

Tersedia online di: journal.gunabangsa.ac.id

Journal of Health (JoH)

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



Chitosan Potential as Delivery Agent for S1 Gene from SARS-CoV-2 with pEGFP-N1 as its Vectors

Potensi Kitosan sebagai Sistem Penghantaran Gen S1 Virus SARS-CoV-2 dengan Vektor pEGFP-N1

Nabilah Adzra Fahlevi¹, Rarastoeti Pratiwi², Raudatul Jannah Nurina³, Tahta Afwi Maulina⁴, Asmarani Kusumawati^{5*}

Universitas Gadjah Mada Yogyakarta^{1,2,4,5}, STIKES Yarsi Mataram³

ABSTRACT

Coronavirus Disease-19 (COVID-19) is a disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), this disease began to emerge at the end of 2019 and has become a pandemic to this day. Vaccination can play an important role to prevent the spread of the disease, so there are many vaccine developments, including DNA vaccines. DNA vaccines have the shortcomings of being unstable and easily degraded in vivo so it requires a delivery system such as nanoparticles. Chitosan nanoparticles are most widely used because they have the characteristics of biodegradability, low toxicity, and biocompatibility with tissues and cells. biodegradable, low toxicity, and biocompatibility with tissues and cells. The purpose of this study was to optimize and evaluate the pEGFP-N1-S1 formula with a chitosan delivery system as a DNA vaccine candidate. Recombinant plasmids were cloned in *E. coli* DH5 α and extracted for further evaluation with restriction enzymes and sequencing. The EGFP-N1-S1 plasmid was then formulated with chitosan nanoparticles using the complex coacervation method with a mass ratio of plasmid DNA and chitosan of 1:0.1; 1:0.2; 1:0.3; 1:0.4; 1:0.5; 1:0.6 and 1:0.7. The isolated plasmid has a concentration of 2182.32 ng/L and a purity of 1.911 at absorbance ratio A260/A280 and 2.271 at A260/A230. Synthetic gene S1 (684 bp) was successfully inserted into plasmid pEGFP-N1 (4813 bp) based on the results of double digestion by BglII and EcoRI restriction enzymes and sequencing data alignment results. DNA: chitosan mass ratio of 1:0.6 is the optimal formulation for DNA to bind with chitosan perfectly.

Keywords: COVID-19, S1 Gene, Chitosan, SARS-CoV-2, DNA Vaccine

INFORMASI ARTIKEL

Diterima : 26 September 2023
Direvisi : 03 November 2023
Disetujui : 06 November 2023
Dipublikasi : 01 Juli 2024

KORESPONDENSI

Asmarani Kusumawati
uma_vet@ugm.ac.id

Copyright © 2024 Author(s)



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

INTISARI

Coronavirus Disease-19 (COVID-19) merupakan penyakit yang disebabkan oleh *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2* (SARS-CoV-2), penyakit ini mulai muncul pada akhir tahun 2019 dan menjadi pandemi hingga saat ini. Vaksinasi dapat berperan penting dalam prevensi penyebaran penyakit, sehingga banyak dilakukan pengembangan vaksin salah satunya ialah vaksin DNA. Vaksin DNA memiliki kekurangan yaitu tidak stabil dan mudah terdegradasi secara in vivo sehingga diperlukan suatu sistem penghantaran seperti nanopartikel. Nanopartikel kitosan paling banyak digunakan karena memiliki karakteristik *biodegradable*, toksisitas yang rendah, dan biokompatibilitas dengan jaringan dan sel. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengoptimasi dan mengevaluasi formula pEGFP-N1-S1 dengan sistem penghantaran kitosan sebagai kandidat vaksin DNA. Plasmid rekombinan dilakukan kloning pada *E. coli* DH5 α dan dilakukan ekstraksi untuk evaluasi selanjutnya dengan enzim restriksi dan sekuensing. Plasmid EGFP-N1-S1 kemudian diformulasikan

dengan nanopartikel kitosan menggunakan metode *complex coacervation* dengan rasio massa plasmid DNA dan kitosan sebesar 1:0,1; 1:0,2; 1:0,3; 1:0,4; 1:0,5; 1:0,6 dan 1:0,7. Sampel yang dilakukan isolasi plasmid memiliki konsentrasi 2182,32 ng/L dan kemurnian sebesar 1,911 pada rasio absorbansi A260/A280 dan 2,271 pada A260/A230. Gen sintetik S1 (684 bp) berhasil diinsersi pada plasmid pEGFP-N1 (4813 bp) berdasarkan hasil *double digestion* oleh enzim restriksi BglII dan EcoRI serta hasil pensejajaran data sekuensing. Rasio massa DNA: kitosan sebesar 1:0,6 merupakan formulasi yang optimal untuk DNA berikatan dengan kitosan secara sempurna.

