

TINJAUAN PUSTAKA

Metode Transfer Asam Nukleat sebagai Dasar Terapi Gen

Novi Silvia Hardiany

Departemen Biokimia & Biologi Molekuler FK Universitas Indonesia

Korespondensi: novi_s_h@yahoo.com

Diterima 21 Maret 2016; Disetujui 14 Agustus 2016

DOI: 10.23886/ejki.4.7114.204-10

Abstrak

Kemajuan ilmu biologi molekuler memberikan manfaat dalam bidang kedokteran untuk mengembangkan terapi gen. Tujuan terapi gen adalah untuk memperbaiki kerusakan gen atau mengganti gen yang rusak dengan gen yang normal. Pemindahan gen dilakukan dengan teknik transfeksi. Transfeksi merupakan proses pemindahan asam nukleat baik menggunakan vektor virus (transduksi) atau menggunakan metode nonviral yaitu zat kimia, lipid dan metode fisik. Vektor virus yang digunakan pada transduksi adalah retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus (AAV) dan herpes simplex virus (HSV). Keberhasilan transfeksi ditentukan oleh berbagai faktor yang dapat dinilai dengan menggunakan reporter seperti green fluorescence protein (GFP).

Kata Kunci: terapi gen, transfeksi non viral, transduksi, vektor virus

Methods of Nucleic Acid Transfer as Basic Gene Therapy**Abstract**

The advancement of molecular biology provides benefit in the field of medicine to develop gene therapy. The aim of gene therapy is to repair the genetic damage or to replace damaged gene with the normal gene. Delivery of gene is carried out by transfection technique, a technique to transfer nucleic acid into eukaryote cells either using viral vectors (known as transduction), and also using non viral method such as chemical substance, lipid and physical method. Some of the viral vectors used in the transduction are retrovirus, adenovirus, Adeno-associated virus (AAV) and Herpes Simplex Virus (HSV). The success of transfection is determined by various factors which can be assessed using several reporters such as Green Fluorescence Protein (GFP).

Key words: gene therapy, non viral transfection, transduction, viral vector.

Pendahuluan

Proses memindahkan asam nukleat ke dalam sel eukariot dapat dilakukan dengan berbagai metode yaitu secara biologi, kimiawi dan fisik. Metode biologi menggunakan virus disebut transfeksi viral/transduksi, sedangkan metode memindahkan asam nukleat secara kimiawi dan fisik tanpa bantuan virus disebut sebagai transfeksi non viral.

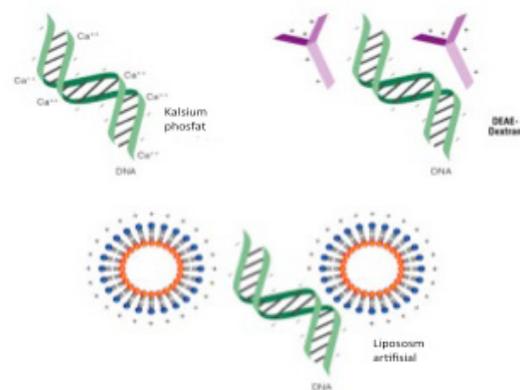
Terdapat dua jenis transfeksi yang dapat dikerjakan yaitu transfeksi sementara (*transient transfection/TT*) dan transfeksi stabil (*stable transfection/ST*). Pada TT, sel dipanen setelah 48-72 jam pascatransfeksi untuk menganalisis ekspresi sementara gen yang ditransfeksi. Interval waktu optimal bergantung pada tipe dan waktu pembelahan sel serta karakteristik spesifik gen. Analisis produk gen memerlukan isolasi RNA atau protein untuk pengukuran aktivitas enzim atau menggunakan teknik *immunoassay*. Pada ST, sel dipanen setelah DNA berintegrasi ke dalam genom seluler, biasanya menggunakan vektor virus. Tujuan utama transfeksi adalah untuk mempelajari fungsi gen atau produk gen dengan meningkatkan atau menghambat ekspresi gen spesifik dalam sel dan untuk memproduksi protein rekombinan dalam sel mamalia. Salah satu aplikasi transfeksi dalam dunia kedokteran adalah untuk terapi gen yaitu dengan mengganti gen yang rusak atau menambahkan gen yang defektif. Terapi gen tersebut masih dalam tahap uji klinik, namun memberikan harapan baru bagi penderita dengan penyakit genetik dan juga kanker.¹

