

Evaluasi *In Vitro* DNA Rekombinan Gen tat VPJ pada Kultur Sel HeLa

Lalu Unsunnidhal

INTISARI

Penyakit Jembrana yang disebabkan oleh Virus Penyakit Jembrana (VPJ) merupakan salah satu faktor penyebab menurunnya produksi sapi Bali (*Bos javanicus*). Bioteknologi dapat mengatasi masalah penyakit Jembrana dengan mengembangkan induksi imunitas menggunakan induksi imunitas DNA yang efektif. Penggunaan polimer alami atau sintesis seperti *Poly-Lactic-co-Glycolic Acid* (PLGA) dan kitosan sebagai pembawa vaksin nonviral membuktikan efektivitasnya dalam melindungi DNA dari kerusakan oleh enzim nuclease serta meningkatkan efektivitas penghantaran vaksin. Penelitian saat ini berfokus pada ekspresi gen tat VPJ pada sel HeLa sebagai model sel eukariot untuk memahami lebih lanjut tentang virus Jembrana. Protein Tat VPJ memiliki peran penting dalam mengaktifkan transkripsi gen virus untuk proses replikasi, dan kemiripannya dengan protein Tat dari virus lentivirus lain seperti HIV menunjukkan potensi untuk pengembangan vaksin lebih efektif dan aman untuk penyakit ini dan penyakit lain yang disebabkan oleh lentivirus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi DNA Rekombinan gen tat VPJ pada sel HeLa menggunakan sistem penghantar nanopartikel PLGA dan kitosan, serta menilai kesesuaian karakteristik kompleks sistem penghantaran dengan DNA Rekombinan sebagai sistem penghantaran untuk ekspresi gen tat. Selanjutnya, penelitian ini juga membandingkan tingkat ekspresi pEGFP-C1-tat dengan menggunakan sistem penghantar nanopartikel PLGA dan kitosan pada sel HeLa. Metode yang digunakan meliputi konsensus dan optimasi Kodon untuk gen tat VPJ dengan metode bioinformatika. Produknya dimasukkan ke dalam vektor pEGFP-C1 dan dilakukan penclonan pEGFP-C1-tat. Isolasi DNA Rekombinan kemudian dianalisis PCR dan restriksi untuk konfirmasi. Pembuatan kompleks nanopartikel dengan DNA untuk pengujian formulasi yang dienkapsulasi, karakterisasi fisiko-kimia, uji stabilitas dengan DNase I, dan uji sitotoksik, Analisa ekspresi gen berdasarkan sistem penghantarannya. Hasil penelitian menunjukkan berhasilnya terbantu bakteri transforman yang telah terkonfirmasi. Formulasi rasio PLGA:DNA:polivinil alkohol dengan tingkat enkapsulasi optimal adalah 4%:0,5%:2% untuk nanopartikel PLGA dan perbandingan 1:2 (DNA:Kitosan) untuk nanopartikel kitosan. Karakterisasi fisiko-kimia PLGA menunjukkan indeks dispersitas 0,266, ukuran partikel 944,4 nm, dan potensial zeta -2,33 mV dan untuk nanopartikel kitosan adalah indeks dispersitas 0,166, ukuran partikel 188 nm, dan potensial zeta 22,2 mV. PLGA dan kitosan berhasil melindungi pEGFP-C1-tat dari degradasi enzim, dan persentase viabilitas uji sitotoksik PLGA-pEGFP-C1-tat mencapai 98,03% dan kitosan mencapai 92,66%. Selanjutnya, PLGA-pEGFP-C1-tat dan Kitosan-pEGFP-C1-tat menunjukkan fluoresensi dari protein fusi EGFP-tat dan terdeteksi adanya transkripsi mRNA. Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa DNA Rekombinan gen tat VPJ berhasil diekspresikan pada sel HeLa menggunakan sistem penghantar nanopartikel PLGA dan kitosan sebagai model sel eukariot. Karakteristik kompleks nanopartikel dengan DNA sesuai sebagai sistem penghantaran untuk ekspresi gen tat VPJ. Terdapat perbedaan tingkat ekspresi pEGFP-C1-tat dengan menggunakan sistem penghantar nanopartikel PLGA dan kitosan pada sel HeLa.