Kata kunci: COVID-19, Gen S1, Kitosan, SARS-CoV-2, Vaksin DNA

PENDAHULUAN

Pendahuluan Coronavirus Disease-19 (COVID-19) merupakan penyakit yang mulai muncul pada akhir tahun 2019 dan menjadi pandemi hingga saat ini. Penyakit ini diakibatkan oleh *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2* (SARS-CoV-2) (Singhal, 2020). Menurut data dari *World Health Organization* (2023), hingga tanggal 5 Juli 2023 tercatat sebanyak 769.774.646 kasus COVID-19 di seluruh dunia. Indonesia menempati peringkat ke-20 dengan kasus COVID-19 sebanyak 6.813.095 di seluruh dunia.

SARS-CoV-2 termasuk ke dalam subfamili *coronavirinae* dari famili *coronaviridae* dengan genus *betacoronavirus*. SARS-CoV-2 memiliki protein struktural yang terdiri dari Spike (S), Envelope (E), Membrane (M), Nucleocapsid (N), Hemagglutinin esterase (HE) dan Helicase (H). Protein Spike (S) merupakan protein transmembran yang memiliki berat molekul 150 kDa. Protein S berada di permukaan luar virus yang jika berintegrasi dengan protein E memiliki aktivitas viroporin yang penting dalam siklus infeksi virus. Protein S memiliki 2 subunit yaitu S1 dan S2. Subunit S1 ini memiliki receptor-binding domain (RBD) yang berperan dalam pengikatan virus ke reseptor sel inang, sehingga subunit ini dapat dijadikan sebagai kandidat pengembangan vaksin (Peng dkk., 2021).

Penanganan COVID-19 hingga saat ini dilakukan dengan vaksinasi, terdapat berbagai macam jenis vaksin salah satunya ialah vaksin DNA. Vaksin DNA ialah vaksin berbasis vektor ekspresi rekombinan eukariotik yang mampu mengaktifkan respon sistem imun humoral dan selular. Preparasi vaksin ini tidak membutuhkan handling partikel virus yang berbahaya. Keuntungan dari vaksin DNA ialah

memungkinkan pengkodean beberapa antigen dalam satu vaksin, biaya yang dikeluarkan lebih rendah, *thermal stability*, serta efisien dalam produksi skala besar karena menggunakan bakteri (Peng dkk., 2021; Tsang dkk., 2021) Vaksin ini memiliki kekurangan yaitu memiliki imunogenisitas yang rendah dan tidak stabil serta DNA dapat mudah terdegradasi secara *in vivo* (Duan dkk., 2020). Salah satu metode penghantaran gen ialah menggunakan nanopartikel (Vu dkk., 2021). Nanopartikel ini dapat meningkatkan penghantaran dan melindungi vaksin dari degradasi secara *in vivo*. Jenis nanopartikel yang paling banyak digunakan ialah kitosan (Duan dkk., 2020; Vu dkk., 2021). Kitosan merupakan polimer *biodegradable* yang telah disetujui oleh FDA untuk penggunaannya sebagai sistem penghantaran. Kitosan digunakan dalam sistem penghantaran obat karena memiliki karakteristik antiviral, anti-fungal dan antibakteri Selain itu juga, kitosan memiliki pelepasan terkontrol dan berkelanjutan serta memiliki toksisitas rendah (El Hady dkk., 2019) yang sangat berpotensi sebagai biopolymer yang digunakan untuk pembuatan vaksin SARS-CoV-2 (Mallakpour dkk., 2021).