Gen merupakan unit fungsional herediter dengan sekuen basa spesifik yang berperan untuk membuat protein. Apabila gen mengalami kerusakan maka protein yang dikode tidak berfungsi dengan baik sehingga menyebabkan penyakit genetik. Terapi gen (menggunakan gen sebagai obat) pada dasarnya memperbaiki kerusakan gen tersebut melalui: insersi/memasukkan gen yang normal di lokasi gen dalam genom yang nonspesifik untuk mengganti gen yang nonfungsional, menukar gen abnormal dengan gen rekombinan homolog yang normal, memperbaiki gen abnormal melalui mutasi reverse selektif mengubah regulasi pengaktifan dari gen tertentu.^{2,3}

Terapi gen mempunyai potensi terapi untuk penyakit yang diturunkan secara resesif seperti *cystic fibrosis*, hemofilia, *muscular dystrophy*, *sickle cell anemia* serta penyakit yang didapat seperti kanker dan infeksi virus tertentu.^{4,5} Pengiriman gen pada terapi gen dapat dilakukan dengan pemindahan asam nukleat menggunakan metode transfeksi non viral dan viral (transduksi).

Transfeksi Non Viral

Transfeksi merupakan metode untuk mengatasi masalah dalam memasukkan molekul bermuatan negatif (seperti kerangka fosfat DNA dan RNA) ke dalam sel dengan membran yang bermuatan negatif juga. Bahan-bahan kimia seperti kalsium fosfat dan dekstran DEAE serta lipid kationik menyelubungi DNA, menetralkan, bahkan menciptakan muatan positif terhadap molekul tersebut (Gambar 1). Hal tersebut mempermudah DNA-kompleks reagen transfeksi dalam menyebrangi membran, khususnya pada transfeksi dengan lipid yang mempunyai komponen *fusogenik*, yang dapat mempertinggi proses penyatuan dengan membran lipid lapis ganda.⁶



Gambar 1. Proses Transfeksi yang Menetralkan Muatan Negatif DNA⁷

Selain menggunakan bahan kimia, transfeksi juga dapat dilakukan dengan metode fisik yaitu mikroinjeksi serta elektroporasi melalui membran kemudian DNA dimasukkan secara langsung ke dalam sitoplasma.

Transfeksi Menggunakan Reagen Kimia

Reagen kimia yang pertama kali digunakan untuk transfer asam nukleat ke dalam kultur sel mamalia adalah (*diethylaminoethyl*) DEAE-dextran. DEAE-dextran merupakan polimer kationik yang bergabung erat dengan muatan negatif asam nukleat. Muatan positif berlebihan yang ditimbulkan oleh polimer dalam kompleks polimer-DNA menyebabkan kompleks tersebut dapat mendekati membran sel yang bermuatan negatif. Pengambilan kompleks ke dalam sel kemungkinan melalui endositosis. Manfaat metode tersebut adalah teknik sederhana dan murah namun hanya dapat digunakan untuk ekspresi sementara yaitu ekspresi jangka pendek dalam durasi beberapa hari. Teknik tersebut tidak seluruhnya bermanfaat untuk transfeksi stabil atau studi transfeksi jangka

panjang yang bergantung pada integrasi DNA yang dipindahkan ke dalam kromosom.

