

Tersedia online di: journal.gunabangsa.ac.id

Journal of Health (JoH)

ISSN (online): 2407-6376 | ISSN (print): 2355-8857



Characterization and Cytotoxic Test Formulation of PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg Nanoparticles from Gel Retardation Assay as Delivery Agent for Hepatitis B DNA Vaccine Candidate

Karakterisasi dan Formulasi Uji Sitotoksik Nanopartikel PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg dari Gel Retardation Assay sebagai Delivery Agent Kandidat Vaksin DNA Hepatitis B

Lalu Unsunnidhal^{1*}, Raudatul Jannah², Fihiruddin³, Nurul Inayati⁴, Agus Supinganto⁵¹Universitas Mataram, ^{2,5}STIKES Yarsi Mataram, ^{3,4}Poltekkes Kemenkes Mataram

ABSTRACT

Indonesia is one of the countries with the highest prevalence of HBsAg (hepatitis B disease), ranging from 2.5% to 10%. The strategy to overcome these obstacles is a DNA vaccine. One of the structural genes of HBV that is used as a source of DNA vaccines is the HBcAg gene (HBV/B subgenotype B3). HBcAg was chosen as a vaccine candidate because it is more specific for cytotoxic T lymphocytes (CTL) in the liver. Strategies to overcome the above obstacles include using formulations such as nanoparticles, which are formed by coacervation between polymers and DNA. One of the promising non-viral gene delivery systems is the bonding of ionic complexes between DNA and polymers. Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) shows great potential as a delivery agent as well as an adjuvant and a good DNA transfection mediator targeting phagocytic cells such as macrophages, protecting against enzymatic degradation, and accelerating the release of drug or plasmid DNA. Based on this, the formulation of PLGA-DNA nanoparticles, zeta potential characterization of PLGA-DNA nanoparticles, their toxicity effects will be explored in this study. This study showed that the results of the physicochemical characterization of PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg showed a polydispersity index value of 0.246, a particle size of 925 nm, and a zeta potential value of 2.31 mV. PLGA managed to protect PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg from enzymatic degradation, and the viability percentage of the PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg cytotoxicity test was 98.03%, so that PLGA has good potential as a delivery system for PLGA -pcDNA 3.1-SB3- HBcAg.

Keywords: Hepatitis B, PLGA, Recombinant DNA, Delivery System

INFORMASI ARTIKEL

Diterima : 30 November 2022
 Direvisi : 05 Januari 2023
 Disetujui : 17 Mei 2023
 Dipublikasi : 05 Juli 2023

KORESPONDENSI

Lalu Unsunnidhal
 lunsunnidhal@gmail.com
 +62 878-6379-1126

INTISARI

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki prevalensi HBsAg (penyakit hepatitis B) tertinggi, yaitu mulai dari 2,5% hingga 10%, dengan tingkat tertinggi dilaporkan di Sulawesi utara sebanyak 33,0%, Papua sebanyak 12,8%, dan Pontianak sebanyak 9,1%. Strategi untuk mengatasi hambatan tersebut adalah vaksin DNA. Salah satu gen struktural dari HBV yang digunakan sebagai sumber vaksin DNA adalah gen HBcAg (HBV/B subgenotip B3). HBcAg dipilih sebagai kandidat vaksin karena lebih spesifik untuk limfosit T sitotoksik (CTL) dalam hati. CTL mensekresi sitokin TNF- α dan interferon γ , dimana keduanya akan mempengaruhi hepatosit yang terinfeksi, sehingga replikasi HBV pada sel tersebut dapat dihambat. Strategi untuk mengatasi hambatan tersebut di atas diantaranya menggunakan formulasi seperti nanopartikel, yang di bentuk dengan koaservasi antara polimer dengan DNA. Salah satu sistem penghantaran gen non-virus yang menjanjikan adalah ikatan kompleks ion antara DNA dan polimer. Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) menunjukkan potensi yang besar sebagai

Copyright © 2022 Author(s)



Di bawah lisensi *Creative Commons Attribution 4.0 International License*.

suatu agen penghantar sekaligus adjuvant dan mediator transfeksi DNA yang baik yang menargetkan sel-sel fagosit seperti makrofag, melindungi dari degradasi enzim, dan mempercepat pelepasan obat atau plasmid DNA. Berdasarkan hal tersebut, formulasi nanopartikel PLGA-DNA, karakterisasi zeta potensial dari nanopartikel PLGA-DNA efek toksisitasnya akan dieksplorasi pada penelitian ini. Penelitian ini menunjukkan bahwa hasil karakterisasi fisikokimia PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg menunjukkan nilai indeks polidispersitas 0,246, ukuran partikel 925 nm, dan nilai potensial zeta 2,31 mV. PLGA berhasil melindungi PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg dari degradasi enzimatik, dan persentase viabilitas uji sitotoksitas PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg sebesar 98,03%, sehingga PLGA memiliki potensi yang baik sebagai sistem penghantaran PLGA -pcDNA 3.1- SB3-HBcAg.