Plasmid pEGFP-N1 digunakan sebagai vektor karena membawa gen resisten terhadap antibiotik kanamisin (Clontech, 1999). Kanamisin ditambahkan pada medium dengan tujuan untuk menyeleksi hanya bakteri transforman yang dapat tumbuh dan juga bertujuan untuk mencegah pertumbuhan sel lain yang tidak memiliki resistensi terhadap kanamisin. Selain itu, pEGFP-N1 memiliki *elemen poly (A) tail* SV40 dan HSV TK. Penambahan *poly (A) tail* (poliadenilasi) mempengaruhi stabilitas produk plasmid DNA yang rentan terhadap degradasi

endonuclease (Wang dkk., 2022) . Sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan vektor plasmid pEGFP-N1 sebagai vektor kloning gen S1 SARS-CoV-2 serta menemukan formulasi yang tepat dengan nanopartikel kitosan.

METODE

Koloni bakteri dikulturkan ke media cair untuk diisolasi plasmidnya menggunakan *Plasmid DNA Extraction Maxi Kit* (Favorgen Biotech Corp) dan dilakukan sesuai dengan prosedur protokol kit yang diberikan. Kemurnian dan konsentrasi hasil isolasi kemudian diukur dengan NanoDrop Spektrofotometer. Hasil isolasi dilakukan *double digestion* dengan menambahkan 1 µL plasmid yang kemudian ditambahkan 1 µL enzim *BglII* (10 U/µL), 1 µL enzim *EcoRI* (20 U/µL), 2 µL buffer enzim restriksi dan 15 µL *Nuclease Free Water* (NFW). Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Kemudian plasmid dielektroforesis untuk memastikan bahwa restriksi berhasil.

Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose 1% dengan cara melarutkan 0,5gram agarose dengan TAE buffer 1x sebanyak 50 mL. Larutan kemudian dipanaskan di dalam *microwave* hingga larut. Setelah itu, larutan ditambahkan 5 µL SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Kemudian larutan agarose dituangkan kedalam cetakan gel dan tunggu gel mengeras ± 20 menit. Setelah gel mengeras, gel dimasukkan ke dalam *electrophoresis chamber* yang telah berisi oleh TAE buffer 1x. *Loading* sampel ke dalam sumuran gel dengan cara mencampurkan 5 µL sampel isolasi plasmid dengan Gel Pilot DNA loading dye 5x (Qiagen) pada parafilm. Elektroforesis dilakukan menggunakan tegangan 100 V selama 60 menit. Kemudian, hasil divisualisasikan dengan *UV Illuminator*.

Hasil isolasi juga dilakukan PCR dengan *PowerPol 2X PCR Mix with Dye* dan primer sekuensing pEGFP-N1 yang dapat dilihat melalui *website addgene* dengan urutan *forward* (5'-

TGGGAGGTCTATATAAGCAGAG-3') dan *reverse* (5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3'). Master mix PowerPol 12,5 µL ditambahkan dengan 10,5 µL ddH₂O, primer *forward* 0,5 µL, primer *reverse* 0,5 µL dan hasil isolasi plasmid 2 µL. *Running PCR* dilakukan pada suhu *annealing* 56,2 °C. Hasil PCR kemudian dilakukan sekuensing dan data yang diperoleh dianalisis menggunakan BioEdit.

Langkah pertama dalam formulasi Plasmid DNA: Kitosan ialah preparasi larutan kitosan dengan cara melarutkan kitosan dalam larutan asam asetat 5 nM dengan pengadukan. Setelah itu, larutan diatur pHnya menjadi 4,0 menggunakan NaOH 1M. Larutan polimer kitosan yang telah terbentuk dan memiliki konsentrasi final 0,02% selanjutnya akan difilter steril menggunakan filter 0,2 µm.

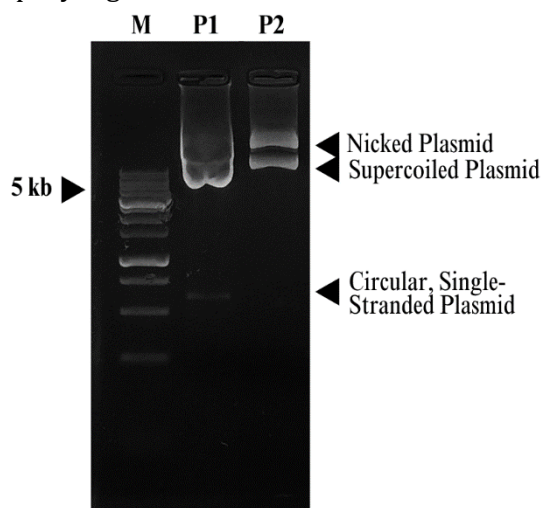
Larutan kitosan dibuat konsentrasi 0,005 % (b/v) pada pH 4. Formulasi dilakukan dengan metode *complex coacervation* dengan beberapa modifikasi. DNA rekombinan 1 µg ditambahkan ke masing-masing *tube* dengan perbandingan massa DNA:kitosan sebesar 1:0,1; 1:0,2; 1:0,3; 1:0,4; 1:0,5; 1:0,6 dan 1:0,7. *Tube* kemudian dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 50°C selama 10 menit. Plasmid DNA dan larutan polimer kitosan dicampur dan divortex selama 20 detik kemudian campuran larutan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang (Ishak dkk., 2019; Martien dkk., 2007; Unsunnidhal dkk., 2019). Kompleks nanopartikel kemudian disimpan pada suhu ruang. Uji migrasi atau *gel retardation assay* pada kompleks nanopartikel DNA/kitosan dilakukan menggunakan gel agarose 0,8 % dengan tegangan 100 V selama 30 menit.