Kationik polimer sintetik lain yang telah digunakan untuk pemindahan DNA ke dalam sel adalah *polybrene*, *polyethyleneimine* dan *dendrimers*.⁸ Ko-presipitasi kalsium fosfat merupakan teknik yang populer pada awal tahun 1970-an. Graham et al⁹ memeriksa berbagai kation dan efek konsentrasi kation, konsentrasi fosfat dan pH terhadap transfeksi. Ko-presipitasi kalsium fosfat digunakan secara luas karena komponennya mudah didapat dan tidak mahal, protokolnya mudah dikerjakan dan efektif untuk beragam tipe kultur sel. Protokol reaksi mencampurkan DNA dengan kalsium klorida dalam larutan buffer fosfat, kemudian campuran diinkubasi pada suhu ruang sehingga terbentuk presipitasi. Presipitat akan tersebar di dalam kultur sel yang akan diambil oleh sel melalui endositosis atau fagositosis.

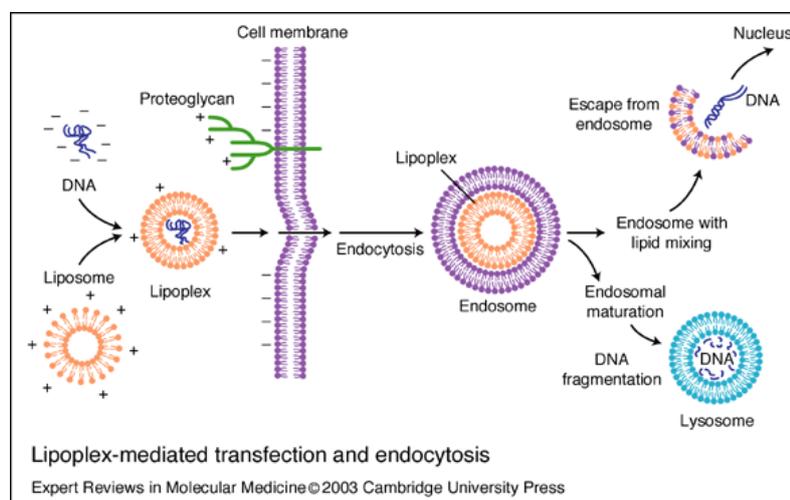
Transfeksi dengan metode kalsium fosfat secara rutin digunakan baik untuk TS maupun untuk transfeksi stabil berbagai tipe sel. Kalsium fosfat memberikan perlindungan terhadap serangan nuklease serum dan intraseluler namun, ko-presipitasi kalsium fosfat memiliki variabilitas dan tidak cocok untuk transfeksi *in vivo* pada hewan. Selain itu, perubahan pH yang kecil (± 0.1) dapat menurunkan efikasi transfeksi dengan kalsium fosfat.⁹

Transfeksi dengan Lipid Kationik

Istilah liposom mengacu pada suatu lipid lapis ganda yang membentuk partikel koloid dalam medium air. Pada tahun 1980, liposom artifisial digunakan untuk mengirimkan DNA ke dalam sel. Vehikulum liposom pada tahap lanjut dikembangkan dari lipid kationik sintetik oleh Felgner.¹⁰ Kelompok kepala

kationik dari senyawa lipid berhubungan dengan fosfat yang bermuatan negatif pada asam nukleat. Teknik liposom tersebut memberikan banyak keuntungan seperti efisiensi transfer gen yang relatif cukup tinggi, dapat mentransfeksi beberapa tipe sel yang resisten terhadap kalsium fosfat maupun DEAE dekstran, dapat diaplikasikan untuk *in vitro* dan *in vivo*, berhasil mengirimkan DNA berbagai ukuran dari oligonukleotida terhadap kromosom ragi artifisial, dapat mengirimkan RNA serta dapat mengirimkan protein. Sel yang ditransfeksi dengan teknik liposom dapat digunakan untuk mempelajari ekspresi sementara maupun transfeksi jangka panjang yang bergantung pada integrasi DNA ke dalam kromosom atau episomal. Tidak seperti metode DEAE-dekstran atau metode kimia kalsium fosfat, teknik pengiriman asam nukleat dengan liposom dapat digunakan untuk transfer DNA *in vivo* dan RNA baik pada hewan maupun manusia.¹⁰