Kata Kunci: Virus Penyakit Jembrana, Sapi Bali, Nanopartikel PLGA, Nanopartikel Kitosan, Ekspresi gen tat, sel HeLa.

In Vitro Evaluation of Recombinant DNA VPJ tat Gene in HeLa Cell Culture

Lalu Unsunnidhal

ABSTRACT

Jembrana disease caused by the Jembrana Disease Virus (VPJ) is one of the factors causing the decline in production of Bali cattle (*Bos javanicus*). Biotechnology can overcome the problem of Jembrana disease by developing immunity induction using effective DNA immunity induction. The use of natural or synthetic polymers such as Poly-Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) and chitosan as nonviral vaccine carriers has proven their effectiveness in protecting DNA from damage by nuclease enzymes and increasing the effectiveness of vaccine delivery. Current research focuses on the expression of the VPJ tat gene in HeLa cells as a eukaryotic cell model to understand more about the Jembrana virus. The Tat VPJ protein has an important role in activating transcription of viral genes for the replication process, and its similarity to the Tat proteins of other lentiviruses such as HIV suggests the potential for the development of more effective and safe vaccines for this disease and other diseases caused by lentiviruses. This study aims to determine the expression of Recombinant DNA VPJ tat gene in HeLa cells using a PLGA nanoparticle and chitosan delivery system, as well as assessing the suitability of the complex characteristics of the delivery system with Recombinant DNA as a delivery system for tat gene expression. Furthermore, this study also compared the expression levels of pEGFP-C1-tat using PLGA nanoparticle and chitosan delivery systems in HeLa cells. The methods used include consensus and codon optimization for the VPJ tat gene using bioinformatics methods. The product was inserted into the pEGFP-C1 vector and pEGFP-C1-tat was cloned. Recombinant DNA isolation is then analyzed by PCR and restriction for confirmation. Making nanoparticle complexes with DNA for encapsulated formulation testing, physico-chemical characterization, stability testing with DNase I, and cytotoxic testing, gene expression analysis based on the delivery system. The results of the research show that the success in producing transformant bacteria has been confirmed. The formulation ratio of PLGA:DNA:polyvinyl alcohol with the optimal encapsulation level is 4%:0.5%:2% for PLGA nanoparticles and a ratio of 1:2 (DNA:Chitosan) for chitosan nanoparticles. Physico-chemical characterization of PLGA shows a dispersity index of 0.266, particle size of 944.4 nm, and zeta potential of -2.33 mV and for chitosan nanoparticles it is a dispersity index of 0.166, particle size of 188 nm, and zeta potential of 22.2 mV. PLGA and chitosan succeeded in protecting pEGFP-C1-tat from enzyme degradation, and the viability percentage for the cytotoxic test of PLGA-pEGFP-C1-tat reached 98.03% and chitosan reached 92.66%. Furthermore, PLGA-pEGFP-C1-tat and Chitosan-pEGFP-C1-tat showed fluorescence from the EGFP-tat fusion protein and mRNA transcription was detected. The conclusion of this research is that the recombinant DNA of the VPJ tat gene was successfully expressed in HeLa cells using a PLGA nanoparticle and chitosan delivery system as a eukaryotic cell model. The characteristics of the nanoparticle complex with DNA are suitable as a delivery system for VPJ tat gene expression. There were differences in the expression levels of pEGFP-C1-tat using PLGA nanoparticle and chitosan delivery systems in HeLa cells.

Keywords: Jembrana Disease Virus, Bali Cattle, PLGA Nanoparticles, Chitosan Nanoparticles, Tat gene expression, HeLa cells.