Kata kunci: Hepatitis B, PLGA, DNA Rekombinan, Sistem Penghantaran

PENDAHULUAN

Hepatitis B merupakan penyakit infeksi yang mengancam jiwa di seluruh dunia. Data dari WHO menunjukkan bahwa lebih dari 257 juta penduduk dunia terkena hepatitis B dan sebanyak 887.000 meninggal tiap tahunnya akibat komplikasi hepatitis B. Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki prevalensi HBsAg (penyakit hepatitis B) tertinggi, yaitu mulai dari 2,5% hingga 10%, dengan tingkat tertinggi dilaporkan di Sulawesi Utara sebanyak 33,0%, Papua sebanyak 12,8%, dan Pontianak sebanyak 9,1%. Penyakit hepatitis B disebabkan oleh Virus Hepatitis B (HBV). Virus Hepatitis B (HBV) merupakan virus DNA yang menyebabkan penyakit hepatitis pada manusia. Diperkirakan sebanyak 2 miliar manusia telah terinfeksi, 350 juta diantaranya telah berkembang menjadi infeksi kronis yang menyebabkan 600.000 kematian setiap tahunnya (World Health Organization, 2020).

Hepatitis B kronis dapat diobati dengan pemberian interferon dan senyawa antiviral (Tenofovir dan entecavir), namun obat ini tidak dapat menurunkan semua bentuk virus DNA, seperti cccDNA. Selain itu, pengobatan jangka panjang dengan obat antiviral dapat menyebabkan toksisitas dan resistensi virus (Akbar, S, M, Al-Mahtab, Uddin, M, & Khan, S, 2013). Oleh karena itu, pendekatan yang paling efektif untuk mengendalikan dan mencegah penyebaran HBV yaitu dengan imunisasi menggunakan vaksin yang kompeten (World Health Organization, 2020). Salah satu jenis vaksin yang merupakan suatu terobosan baru dalam teknologi vaksin adalah vaksin DNA. Vaksin DNA dibuat dengan menyisipkan DNA atau gen

yang mengkode protein immunogenik ke dalam vektor ekspresi eukariotik.

Salah satu gen struktural dari HBV yang digunakan sebagai sumber vaksin DNA adalah gen HBcAg (HBV/B subgenotip B3). HBcAg dipilih sebagai kandidat vaksin karena lebih spesifik untuk limfosit T sitotoksik (CTL) dalam hati. CTL mensekresi sitokin TNF- α dan interferon γ , dimana keduanya akan mempengaruhi hepatosit yang terinfeksi, sehingga replikasi HBV pada sel tersebut dapat dihambat (Lokhande, 2011).

Strategi untuk mengatasi hambatan tersebut di atas diantaranya menggunakan formulasi seperti nanopartikel, yang di bentuk dengan koaservasi antara polimer dengan DNA. Salah satu sistem penghantaran gen non-virus yang menjanjikan adalah ikatan kompleks ion antara DNA dan polimer. Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) menunjukkan potensi yang besar sebagai suatu agen penghantar sekaligus adjuvant dan mediator transfeksi DNA yang baik yang menargetkan sel-sel fagosit seperti makrofag, melindungi dari degradasi enzim, dan mempercepat pelepasan obat atau plasmid DNA. Berdasarkan hal tersebut, formulasi nanopartikel PLGA-DNA, karakterisasi zeta potensial dari nanopartikel PLGA-DNA efek toksisitasnya akan dieksplorasi pada penelitian ini.

METODE

Untuk larutan PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg, larutan ini dibuat menggunakan metode Double-Emulsion-Solvent Evaporation (w/o/w) (Zhao dkk, 2014). Konsentrasi 5% PLGA ((Poli(D, L-laktida-ko-glikolida) laktida: glikolida 50:50, Merck, Jerman) dibuat dengan melarutkan 0,5 mg

PLGA dalam 10 mL larutan diklorometana (Merck, Jerman) dan larutan PLGA konsentrasi 4% dan 2,5% dibuat dengan cara yang sama Larutan PLGA digunakan sebagai fasa minyak, DNA rekombinan PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg sebagai fasa air dengan konsentrasi disesuaikan dengan konsentrasi PLGA, yaitu 0,5%, 1%, dan 1,5% (ng/ng) rekombinan DNA pcDNA 3.1-SB3-HBcAg sebagai fasa air (W) ditambahkan 50 µL larutan PLGA sebagai fasa minyak (O) dan diemulsikan dengan sonikator selama 10 detik untuk mendapatkan emulsi primer (W1/O) Emulsi primer ditambahkan 200 µL PVA (Polyvinyl

alcohol, Merck, Germany) dengan konsentrasi 1% atau 2% kemudian divortex dengan kecepatan 7500 rpm selama 10 detik untuk mendapatkan emulsi sekunder (W1/O/W2) Emulsi yang terbentuk kemudian diaduk dengan kecepatan 200 rpm selama 5 jam hingga terbentuk pelet, kemudian supernatan dibuang, pelet dibiarkan di ruangan untuk menguapkan sisa pelarut, kemudian disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit. Penentuan formulasi yang optimal untuk optimasi enkapsulasi pada rasio PLGA-DNA-PVA disajikan pada table 1 (Zhao, dkk, 2014).