Penelitian ini memiliki Ethical Clearance dengan nomor: KE/FK/0929/EC/2022 yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Plasmid pEGFP-N1-S1

Isolasi plasmid ialah suatu teknik yang digunakan untuk mengekstraksi plasmid DNA dari sel bakteri. Plasmid DNA dapat digunakan pada berbagai aplikasi di bidang molekuler seperti sekuensing, *digestion* dengan enzim restriksi, PCR, kloning maupun transeksi. Terdapat beberapa metode yang sudah dikembangkan hingga kini untuk melakukan isolasi plasmid, salah satunya ialah menggunakan kit komersial (Andreou, 2013). Isolasi plasmid dilakukan menggunakan *Plasmid DNA Extraction Maxi Kit* (Favorgen Biotech Corp) yang dilakukan berdasarkan manual prosedur kit yang diberikan. Hasil isolasi plasmid ini kemudian dihitung kemurnian dan konsentrasinya menggunakan nanodrop. Hasil isolasi plasmid ini juga dilakukan elektroforesis dengan gel agarose 0,8% selama 30 menit pada 100V. Secara topologi, plasmid DNA memiliki bentuk *supercoil*. Namun, ketika proses ekstraksi plasmid akan memiliki beberapa bentuk lain seperti *open-circular/nicked-circular*, *linear*, *covalently bound* dan *circular single stranded* (Balagurumoorthy *dkk.*, 2008; Roy *dkk.*, 2018). Visualisasi hasil isolasi plasmid *uncut* (Gambar 1.) juga menunjukkan beberapa *band* terbentuk pada sampel yang sama.

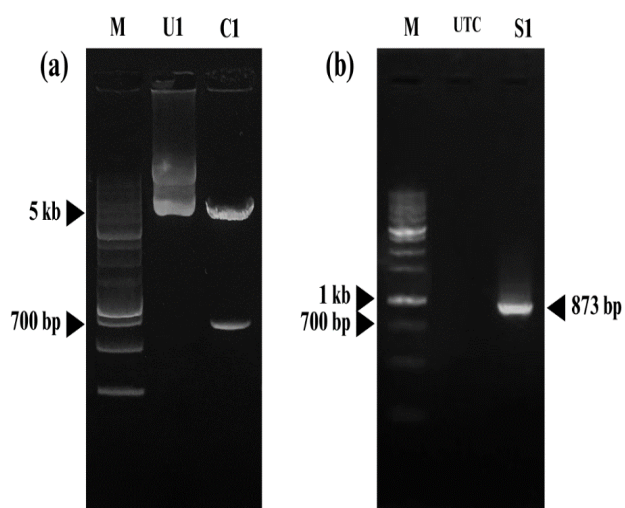


Gambar 1. Visualisasi hasil isolasi plasmid pEGFP-N1-S1. Marker 1000 bp (M), hasil isolasi (P1), hasil isolasi dengan dilusi 5x (P2)

Sampel plasmid DNA sebelum digunakan untuk penelitian perlu dilakukan pengukuran kemurnian dan konsentrasinya. Konsentrasi DNA dapat diukur pada panjang gelombang 260 nm. Konsentrasi sampel plasmid yang didapatkan ialah 2182,32 ng/ μ L. Pengukuran dengan rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm (A260/A280) serta panjang gelombang 260 dan 230 nm (A260/A230) digunakan sebagai indikator kemurnian pada sampel asam nukleat. Pengukuran ini dilakukan dengan instrumen *NanoDrop* Spektrofotometer (MaestroGen). Sampel DNA dapat dikatakan murni jika memiliki rentang nilai antara 1,8-2,0 pada rasio absorbansi A260/A280 (Sambrook & Russell, 2001). Rasio absorbansi A260/A230 akan memiliki rentang nilai 2,0-2,2 jika sampel yang terukur murni (Liu *dkk.*, 2009). Sampel yang diujikan memiliki nilai yang termasuk pada kedua rentang tersebut dengan nilai A260/A280 sebesar 1,911 dan A260/A230 sebesar 2,271.

