

DAFTAR ISI

	Halaman
PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
INTISARI	xii
<i>ABSTRACT</i>	xiii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Keaslian Penelitian	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA, LANDASAN TEORI, DAN HIPOTESIS	7
2.1 Tinjauan Pustaka	7
2.1.1 Penyakit Jembrana (PJ)	7
2.1.2 Vaksin rekombinan DNA dan Gen <i>gag</i> -CA pada JDV.....	9
2.1.3 Plasmid <i>Enhanced Green Fluorescence Protein</i> (pEGFP-C1).....	11
2.1.4 Sistem Penghantaran dengan Kompleks PLGA	13
2.1.5 Sistem Penghantaran dengan Kompleks Kitosan	15
2.1.6 Jalur Penghantaran Partikel pada Membran Sel.....	16
2.1.7 Karakteristik Nanopartikel terhadap <i>Cellular Uptake</i>	18
2.2 Landasan Teori	22
2.3 Hipotesis	25
III. METODE PENELITIAN.....	26
3.1 Bahan dan Alat Penelitian.....	26
3.2 Rancangan Penelitian.....	28
3.3 Definisi Operasional	30

	Halaman
3.4 Cara Kerja	31
3.4.1 Rekultur <i>E. coli</i> DH5 α yang Mengandung Plasmid pEGFP-C1-gag-CA	31
3.4.2 Isolasi Plasmid DNA Rekombinan pEGFP-C1-gag-CA	32
3.4.3 Konfirmasi plasmid rekombinan dengan PCR	33
3.4.4 Konfirmasi Hasil PCR dengan Elektroforesis	34
3.4.5 Konfirmasi Hasil Restriksi dengan Elektroforesis.....	34
3.4.6 Pembuatan Kompleks PLGA-pEGFP-C1-gag-CA.....	35
3.4.7 Pembuatan Kompleks Kitosan-pEGFP-C1-gag-CA.....	36
3.4.8 Pembuatan Kompleks NL-pEGFP-C1-gag-CA.....	37
3.4.9 Karakterisasi Kompleks PLGA-pEGFP-C1-gag-CA dan Kitosan-pEGFP-C1-gag-CA dengan <i>retardation assay</i>	37
3.4.10 Uji DNase I.....	38
3.4.11 Uji Sitotoksikitas Agen Transfeksi Dengan <i>MTT Assay</i>	38
3.4.12 Transfeksi pada Kultur Sel HeLa.....	39
3.4.13 Isolasi RNA Total Sel HeLa	40
3.4.14 Sintesis cDNA.....	41
3.4.15 <i>Real Time</i> PCR.....	41
3.4.16 Karakterisasi morfologi dan fisikokimia nanopartikel PLGA-pEGFP-C1-gag-CA dan Kitosan-pEGFP-C1-gag-CA	42
3.4.17 Pengamatan Fluoresensi dengan mikroskop konfokal PCR	43
3.5 Alur Penelitian	44
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	45
4.1 Konfirmasi Plasmid DNA Rekombinan pEGFP-C1-gag-CA.....	45
4.1.1 Konfirmasi Plasmid Rekombinan dengan PCR.....	46
4.1.2 Analisis restriksi plasmid rekombinan.....	47
4.1.3 Analisis PCR plasmid rekombinan	48
4.2 Seleksi nanopartikel Kitosan- pEGFP-C1-gag-CA dan PLGA- pEGFP-C1-gag-CA	49

	Halaman
4.2.1 Uji penjeratan kompleks PLGA- pEGFP-C1-gag-CA.....	49
4.2.2 Uji penjeratan kompleks kitosan- pEGFP-C1-gag-CA.....	51
4.2.3 Uji DNase I	53
4.2.4 Uji Sitotoksisitas komponen agen penghantaran vaksin DNA	54
4.3 Uji Ekspresi Kompleks PLGA-pEGFP-C1-gag-CA dan Kompleks Kitosan- pEGFP-C1-gag-CA di Sel HeLa.....	56
4.3.1 Analisis Ekspresi Kompleks Partikel dengan <i>Real Time</i> PCR	56
4.3.2 Penentuan Ukuran Kompleks Nanopartikel-DNA.....	59
4.3.3 Penentuan Zeta Potensial Kompleks Nanopartikel-DNA.....	61
4.3.4 Pengamatan fluoresensi protein EGFP-C1-gag-CA dengan mikroskop konfokal	64
4.3.5 Analisis Nilai signifikansi Ekspresi mRNA pEGFP-C1-gag-CA antar perlakuan.....	65
V KESIMPULAN DAN REKOMENDASI	67
5.1 Kesimpulan.....	67
5.2 Rekomendasi	67
DAFTAR PUSTAKA	68