Suatu lipid bermuatan positif pada pH fisiologis merupakan komponen lipid sintesis liposom yang dikembangkan untuk pengiriman gen. Lipid kationik sering dicampur dengan lipid bermuatan netral seperti *L-dioleoyl fosfatidiletanolamin* (DOPE) yang dapat memperkuat kemampuan transfer gen lipid kationik. Bagian kationik molekul lipid bergabung dengan muatan negatif asam nukleat, sehingga menghasilkan kompleks asam nukleat-liposom yang kompak sebagai akibat interaksi elektrostatis antara muatan negatif asam nukleat dan muatan positif dari lipid sintesis. Muatan positif kompleks liposom/asam nukleat menghasilkan efisiensi transfer lebih tinggi pada sel yang dikultur karena dekatnya hubungan kompleks dengan membran sel yang bermuatan negatif. Kompleks liposom masuk ke dalam melalui endositosis atau fusi dengan membran plasma (Gambar 2).¹¹



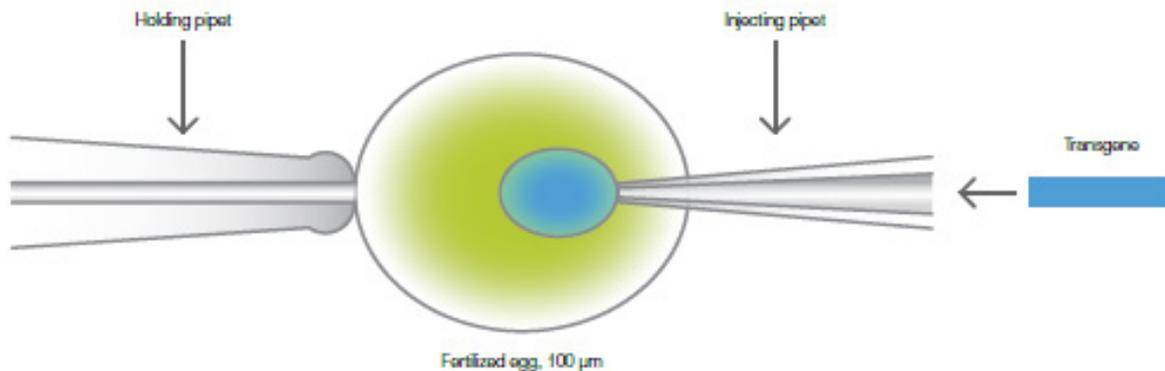
Gambar 2. Proses Transfeksi Menggunakan Lipid Kationik atau Liposom¹¹

Setelah internalisasi seluler, kompleks tampak dalam suatu endosom (Gambar 2) dan berada dalam inti. Sampai saat ini belum diketahui dengan jelas bagaimana asam nukleat dilepaskan dari endosom dan lisosom untuk melewati membran inti. DOPE dipertimbangkan sebagai lipid fusogenik dan berperan melepaskan kompleks tersebut dari endosom dan untuk memfasilitasi penyatuan membran sel luar dengan kompleks asam nukleat/liposom. DNA harus masuk ke dalam

inti, sedangkan RNA, protein atau oligonukleotida antisense yang dikirimkan melalui liposom bekerja di dalam sitoplasma.¹¹

Metode Fisik

Metode fisik untuk transfer gen dikembangkan dan digunakan mulai awal tahun 1980. Mikroinjeksi langsung ke dalam sel yang dikultur atau inti merupakan teknik efektif walaupun teknik tersebut sulit karena menggunakan jarum halus untuk menyisipkan asam nukleat ke dalam sel (Gambar 3).¹²



