

POTENSI NANOPARTIKEL KITOSAN SEBAGAI SISTEM PENGHANTARAN UNTUK EKSPRESI GEN rE VIRUS DENGUE DENGAN VEKTOR pEGFP-N1 PADA SEL HeLa

INTISARI

Infeksi virus dengue (DENV) menimbulkan ancaman kesehatan global yang signifikan, dan pengembangan metode efektif untuk pencegahannya sangatlah penting. Sekuen *recombinant E* (EDIIIIF atau rE) dari empat serotipe DENV memiliki potensi sebagai kandidat vaksin DNA. Penelitian ini mengeksplorasi potensi penggunaan nanopartikel kitosan sebagai sistem pengiriman yang efisien untuk ekspresi gen rE menggunakan vektor pEGFP-N1 pada sel HeLa. Plasmid rekombinan pEGFP-N1 dengan gen rE diisolasi dari transforman *E. coli* DH5 α . Isolat plasmid dikomplekskan dengan nanopartikel kitosan dalam beberapa rasio berat DNA:kitosan untuk membentuk kompleks pEGFP-N1-rE/kitosan (N1-rE/K). Kompleks tersebut selanjutnya dikarakterisasi dengan *gel retardation assay*, uji stabilitas terhadap serum dan DNase I, potensial zeta, analisis ukuran partikel, dan uji sitotoksitas MTT. Efisiensi penghantaran gen dievaluasi dengan menilai ekspresi gen rE pada sel HeLa menggunakan mikroskop konfokal, RT-PCR, dan qPCR. Analisis restriksi plasmid, PCR, dan sekuensing berhasil memverifikasi bahwa gen rE disisipkan dengan benar pada vektor pEGFP-N1 tanpa adanya mutasi. Berdasarkan penampilan pita tunggal dari *gel retardation assay*, rasio DNA:kitosan 1:0,5 dipilih untuk pengujian kompleks N1-rE/K lebih lanjut. N1-rE/K memiliki ukuran 217,4 nm dengan potensial zeta -21,9 mV. Kompleks N1-rE/K juga terbukti stabil terhadap degradasi DNase I dan nuklease yang ada dalam FBS, serta bersifat non-toksik untuk sel HeLa. Pengamatan mikroskop konfokal menunjukkan bahwa nanopartikel kitosan berhasil menghantarkan N1-rE/K ke sel HeLa dan menghasilkan ekspresi gen rE, sebagaimana terlihat dari fluoresensi yang teramati pada sel. Hal tersebut dibuktikan lebih lanjut melalui analisis ekspresi gen relatif dengan qPCR, yang menunjukkan bahwa gen rE diekspresikan lebih dari 10,63 kali lipat pada perlakuan transfeksi N1-rE/K dibandingkan dengan perlakuan plasmid rekombinan saja. Hasil-hasil tersebut menyoroti potensi nanopartikel kitosan sebagai platform yang menjanjikan untuk pengembangan strategi preventif untuk infeksi virus dengue.

Kata kunci: kitosan, virus Dengue, pEGFP-N1, gen rE, sel HeLa

THE POTENTIAL OF CHITOSAN NANOPARTICLES AS A DELIVERY SYSTEM FOR THE EXPRESSION OF DENGUE VIRUS'S rE GENE WITH pEGFP-N1 VECTOR IN HeLa CELLS

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) infection poses a significant global health threat, and developing effective methods for its prevention is of utmost importance. Recombinant E (EDIIIIF or rE) sequence from four DENV serotypes possess a potential to be a DNA vaccine candidate. This study explores the potential of utilising chitosan nanoparticles as an efficient delivery system for the expression of the rE gene using pEGFP-N1 vector on HeLa cells. In this study, recombinant pEGFP-N1 with rE gene was isolated from DH5 α *E. coli* transformant. Plasmid isolate was complexed with chitosan nanoparticles in various weight ratios of DNA:chitosan to form pEGFP-N1-rE/chitosan (N1-rE/K) complex. The complex was further characterised with gel retardation assay, stability assay against serum and DNase I, zeta potential, particle size analysis, and MTT cytotoxicity assay. The efficiency of gene delivery was evaluated by assessing the expression of the rE gene in HeLa cells using confocal microscopy, RT-PCR, and qPCR. Plasmid restriction, PCR, and sequencing analysis were able to verify that rE gene was correctly inserted into pEGFP-N1 vector with no mutation spotted. Based on single band appearance from gel retardation assay, DNA:chitosan ratio of 1:0.5 for N1-rE/K was chosen for further tests. N1-rE/K has a size of 217.4 nm with a zeta potential of -21.9 mV. The complex was also found to be stable against degradation by DNase I and nuclease present in fetal bovine serum, and non-toxic to HeLa cells. Confocal microscopy observations and qPCR evaluations demonstrated that chitosan nanoparticles effectively delivered the N1-rE/K into HeLa cells, resulting in the expression of rE gene, as evidenced by the observed fluorescence in the cells. This was proven further by the analysis of relative gene expression by qPCR, which showed that rE gene was overexpressed by 10.63-fold in the N1-rE/K transfection treatment compared to recombinant plasmid only treatments. These results highlight the potential of chitosan nanoparticles as a promising platform for the development of preventive strategies for Dengue virus infections.

Keyword: chitosan, Dengue virus, pEGFP-N1, rE gene, HeLa cells