Tabel 1. Susunan formulasi untuk menentukan enkapsulasi optimal kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg

No.	Konsentrasi PLGA (% mg/mL)	DNA Rekombinan/PLGA Concentration (% ng/ng)	Konsentrasi PVA (% mg/mL)
1	2.5	0.5	1
2	2.5	1	1
3	2.5	1.5	1
4	2.5	0.5	2
5	2.5	1	2
6	2.5	1.5	2
7	4	0.5	1
8	4	1	1
9	4	1.5	1
10	4	0.5	2
11	4	1	2
12	4	1.5	2
13	5	0.5	1
14	5	1	1
15	5	1.5	1
16	5	0.5	2
17	5	1	2
18	5	1.5	2

Penentuan formulasi enkapsulasi yang optimal dilakukan dengan metode uji inhibisi gel. Selain itu, formulasi dan preparasi larutan sistem penghantaran menggunakan nanopartikel kitosan juga dilakukan dengan metode formulasi dan preparasi yang dilakukan pada penelitian sebelumnya (Ishak, Unsunidhal, Martien, & Kusumawati, 2019; L Unsunidhal, Ishak, & Kusumawati, 2019; Lalu Unsunidhal, Jannah, Haris, Supinganto, & Kusumawati, 2021; Lalu Unsunidhal, Wasito, Setyawan, & Kusumawati, 2021) sebagai pembanding kontrol pada penelitian ini. Partikel yang terbentuk kemudian

dikarakterisasi, meliputi distribusi ukuran, ukuran partikel dan potensial zeta oleh Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd. UK).

Uji stabilitas dilakukan dengan menggunakan DNase I (DNase I (Rnase-free, New England BioLabs Inc., US), hal ini mengacu pada metode uji stabilitas yang ada (Huang dkk, 2018). Penggunaan 1 µg PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg atau kompleks Chitosan-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg kemudian ditambahkan 4 µL buffer sampel dan diinkubasi dengan 1 µg DNase I (1 U/mL) pada suhu 37°C selama 30 menit dalam penangas air. 2

μ L EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Merck KGaA, Jerman) dan diinkubasi selama 1 menit.

Uji sitotoksitas dilakukan dengan uji Microtetrazolium (MTT) pada sel biakan HeLa (model sel untuk eukariota) (Ishak dkk, 2019; L Unsunnidhal dkk, 2019; Lalu Unsunnidhal, Jannah, dkk, 2021; Lalu Unsunnidhal, Wasito, dkk, 2021). Sel HeLa ditumbuhkan pada media kompleks yang terdiri dari FBS (Fetal Bovine Serum, Merck KGaA, Germany) dengan dosis 5 mL, Penicillin-streptomycin (Merck KGaA, Germany) dengan dosis 1 mL, Fungizone (Amphotericin B Solution, Merck KGaA, Jerman) dengan dosis 250 μ L dan media Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (StableCell™ RPMI-1640, Merck KGaA, Jerman). Setiap perlakuan yang akan diuji kemudian ditambahkan 100 μ L media kompleks. Setiap sampel diuji pada *microplate well* yang berbeda sebagai replikasi uji. Sel HeLa diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama

24 jam kemudian dicuci dengan PBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Merck KGaA, Jerman) dan ditambahkan 100 μ L larutan MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Merck KGaA, Jerman) konsentrasi 0,5 mg/ mL ke dalam setiap sumur termasuk media kontrol (tanpa sel), sel diinkubasi selama 2-4 jam dalam inkubator CO₂ untuk membentuk kristal formazan. Kristal formazan yang terbentuk kemudian dilarutkan dengan menambahkan 100 μ L larutan Sodium Dodesil Sulfat (SDS) pada masing-masing well kemudian diinkubasi semalaman pada suhu kamar. Absorbansi pelat mikro dibaca dengan ELISA Reader pada λ 595 nm. Data absorbansi perlakuan diubah menjadi persentase viabilitas.

Ethical clearance penelitian ini memiliki nomor: 204/UN18.F7/ETIK/2021 yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Universitas Mataram.