Gambar 3. Mikroinjeksi¹²

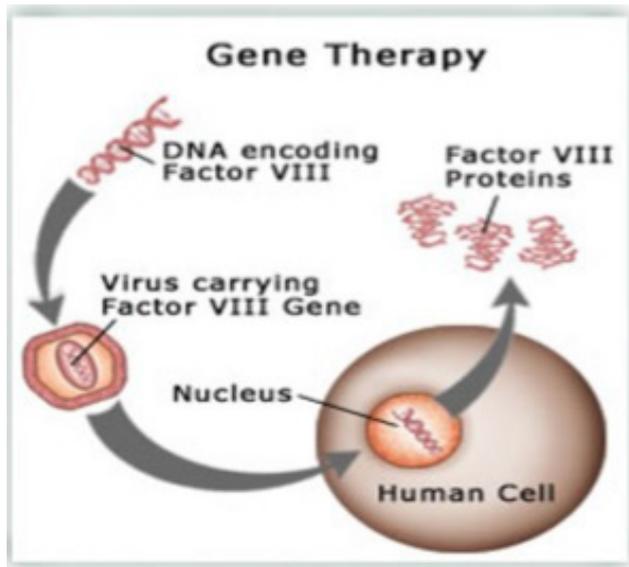
Metode mikroinjeksi telah digunakan untuk mengirim DNA ke dalam stem sel embrionik yang digunakan untuk menghasilkan organisme transgenik dan untuk memasukkan RNA antisense ke dalam *C. elegans*. Alat tersebut sangat mahal dan tekniknya perlu dikerjakan secara intensif, sehingga bukan merupakan metode yang tepat untuk penelitian menggunakan sejumlah besar sel yang ditransfeksi.¹²

Elektroporasi pertama kali dilaporkan untuk studi transfer gen pada sel tikus. Teknik tersebut sering digunakan untuk tipe sel yang sulit ditransfeksi oleh metode lain seperti pada protoplas tanaman. Mekanismenya berdasarkan penggunaan gelombang listrik untuk mengganggu membran sel dan membentuk lubang sementara yang menyebabkan masuknya asam nukleat ke dalam sel. Teknik tersebut memerlukan penyesuaian dan optimasi durasi gelombang dan kekuatan untuk setiap sel yang digunakan. Selain itu, elektroporasi sering memerlukan lebih banyak sel daripada metode kimia karena banyak sel yang mati dan optimasi yang cukup mahal sering diperlukan untuk menentukan efisiensi transfeksi dan viabilitas sel.¹³

Metode fisik lainnya untuk transfer gen adalah pengiriman partikel biolistik yang dikenal juga sebagai *particle bombardment* yang mengandalkan pengiriman asam nukleat dengan kecepatan tinggi pada mikroproyektil terhadap sel resepien melalui penetrasi membran. Metode tersebut berhasil dikerjakan untuk mengirimkan asam nukleat pada sel yang dikultur juga pada sel in vivo.¹⁴

Transfeksi Viral (Transduksi)

Transfeksi menggunakan virus disebut transduksi; merupakan metode yang paling umum digunakan untuk uji klinik karena sangat efektif dan mudah. Pada metode tersebut terjadi integrasi virus dengan DNA genom *host* sehingga dihasilkan ekspresi gen yang stabil (Gambar 4). Transduksi memiliki kelemahan dalam imunogenitas dan sitotoksitas. Pengiriman virus sebagai vektor dapat menyebabkan reaksi inflamasi pada sel dan dapat menyebabkan mutasi. Integrasi virus ke dalam genom *host* secara acak mungkin dapat merusak tumor suppressor gen, mengaktifkan onkogen atau mengganggu gen yang penting.¹⁵ Beberapa virus yang digunakan sebagai vektor pada terapi gen adalah retrovirus, adenovirus, AAV, dan HSV.