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Primer Deteksi Gen gag dan Primer pEGFP-C1	27
Tabel 2. Campuran Reaksi PCR untuk Plasmid Rekombinan	33
Tabel 3. Campuran Reaksi Restriksi Plasmid Rekombinan	34
Tabel 4. Formulasi konsentrasi kompleks PLGA- pEGFP-C1-gag-CA	35
Tabel 5. Formulasi konsentrasi kompleks Kitosan-pEGFP-C1-gag-CA	37
Tabel 6. Campuran Reaksi dan Program PCR Sintesis cDNA	41
Tabel 7. Sekuens Primer untuk <i>Real-Time</i> PCR	42
Tabel 8. Campuran Reaksi untuk Real-Time PCR	42
Tabel 9. Kuantitas dan Kualitas Plasmid DNA Hasil Isolasi	46
Tabel 10. Seleksi penjeratan kompleks PLGA-DNA dengan rasio maksimum massa DNA	50
Tabel 11. Seleksi uji penjeratan kitosan-DNA dengan rasio minimum massa kitosan	52

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Peta Restriksi dan <i>Multiple Cloning Sites</i> dari Plasmid <i>pEGFP-C1</i> ..	13
Gambar 2. Struktur PLGA	14
Gambar 3. Mekanisme lepas cepat PLGA	15
Gambar 4. Mekanisme <i>Uptake Cellular</i>	17
Gambar 5.Strategi kloning untuk memasukkan gen sintetis ke dalam plasmid pEGFP-C1	45
Gambar 6. Visualisasi Plasmid pEGFP-C1-gag-CA VPJ pada Gel Agarosa 1 %	46
Gambar 7. Restriksi Plasmid pEGFP-C1-gag-CA VPJ dengan enzim <i>EcoRI</i> dan <i>BglII</i>	47
Gambar 8 Hasil Amplifikasi Plasmid Rekombinan pEGFP-C1-gag-CA dengan primer sekuensing EGFP-C1 dan SV40pA.....	49
Gambar 9 Visualisasi penjeratan kompleks PLGA-plasmid pEGFP-C1-gag-CA VPJ.....	50
Gambar 10 Visualisasi penjeratan kompleks Kitosan-pEGFP-C1-gag-CA VPJ..	52
Gambar 11 Hasil ketahanan kompleks yang diinkubasi DNase I.....	53
Gambar 12 Uji Viabilitas Sel HeLa dengan Perlakuan PLGA, Kitosan, dan NL	55
Gambar 13 Pengamatan Sel HeLa pada Mikroskop dengan perbesaran 100X	56
Gambar 14 Profil <i>Melting Peak Real Time</i> PCR pEGFP-C1-gag-CA	57
Gambar 15 <i>Normalized Expression</i> mRNA EGFP-gag-CA dengan waktu inkubasi 48 jam dan 72 jam.....	58
Gambar 16 Ukuran dan Distribusi ukuran nanopartikel	60
Gambar 17 Zeta Pontensial nanopartikel	63
Gambar 18 Visualisasi Pendaran Protein Fusi EGFP Transien pada Mikroskop Konfokal.	64

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Product Size PCR pEGFP-C1-gag-CA dengan Benchling	73
Lampiran 2. Campuran Pembuatan Nanopartikel Kitosan-pEGFP-C1-gag-CA ..	73
Lampiran 3. Campuran Pembuatan Nanopartikel PLGA-pEGFP-C1-gag-CA	73
Lampiran 4. Data Absorbansi MTT Assay	74
Lampiran 5. Data Kuantifikasi Ekspresi gen Dinormalisasi pada inkubasi sel HeLa 48 jam.....	75
Lampiran 6. Data Kuantifikasi Ekspresi gen Dinormalisasi pada inkubasi sel HeLa 72 jam.....	76
Lampiran 7. Hasil Pengukuran <i>Particle Size</i> Kompleks.....	78
Lampiran 8. Hasil Pengukuran Zeta Potensial Kompleks	81
Lampiran 9. Analisis Ekspresi mRNA dengan <i>One-way</i> ANOVA	84