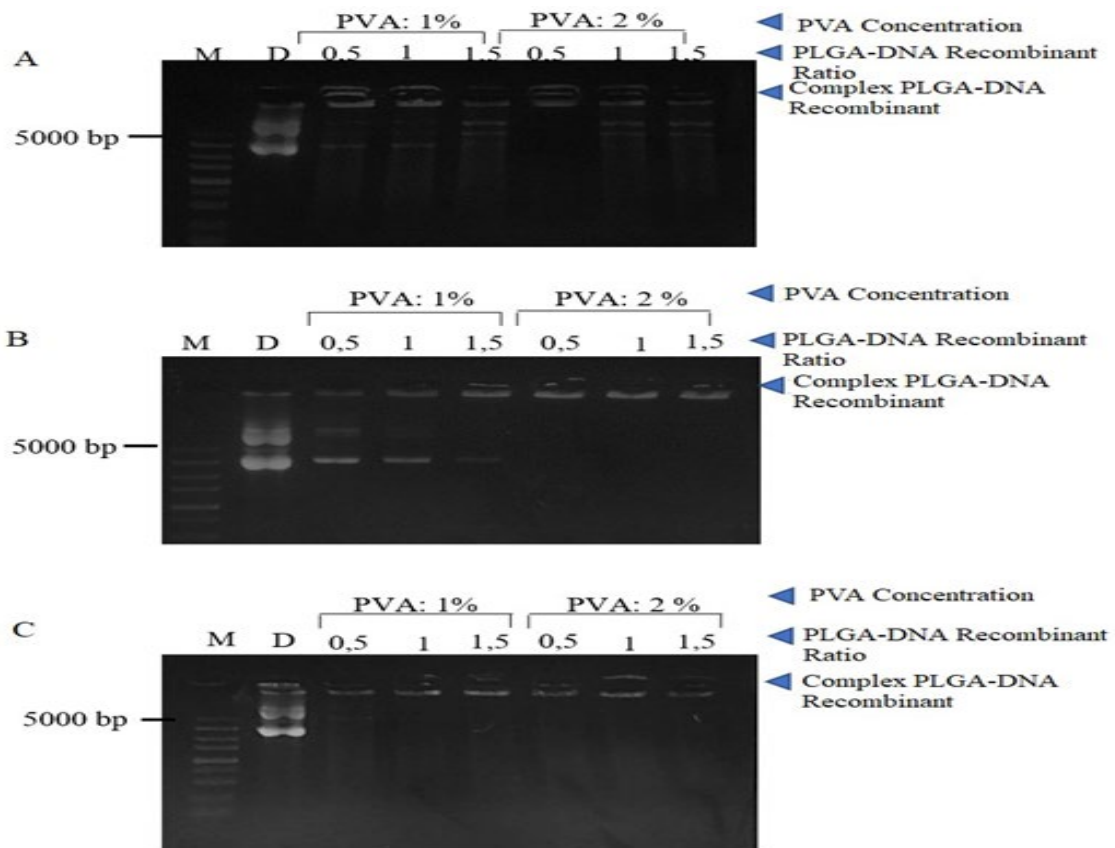
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Enkapsulasi Kompleks PLGA-pcDNA

