

DAFTAR ISI

LEMBAR PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
INTISARI.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan Penelitian.....	4
1.3 Keaslian Penelitian	5
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI	7
2.1 Tinjauan Pustaka	7
2.1.1 Perkembangan penyakit jembrana dan pencegahannya	7
2.1.2 Gen <i>env-tm</i> dalam genom JDV	9
2.1.3 Vaksin DNA.....	10
2.1.4 Plasmid pEGFP-C1	12
2.1.5 Sistem penghantaran gen.....	14
2.2 Landasan Teori	19
2.3 Hipotesis	21
BAB III. METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Bahan dan Alat Penelitian	22
3.1.1 Bahan penelitian.....	22
3.1.2 Alat penelitian	24
3.2 Rancangan Penelitian	25
3.3 Definisi Operasional	27

3.4	Prosedur Kerja	28
3.4.1	Kloning vektor vaksin DNA pEGFP-env-tm JDV di <i>E. coli</i>	28
3.4.1.1	Desain gen sintetik <i>env-tm</i> JDV	28
3.4.1.2	Transformasi plasmid pEGFP-env-tm JDV dengan CaCl ₂	29
3.4.1.3	Koloni-PCR bakteri transforman	31
3.4.1.4	Elektroforesis DNA plasmid di gel agarosa	32
3.4.1.5	Isolasi plasmid pEGFP-env-tm JDV dari <i>E. coli</i> DH5a	32
3.4.1.6	Konfirmasi plasmid rekombinan dengan PCR	33
3.4.1.7	Konfirmasi plasmid rekombinan dengan enzim restriksi.....	34
3.4.1.8	Preparasi produk PCR untuk sekuensing	34
3.4.1.9	Produksi plasmid pEGFP-env-tm JDV dengan maxiprep.....	35
3.4.2	Preparasi kompleks kitosan-DNA dan liposom-DNA	36
3.4.2.1	Pembuatan nanopartikel kitosan-DNA.....	36
3.4.2.2	Karakterisasi dengan <i>gel retardation assay</i>	37
3.4.2.3	Karakterisasi morfologi dan fisiokimia nanopartikel kitosan-DNA ..	37
3.4.2.4	Pembuatan kompleks lipofectamin-DNA	38
3.4.2.5	Uji sitotoksikitas agen transfeksi dengan <i>MTT Assay</i>	38
3.4.2	Uji ekspresi vaksin nanopartikel kitosan-DNA di sel HeLa	39
3.4.3.1	Transfeksi sel HeLa sebagai model penghantaran vaksin.....	39
3.4.3.2	Pengamatan fluoresensi dengan mikroskop konfokal.....	39
3.4.3.3	Isolasi RNA total HeLa	40
3.4.3.4	<i>Two-Step Reverse Transcriptase</i> PCR	41
3.4.3.5	<i>Real-time</i> PCR.....	42
3.4.3.6	Isolasi protein total HeLa	43
3.4.3.7	SDS-PAGE protein total HeLa	43
3.4.3.8	<i>Western Blotting</i>	45
3.5	Alur Penelitian.....	46
BAB IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	47
4. 1	Kloning Vektor Vaksin DNA pEGFP-env-tm JDV di <i>E. coli</i>	47
4.1.1	Optimasi kodon dan desain gen sintetik <i>env-tm</i> JDV	47
4.1.2	Transformasi plasmid pEGFP-env-tm JDV dengan CaCl ₂	52

4.1.3	Koloni-PCR bakteri transforman	54
4.1.4	Isolasi plasmid rekombinan.....	55
4.1.5	Analisis restriksi plasmid rekombinan	56
4.1.6	Analisis PCR plasmid rekombinan	57
4.1.7	Konfirmasi <i>Insert</i> dengan sekuensing	58
4.2	Karakterisasi nanopartikel kitosan-DNA plasmid.....	61
4.2.1	Uji migrasi kompleks kitosan-DNA plasmid.....	62
4.2.2	Penentuan ukuran nanopartikel kitosan-DNA.....	63
4.2.3	Penentuan potensial zeta nanopartikel kitosan-DNA.....	65
4.2.4	Uji sitotoksisitas komponen agen penghantaran vaksin.....	66
4.3	Uji Ekspresi Vaksin Nanopartikel Kitosan-DNA di Sel HeLa	67
4.3.1	Pengamatan protein EGFP-Env-TM dengan mikroskop konfokal	67
4.3.2	Analisis ekspresi RNA dari protein fusi EGFP-Env-TM JDV	69
4.3.3	Analisis ekspresi protein fusi EGFP-Env-TM JDV	77
BAB V SIMPULAN DAN SARAN		82
5.1	Simpulan Penelitian.....	82
5.2	Rekomendasi	82
DAFTAR PUSTAKA		83