Analisis Konstruksi pEGFP-N1-S1 dengan Enzim Restriksi dan Sekuensing

Restriksi dilakukan sebelum melakukan sekuensing pada sampel plasmid. Proses ini bertujuan untuk mengonfirmasi bahwa plasmid hasil isolasi merupakan plasmid rekombinan yang mengandung *insert gen target* (gen S1). Plasmid dilakukan pemotongan menggunakan enzim *BglII* dan *EcoRI*. Enzim *EcoRI* merupakan enzim yang umum dipakai untuk melakukan restriksi. Enzim ini memiliki situs pengenalan palindromik dengan sekuens komplemennya yaitu G \downarrow AATTC dan memiliki hasil pemotongan *sticky ends* dengan *overhang* pada 5'. Enzim *BglII* memiliki hasil pemotongan *sticky ends* dengan *overhang* pada 3'dan memiliki situs pengenalan pada A \downarrow GATCT. Kedua enzim ini termasuk pada enzim restriksi endonuklease tipe II (Nevinsky, 2021; Pingoud & Jeltsch, 2001).

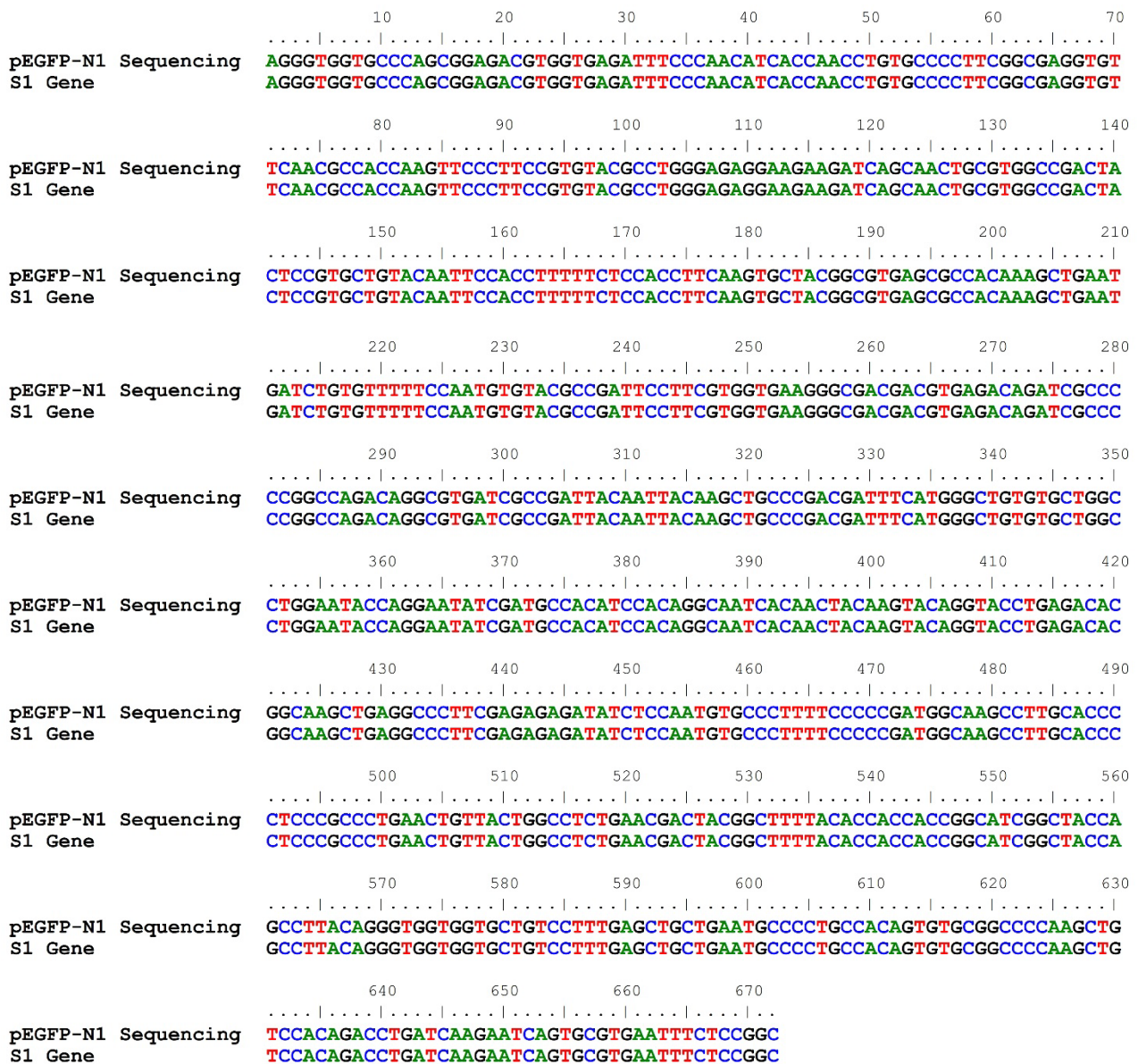


Gambar 2. Visualisasi elektroforesis (a) restriksi isolat pEGFP-N1-S1 dan (b) hasil PCR. Marker 1000 bp (M1), *uncut* pEGFP-N1-S1 (U1), pEGFP-N1-S1 *double digestion* (C1), *untemplate Control* (UTC), hasil PCR (S1).

Hasil restriksi kemudian dilakukan visualisasi menggunakan gel agarose 1 % (Gambar 2). Plasmid rekombinan yang telah dilakukan *double digestion* atau restriksi akan membentuk dua *band*. Kedua *band* ini menunjukkan plasmid pEGFP-N1 dengan ukuran 4.713 bp dan sekuens S1 dengan ukuran 684 bp pada sampel C1. Isolat kemudian dilakukan amplifikasi dengan menggunakan primer pEGFP-N1. Hasil amplifikasi plasmid rekombinan menunjukkan *band* yang terbentuk pada marker antara 700 dan 1000 bp yang kemungkinan panjang amplicon tersebut 873 bp. Produk PCR yang dihasilkan dalam penelitian ini spesifik dengan sekuens