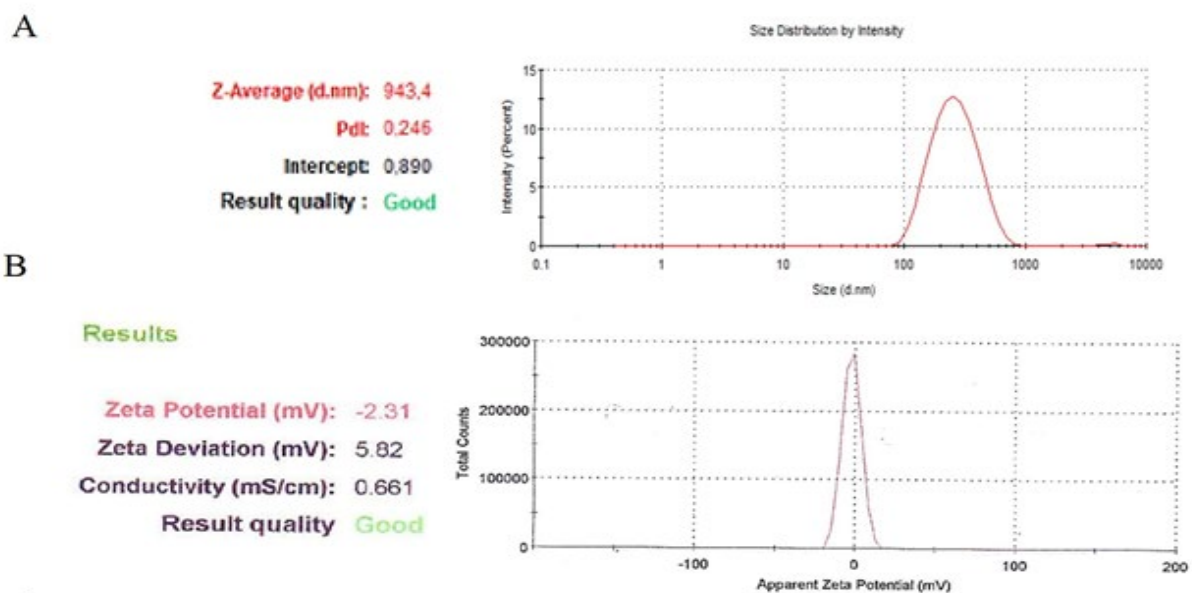
3.1-SB3-HBcAg dari Formulasi

Hasil analisis kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg menunjukkan bahwa efisiensi enkapsulasi pEGFP-C1-tat meningkat dengan meningkatnya konsentrasi PLGA dan PVA yang digunakan (Gambar. 1). Rasio PLGA: DNA: PVA yang digunakan untuk analisis lebih lanjut adalah 4%:0,5%:2% dengan mempertimbangkan efisiensi bahan. Hasil elektroforesis kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg pada penelitian ini menunjukkan bahwa efisiensi enkapsulasi PLGA terhadap DNA rekombinan pcDNA 3.1-SB3-HBcAg relatif tinggi seiring dengan peningkatan konsentrasi PLGA dan PVA yang digunakan, DNA rekombinan tanpa PLGA dan kitosan dapat bermigrasi dengan bebas. Namun, seiring dengan peningkatan konsentrasi PLGA dan PVA yang digunakan, DNA rekombinan tersebut terjerat dan terbungkus agar tetap berada di dalam gel well dan tidak dapat bermigrasi selama elektroforesis. Efisiensi enkapsulasi meningkat secara signifikan dengan meningkatnya

konsentrasi PLGA (Zhao dkk, 2010). Fenomena ini merupakan hasil dari peningkatan viskositas beberapa emulsi. Peningkatan viskositas dapat mencegah difusi DNA keluar dari fase minyak sehingga DNA akan tetap terbungkus dalam matriks PLGA (Zhao dkk, 2010).



Gambar 1. Visualisasi kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg. (A) 2,5% konsentrasi PLGA. (B) 4% konsentrasi PLGA. (C) 5% konsentrasi PLGA.



Gambar 2. Analisis karakterisasi fisikokimia kompleks PLGA-pEGFP-C1-tat. (A) Hasil pengukuran ukuran dan distribusi partikel dari kompleks PLGA-pEGFP-C1-tat. (B) Hasil pengukuran potensial zeta dari kompleks PLGA-pEGFP-C1-tat.

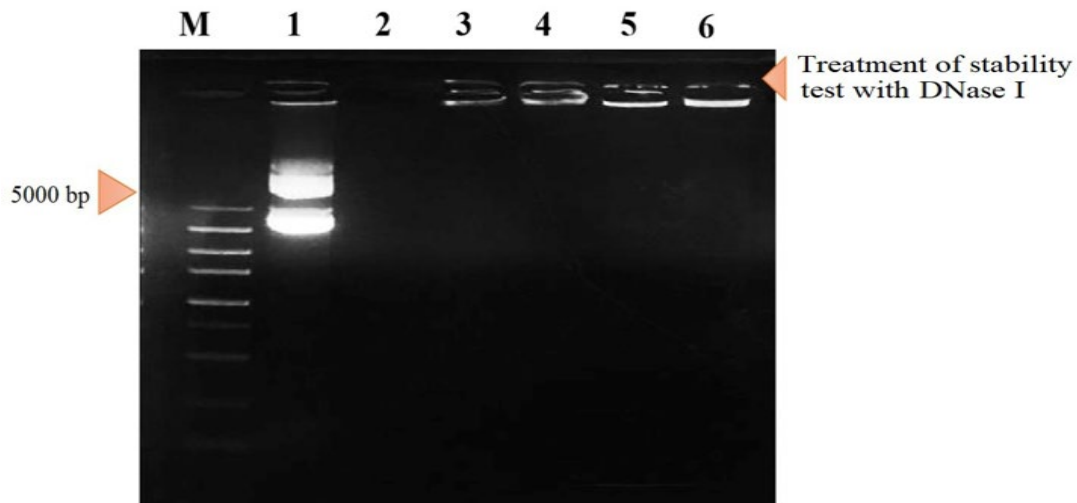
Analisis karakterisasi fisikokimia kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg

Hasil karakterisasi fisikokimia menunjukkan bahwa kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg memiliki nilai indeks polidispersitas sebesar 0,246 dengan ukuran 943,4 nm (Gambar 2A). Kemudian, potensial zeta adalah -2,31 mV (Gambar. 2B).