Gambar 4. Metode Transfeksi Menggunakan Virus¹⁵

Retrovirus

Virus pertama yang digunakan sebagai vektor pada terapi gen adalah retrovirus. Virus tersebut merupakan virus golongan RNA yang dapat membuat kopi DNA untai ganda menggunakan enzim *reverse transcriptase*. Selanjutnya terjadi integrasi dengan kromosom sel *host* menggunakan enzim integrase. Dengan demikian terbentuk modifikasi sel *host* yang memiliki gen baru yang akan membelah dengan membawa gen baru. Masalah yang dapat terjadi adalah enzim integrase dapat memasukkan materi genetik virus secara acak pada genom sel *host* sehingga menyebabkan mutasi.¹⁷

Adenovirus

Adenovirus merupakan virus golongan DNA untai ganda. Ketika virus tersebut menginfeksi sel *host*, maka molekul DNA virus akan masuk ke dalam sel *host*, namun materi genetiknya tidak berintegrasi dengan materi genetik sel *host* sehingga tidak menyebabkan mutasi. Molekul DNA berada bebas dalam inti sel *host* dan instruksi terhadap molekul DNA ekstra ditranskripsikan seperti gen-gen lainnya. Kekurangan vektor virus tersebut adalah dapat memicu respons inflamasi dan memicu pertumbuhan kanker apabila sel *host* dengan DNA ekstra membelah dalam jumlah yang berlebihan.¹⁸

Adeno-associated virus (AAV)

AAV merupakan golongan virus DNA untai tunggal yang dapat menginfeksi sel secara luas baik pada sel yang dapat membelah maupun yang tidak dapat membelah. Virus tersebut dapat

memasukkan materi genetik pada situs spesifik kromosom 19 dengan ketepatan mendekati 100%. Vektor virus tersebut cukup aman karena tidak menimbulkan penyakit dan tidak memicu respons imun. Kelemahannya adalah ukuran virus sangat kecil dan hanya membawa 2 gen sehingga sulit untuk diproduksi.¹

Herpes Simplex Virus (HSV)

HSV merupakan virus neurotropik yang banyak digunakan untuk pengiriman gen pada sistem saraf. Virus tersebut mempunyai genom yang besar sehingga para peneliti dapat memasukkan lebih dari satu gen terapeutik pada satu virus sehingga berpotensi terapi untuk kelainan yang disebabkan oleh lebih dari satu defek gen. HSV merupakan vektor ideal karena dapat menginfeksi berbagai jaringan termasuk otot, hati, pankreas, sel saraf dan paru. Infeksi HSV pada sel saraf tidak ditolak oleh sistem imun.¹

Menilai Keberhasilan Transfeksi

Plasmid yang mengandung gen reporter dapat digunakan dengan mudah untuk memantau efisiensi transfeksi dan tingkat ekspresi sel yang ditransfeksi. Produk gen reporter yang ideal salah satunya unik untuk sel tersebut, dapat diekspresikan dari DNA plasmid dan dapat diukur dengan mudah.

Pada umumnya, pengukuran gen reporter dilakukan 1–3 hari setelah transfeksi, namun waktu yang optimum ditentukan secara empirik. Keberhasilan transfeksi dapat juga dinilai melalui pengukuran aktivitas enzim yang menilai ekspresi protein gen yang ditransfeksi. Pada transfeksi siRNA, keberhasilan transfeksi dapat dinilai melalui pengukuran reporter gen atau mRNA (misal RT-PCR) atau tingkat target protein (misalnya *western blotting*).⁶ Reporter yang digunakan untuk menilai efisiensi transfeksi adalah:⁶

1. *Green fluorescent protein (GFP)*. Protein fluorecen yang digunakan untuk menentukan efisiensi transfeksi (persentase sel yang berhasil ditransfeksi dalam populasi) dapat dilihat menggunakan mikroskop fluoresen atau secara kuantitatif dengan flowsitometri.
2. *B-galactosidase (b-gal)*. b-gal merupakan enzim dalam *E.coli* yang dikode oleh gen *lacZ*; dapat digunakan untuk menentukan efisiensi transfeksi. Sel dapat diwarnai dengan X-gal dan sel yang mengekspresikan b-gal akan berwarna biru. Efisiensi transfeksi ditentukan dengan menghitung sel yang berwarna biru.

