Essential for Chondrogenesis of Condylar Cartilage. *Journal of Dental Research*, 96(13), 1535-1545. Retrieved from
- Widbillier, M., Eidt, A., Lindner, S. R., Hiller, K. A., Schweikl, H., Buchalla, W., & Galler, K. M. (2018). Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells. *International Endodontic Journal*, 51 Suppl 4, e278-e290.
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 80, 6 1 1-35.
- Wong, M. S., Wu, S., Causey, T. B., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2008). Reduction of acetate accumulation in Escherichia coli cultures for increased recombinant protein production. *Metabolic Engineering*, 10(2), 97-108.
- Xue, H., Tao, D., Weng, Y., Fan, Q., Zhou, S., Zhang, R., . . . Sun, Y. (2019). Glycosylation of dentin matrix protein 1 is critical for fracture healing via promoting chondrogenesis. *Frontiers Medicine*, 13(5), 575-589.
- Ye, L., MacDougall, M., Zhang, S., Xie, Y., Zhang, J., Li, Z., . . . Feng, J. Q. (2004). Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 19141-19148.
- Ye, L., Mishina, Y., Chen, D., Huang, H., Dallas, S. L., Dallas, M. R., . . . Feng, J. Q. (2005). Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 6197-6203.

- Yoshihisa Oda YN, & Fukuda, H. (2018). Reconstruction of ROP GTPase Domains on the Plasma Membrane in Tobacco Leaves. *In Rho GTPases 2018 Humana Press, New York, NY, Chapter 26* 393-399.
- Zagorskaya AA, Deineko EV. Suspension-cultured plant cells as a platform for obtaining recombinant proteins. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2017 Nov 1;64(6):795-807.
- Zaiquan Cheng, Targolli, J., & Wu, R. (2001). Tobacco matrix attachment region sequence increased transgene expression levels in rice plants. *Molecular Breeding*, 7, 317–327.
- Zhang, Y., Wei, X., Lu, Z., Pan, Z., Gou, X., Venkitasamy, C., . . . Zhao, L. (2017). Optimization of culturing conditions of recombined *Escherichia coli* to produce umami octopeptide-containing protein. *Food Chemistry*, 227, 78-84.
- Zhao, Y., Wang, Y., & Zhu, W. G. (2011). Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(5), 276-282

PENULIS



Aktsar Roskiana Ahmad, lahir di Enrekang pada tanggal 03 Juli 1984. Menyelesaikan sekolah dasar hingga sekolah menengah atas di Bumi Masesenrenpulu. Pada tahun 2006 menyelesaikan studi Sarjana Satu (S1) di Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia dan melanjutkan program profesi

apoteker (apt) di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin tahun 2008. Tahun 2010-2012 melanjutkan studi magister farmasi (M.Farm) di Fakultas Farmasi Universitas Indonesia. Saat ini sedang melanjutkan pendidikan doktoral (Ph.D) Tahun 2017-2020 di Negeri Gajah Putih di Departement Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand. Saat ini sebagai Wakil Dekan II Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia, Makassar.



REKAYASA GENETIKA

PRODUKSI BIOLOGI FARMASI

Protein rekombinan dihasilkan dari manipulasi gen yang dihasilkan dalam beberapa cara untuk mengekspresikan dan memproduksi produk komersial yang bermanfaat. Teknik ekspresi DNA rekombinan telah digunakan untuk produksi antibodi, vaksin, protein terapeutik disamakan seperti antibodi rantai tunggal rabies-RVG (Phoolcharoen dkk., 2017), antibodi (mAb) 2C10 dan vaksin kolera toksin B subunit (Rastanapit dkk., 2017), osteopontin (OPN) (Rastanapit dkk., 2017), laktoferrin dan IgGm (Cooper dkk., 2015b). Sistem prokariotik dan eukariotik yang berbeda diterapkan sebagai platform ekspresi untuk produksi protein rekombinan yaitu mamalia, serangga, ragi, bakteri, dan tanaman (Bonander dkk., 2012; Dalton dkk., 2014; Demain dkk., 2005; Matthews dkk., 2017). Selain itu, setiap host produksi menawarkan kelebihan dan kekurangan. Oleh karena itu pemilihan host disesuaikan dengan tujuan penelitian.



nasmedia

Penyedia Layanan Grafis
PT Nas Media Indonesia
Jl. Raya, Pombasan, Cukir 50558
Surabaya No. 1 Makassar 50138
+6231 42 201 P
@nasmedia.id