Ukuran partikel dalam bentuk partikel nano menentukan kemudahan partikel tersebut masuk ke dalam sel. Semakin rendah ukuran partikel maka akan semakin mudah untuk masuk ke dalam sel, dan daya serapnya akan semakin meningkat (Mohanraj, V & Chen, 2006). Hasil analisis distribusi ukuran menunjukkan bahwa kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg memiliki distribusi ukuran yang Homogen (monodisperse) dengan nilai indeks polidispersitas sebesar 0,246. Skor indeks polidispersitas mendekati 0 menunjukkan dispersi ukuran partikel yang homogen. Semakin rendah angka indeks polidispersitasnya, semakin kecil angka indeks polidispersitasnya, semakin homogen ukuran partikelnya. Hal ini penting karena jika perbedaan ukuran semakin besar akan mempengaruhi karakterisasi partikel (Avadi, M dkk, 2010). Nilai indeks polidispersitas yang rendah menunjukkan bahwa sistem dispersi yang terbentuk lebih stabil untuk jangka panjang (Gao, Zhang, & Chen, 2008). Sedangkan untuk ukuran partikel kompleks PLGA- pcDNA 3.1-SB3-HBcAg, ukuran partikel kompleks rekombinan PLGA-DNA pada penelitian ini cukup baik; ukuran partikel penelitian ini mirip dengan ukuran partikel kompleks rekombinan PLGA-DNA dari peneliti lain yaitu 884 nm (Ravi Kumar, M, N, Bakowsky, & Lehr, C, 2004).

Sifat muatan permukaan kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg perlu diketahui untuk menunjukkan kestabilan sistem koloid yang ditunjukkan oleh nilai potensial zeta atau sifat muatan permukaan partikel. Nilai zeta potensial yang tinggi dapat mencegah terjadinya proses agregasi pada partikel karena tolakan dan stabilisasi dispersi partikel. Pengukuran potensial zeta kompleks PLGA- pcDNA 3.1-SB3-HBcAg adalah -2,31 mV. Muatan negatif pada permukaan

partikel disebabkan oleh muatan negatif gugus karboksil PLGA dan ionisasi gugus asetat yang terdapat pada PVA (Lúcio dkk, 2015). PVA diperlukan selama pembentukan kompleks rekombinan PLGA-DNA sebagai penstabil partikel untuk meningkatkan efisiensi enkapsulasi DNA rekombinan (Ravi Kumar, M, N dkk, 2004). Nilai zeta potensial yang sama juga didapatkan oleh peneliti lain yaitu -3,3 mV (Kalvanagh, P, Ebtekar, Kokhaei, & Soleimanjahi, 2019). Muatan negatif ini adalah karakter dari sistem pengiriman PLGA; hal ini menyebabkan PLGA memiliki tingkat sitotoksitas yang sangat rendah; karena muatan negative menandakan tidak merusak keutuhan membran plasma dan tidak merusak mitokondria dan lisosom jika dibandingkan dengan kompleks partikel bermuatan positif (Fröhlich, 2012). Walaupun muatan kompleks PLGA- pcDNA 3.1-SB3-HBcAg negatif, kompleks tersebut tetap memiliki nilai serapan sel yang baik karena sistem penghantaran PLGA dimediasi oleh endositosis yang tidak tergantung clathrin untuk melewati membran sel (Palocci dkk, 2017).



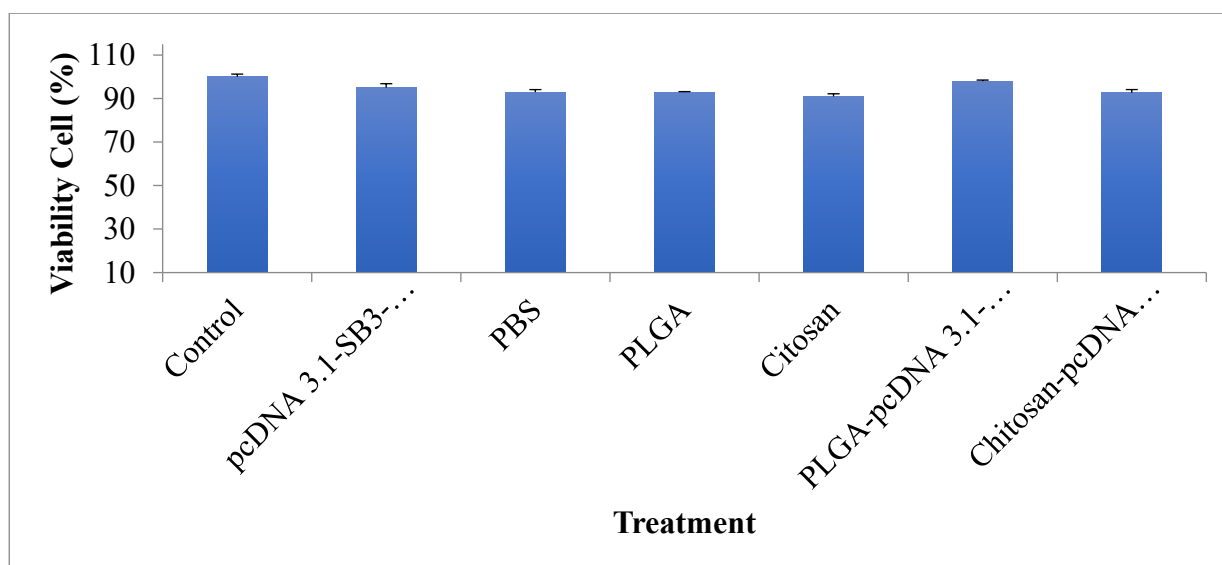
Gambar 3. Uji stabilitas kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg. (M), DNA mMarker 5.000 bp.; (1) DNA rekombinan tanpa penambahan DNase I.; (2) DNA rekombinan dengan penambahan DNase I.; (3) kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg tanpa menambahkan DNase I.; (4) kompleks PLGA- pcDNA 3.1-SB3-HBcAg dengan penambahan DNase I.; (5) kompleks Cchitosan- pcDNA 3.1-SB3-HBcAg tanpa penambahan DNase I.; (6) Chitosan-Kompleks pcDNA 3.1-SB3-HBcAg dengan penambahan DNase I.