Aktivitas b-gal dapat juga diukur dalam lisat sel menggunakan kolorimetri atau substrat *chemiluminescent*.

3. *Luciferase*. Suatu enzim yang ditemukan pada beberapa organisme, yang paling populer adalah pada kunang-kunang. Enzim tersebut mengkatalisis pembentukan cahaya melalui reaksi antara luciferin dan ATP. Pengukuran lusiferase sangat sensitif sehingga enzim merupakan reporter yang baik untuk menilai efisiensi transfeksi.
4. *Secreted alkaline phosphatase* (SEAP). SEAP adalah enzim yang dimodifikasi dari plasenta manusia yang disekresikan sel mamalia

Faktor yang Mempengaruhi Efisiensi Transfeksi¹⁹

Terdapat berbagai faktor yang mempengaruhi efisiensi transfeksi yaitu viabilitas sel, konfluensi, jumlah pasase, kualitas dan kualitas DNA. Viabilitas sel bergantung pada medium tempat sel ditumbuhkan dan lingkungan yang mendukung pertumbuhan tersebut. Sel harus ditumbuhkan dalam medium yang cocok untuk sel tersebut dan perlu diberikan tambahan serum atau faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang diperlukan untuk viabilitas sel. Sel dan medium yang terkontaminasi, misalnya kontaminasi ragi atau mikoplasma tidak dapat digunakan untuk transfeksi. Sel yang ditumbuhkan pada medium harus diletakkan di dalam inkubator bersuhu 37°C dengan persentase suplai CO₂ yang sesuai, biasanya 5–10%.

Konfluensi sel harus diperhatikan agar transfeksi berhasil yaitu pada saat sel mencapai 40-80%. Jumlah sel yang terlalu sedikit menyebabkan lambatnya pertumbuhan sel karena tidak adanya kontak antarsel. Jumlah sel yang terlalu banyak dapat menghasilkan kontak inhibisi yang menyebabkan sel menjadi resisten untuk menerima DNA asing. Sel yang aktif melakukan pembelahan mengambil DNA yang ditransfeksikan lebih baik dibandingkan sel yang tidak membelah.

Pasase untuk transfeksi tidak boleh melebihi 50 pasase. Pasase berulang dapat menyebabkan sel tidak memberikan respons terhadap kondisi transfeksi yang sama, sehingga menghasilkan ekspresi yang rendah. Selain itu, jumlah pasase yang digunakan untuk berbagai macam percobaan harus konsisten karena karakteristik sel dapat berubah menjadi sel yang immortal.

DNA plasmid untuk transfeksi harus bebas dari protein, RNA, kontaminasi mikroba dan kimiawi. Presipitasi DNA dilarutkan dalam air steril atau buffer TE hingga mencapai konsentrasi

DNA 0,2-1mg/mL. Jumlah optimum DNA yang digunakan untuk transfeksi bervariasi bergantung pada tipe DNA, reagen transfeksi, target *cell line* dan jumlah sel.

Optimasi Efisiensi Transfeksi¹⁰

Optimasi diperlukan untuk mendapatkan kondisi optimal agar tercapai efisiensi transfeksi yang diinginkan. Indikator parameter yang perlu dipertimbangkan adalah rasio muatan reagen transfeksi lipid kationik terhadap DNA, jumlah asam nukleat yang ditransfeksikan, lama waktu sel dipaparkan dengan reagen transfeksi serta ada atau tidaknya serum. Jumlah muatan positif lipid kationik dari reagen transfeksi harus sama atau melebihi muatan negatif fosfat pada DNA sehingga menghasilkan muatan netral atau positif pada vesikel multilamelar yang berhubungan dengan DNA.

Jumlah optimal DNA atau RNA bervariasi bergantung pada tipe asam nukleat, jumlah sel, ukuran sumur kultur dan target *cell line* yang digunakan. Sebagai contoh, sel HEK-293 optimal ditransfeksi dengan 0,25µg vektor kontrol pGL3 menggunakan reagen *TransFast* dengan rasio 2:1 dalam sumur plate 24. Sebaliknya, sel yang sama optimal ditransfeksi dengan 0.55 µg DNA menggunakan reagen transfeksi *Fu Gene HD* pada rasio 1:3. Dengan demikian untuk sel yang berbeda perlu dilakukan optimasi jumlah DNA. Apabila konsentrasi DNA berada di bawah atau di atas rata-rata maka efisiensi transfeksi akan menurun. Apabila jumlah DNA terlalu sedikit maka sel tidak akan memberikan respon. Sedangkan apabila jumlah DNA terlalu banyak maka kelebihan DNA tersebut akan bersifat toksik terhadap sel.

Reagen transfeksi harus kontak dengan sel selama beberapa waktu, kemudian medium diganti untuk mengurangi efek toksik reagen transfeksi. Waktu transfeksi yang optimal bergantung pada tipe sel, reagen transfeksi dan asam nukleat yang digunakan. Protokol transfeksi memerlukan kondisi bebas serum untuk hasil yang optimal karena serum dapat berinteraksi dengan beberapa reagen transfeksi sehingga mempengaruhi proses transfeksi.

Kesimpulan

Perkembangan biologi molekuler semakin memudahkan peneliti untuk memanipulasi, gen salah satunya dengan transfeksi yang bermanfaat untuk pengembangan terapi gen. Pengiriman DNA dan RNA dengan transfeksi dapat dilakukan

menggunakan vektor virus, reagen kimia (seperti DEAE-dextran, kalsium fosfat, lipid kationik) atau metode fisik dengan mikroinjeksi, elektroporasi dan pengiriman partikel biolistrik. Keberhasilan transfeksi dapat dinilai menggunakan reporter seperti *green fluorescence protein* (GFP). Keberhasilan transfeksi ditentukan oleh viabilitas sel, konfluensi dan jumlah pasase sel yang akan ditransfeksi, serta kuantitas dan kualitas DNA plasmid.

Daftar Pustaka

- Misra S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *JAPI*. 2013;61;127-33.
- Miller DA. Human gene therapy comes of age. *Nature*. 1992;375;455-60.
- Verna IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem*. 2005;74;711-38.
- Knoell DM, Yiu IM. Human gene therapy for hereditary disease. *Am J Health Syst Pharma*. 1998;55;899-904.
- Ginter EK. Gene therapy of hereditary disease. *Vopr Med Khim*. 2000;46;265-78.
- Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397:3173-8.
- Transfection. Diunduh dari <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection/>. Tanggal 5 Feb 2016
- Schenborn ET, Goiffon V. DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Meth Mol Biol*. 2000;130:147-53.
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973;52:456-67.
- Felgner, P.L. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:7413-7.
- Parker AL, Newman C, Briggs S, Seymour L, Sheridan PJ. Nonviral gene delivery: techniques and implication for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. [serial on the internet]. 2003 Sept 3;[cited 2010 December 4];5:[about 15 screens]. Diunduh dari:<http://www.expertreviews.org/>.
- Cappechi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*. 1980;22:479-88.
- Stroh T, Erben U, Kuhl AA, Zeitz M, Siegmund B. Combined pulse electroporation – a novel strategy for highly efficient transfection of human and mouse cells. *Plos One*, 2010 [serial on the internet]. Diunduh dari:<http://www.plosone.org>.
- Ye, GN, Daniell H, Sanford JC. Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol Biol*. 1990;15:809-19.
- Patil PM, Chaudhari PD, Sahu M, Duragkar MJ. Review article on gene therapy. *Int J Genetic*. 2012;4;74-9.
- Wood NB. Lentiviral of transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutation. *Blood*. 2003;101(4);1284-9.
- Rochat T, Morris MA. Viral vector for gene therapy. *J Aerosol Med*. 2002;15;229-35.
- Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *The Oncologist*. 2002;7;46-59.
- Romoren K, Thu BJ, Bols NC, Evensen O. Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1663:127-34.