Tes Stabilitas dengan DNase I

Data ini menunjukkan bahwa kompleks dapat melindungi pcDNA 3.1-SB3-HBcAg dari degradasi DNase I, sedangkan pcDNA 3.1-SB3-HBcAg tanpa PLGA atau kitosan terdegradasi oleh DNase I (Gambar. 3). Berdasarkan hasil uji stabilitas menggunakan DNase I, terlihat tidak ada DNA rekombinan yang terdegradasi. Hasil ini menunjukkan bahwa PLGA memiliki pEGFP-C1-tat secara efektif (Qingguo, Alison, & Jan, 2009). PEGFP-C1-tat *in line 1* yang merupakan DNA sirkular dan dalam isolasinya, diproses dengan menggunakan teknik kimia menyebabkan beberapa konformasi membentuk pita yang berbeda. DNA plasmid bebas bermigrasi ke beberapa pita DNA yang menunjukkan beberapa konformasi plasmid yang berbeda (Ishak dkk, 2019; L Unsunnidhal dkk, 2019) sedangkan pada baris 3 - 6 dengan memberikan formulasi sistem pengiriman PLGA dan kitosan akan membuat DNA tidak dapat bermigrasi karena DNA terperangkap dalam sistem pengiriman sehingga tidak dapat melewati pori-pori gel agarose Ishak dkk, 2019; L Unsunnidhal dkk, 2019, dalam hal ini dapat melindungi DNA dari degradasi oleh enzim DNase I dan membuktikan stabilitasnya Garis 4 dan 6.

Uji Sitotoksik dari Kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg

Berdasarkan pengujian sitotoksik, persentase sel hidup yang berada di PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg sebesar 98,03% (Gambar. 4). Hasil pengujian sitotoksik pada penelitian ini membuktikan bahwa sistem penghantaran PLGA tidak beracun dan dinilai memiliki tingkat keamanan yang tinggi terhadap sel.



Gambar 4. Viabilitas sel relatif terhadap kompleks PLGA-pcDNA 3.1-SB3-HBcAg.

Efek sitotoksik yang rendah dari penggunaan PLGA sebagai sistem penghantaran DNA rekombinan karena PLGA tersusun atas monomer asli laktat dan asam glikolat yang bersifat endogen yang mudah dimetabolisme dalam tubuh melalui siklus Krebs sehingga efek sitotoksik sistemik yang ditimbulkannya akan minimal dan tergolong aman (Danhier dkk, 2012). Selain itu, muatan negatif pada sistem penghantaran PLGA tidak merusak keutuhan membran sel pada saat endositosis dan juga tidak menyebabkan kerusakan lisosom sel (Fröhlich, 2012), bahkan tidak menimbulkan respon inflamasi (Mura dkk, 2011).

KESIMPULAN

Telah didapatkannya formulasi nanopartikel PLGA-DNA yang mempunyai ukuran 943,4 nm, telah diketahui karakterisasi zeta potensial dari nanopartikel PLGA-DNA yaitu -2,31 mV dan diketahui efek toksisitas nanopartikel PLGA dan DNA sebesar 98,03 % (Sel yang Hidup). Penelitian sangat berpotensi untuk dilanjutkan pada level transfeksi sel kultur.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, S, M, F., Al-Mahtab, M., Uddin, M, H., & Khan, S, I. (2013). HBsAg, HBcAg, and combined HBsAg/HBcAg-based therapeutic vaccines in treating chronic hepatitis B virus infection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 12(4), 363–369.
- Avadi, M, R., Sadeghi, A, M, M., Mohammad pour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., & Rafiee-Tehrani, M. (2010). Preparation and Characterization of Insulin Nanoparticles Using Chitosan and Arabic Gum with Ionic Gelation Method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 58–63.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J, M., Coco, R., Le Breton, A., & Pr eat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 505–522. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>
- Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5577–5591. Retrieved from <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>
- Gao, L., Zhang, D., & Chen, M. (2008). Drug Nanocrystals for the Formulation of Poorly Soluble Drugs and Its Application as a Potential Drug Delivery System. *J. Nanopart*, 10, 845–862.

- Huang, T., Song, X., Jing, J., Zhao, K., Shen, Y., Zhang, X., & Yue, B. (2018). Chitosan - DNA Nanoparticles Enhanced The Immunogenicity of Multivalent DNA Vaccination on Mice against *Trueperella pyogenes* Infection. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(8), 1–15.
- Ishak, J., Unsunidhal, L., Martien, R., & Kusumawati, A. (2019). In vitro evaluation of chitosan-DNA plasmid complex encoding Jembrana disease virus Env-TM protein as a vaccine candidate. *Journal of Veterinary Research*, 63(1), 7–16. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0018>
- Kalvanagh, P, A., Ebtekar, M., Kokhaei, P., & Soleimanjahi, H. (2019). Preparation and Characterization of PLGA Nanoparticles Containing Plasmid DNA Encoding Human IFN-Lambda-1/IL-29. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(1), 156–167.
- Lokhande. (2011). *HBV and HCV immunopathogenesis, in mukolov SL, Viral hepatitis, selected issues of pathogenesis and diagnostics intech open*. Croatia.
- Lúcio, M., Carvalho, A., Lopes, I., Gonçalves, O., Bárbara, E., & Oliveira, M. (2015). Polymeric Versus Lipid Nanoparticles: Comparative Study of Nanoparticulate Systems as Indomethacin Carriers. *Journal of Applied Solution Chemistry and Modeling*, 4(2), 95–109.
- Mohanraj, V, J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561–573.
- Mura, S., Hillaireau, H., Nicolas, J., Le Droumaguet, B., Gueutin, C., Zanna, S., ... Fattal, E. (2011). Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2591–2605. Retrieved from <https://doi.org/10.2147/ijn.s24552>
- Palocci, C., Valletta, A., Chronopoulou, L., Donati, L., Bramosanti, M., Brasili, E., ... Pasqua, G. (2017). Endocytic pathways involved in PLGA nanoparticle uptake by grapevine cells and role of cell wall and membrane in size selection. *Plant Cell Reports*, 36(12), 1917–1928. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2206-0>
- Qingguo, X., Alison, C., & Jan, C. (2009). Preparation and Characterization of Negatively Charged Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(7), 2377–2389.
- Ravi Kumar, M, N, V., Bakowsky, U., & Lehr, C, M. (2004). Preparation and Characterization of Cationic PLGA Nanospheres as DNA Carriers. *Biomaterials*, 25(10), 1771–1777.
- Unsunidhal, L, Ishak, J., & Kusumawati, A. (2019). Expression of gag-CA Gene of Jembrana Disease Virus with Cationic Liposomes and Chitosan Nanoparticle Delivery Systems as DNA Vaccine Candidates. *Tropical Life Sciences Research*, 30(3), 15–36. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.21315/tlsr2019.30.3.2>
- Unsunidhal, Lalu, Jannah, R., Haris, A., Supinganto, A., & Kusumawati, A. (2021). Potential of Nanoparticles Chitosan for Delivery pcDNA3.1-SB3- HBcAg. *BIO Web of Conferences*, 41(07003), 1–6.
- Unsunidhal, Lalu, Wasito, R., Setyawan, E. M. N., & Kusumawati, A. (2021). Potential of Nanoparticles Chitosan for Delivery pcDNA3.1-tat. *BIO Web of Conferences*, 41(07004), 1–6.
- World Health Organization. (2020). *Global Tuberculosis Report 2020*. Retrieved from Geneva, Switzerland:
- Zhao, K., Li, G. X., Jin, Y. Y., Wei, H. X., Sun, Q. S., Huang, T. T., & Tong, G. Z. (2010).

Preparation and immunological effectiveness of a Swine influenza DNA vaccine encapsulated in PLGA microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 27(2), 178–186. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.3109/02652040903059239>

Zhao, K., Zhang, Y., Zhang, X., Shi, C., Wang, X., Wang, X., & Cui, S. (2014). Chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles as an efficient delivery system for Newcastle disease virus DNA vaccine. *Chitosan-Coated Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid Nanoparticles as an Efficient Delivery System for Newcastle Disease Virus DNA Vaccine*, 9(1), 4609–4619. Retrieved from <https://doi.org/10.2147/IJN.S70633>