target serta menunjukkan *band* yang tebal. *Band* yang tebal menunjukkan bahwa plasmid DNA memiliki konsentrasi yang tinggi. Sebaliknya, jika konsentrasi DNA rendah maka *band* yang dihasilkan akan tipis (Setiati dkk., 2020). Menurut Sjafaraenan dkk., (2018), keberhasilan dalam amplifikasi DNA menggunakan PCR meliputi berbagai faktor seperti kemurnian dan konsentrasi komponen dalam master mix PCR, primer yang digunakan, kemurnian dan jumlah sampel DNA serta kontaminan. Konsentrasi DNA dapat mempengaruhi jumlah amplicon yang dihasilkan pada proses PCR. Semakin tinggi

konsentrasi DNA maka semakin cepat proses *annealing* PCR berlangsung. Proses *annealing* yang cepat akan menghasilkan amplicon dalam jumlah yang banyak (Weaver, 2012).

Sekuensing DNA dalam laboratorium digunakan untuk menentukan urutan pasangan basa secara tepat pada suatu fragmen DNA. Sekuens DNA memiliki berbagai informasi penting bagi suatu organisme oleh karena itu, teknik sekuensing DNA ini bermanfaat dalam penelitian untuk mengetahui bagian dari suatu genom, kromosom atau gen dalam suatu organisme (Widłak, 2013). Metode sekuensing yang digunakan ialah *Sanger Sequencing*. Data yang didapatkan dari sekuensing dapat dianalisis dengan *alignment*. *Alignment* atau pensejajaran dilakukan untuk mengetahui kesamaan dan perbedaan antara beberapa sekuens (Bayat dkk., 2019) sehingga dapat mendeteksi perubahan basa seperti delesi, insersi ataupun inversi (Lottspeich & Engels, 2018). *Pairwise sequence alignment* adalah tipe *alignment* yang dilakukan pada dua sekuens yang dapat dianalisis menggunakan algoritma *global alignment* atau *local alignment*. *Global alignment* adalah metode untuk menyejajarkan dua sekuens secara keseluruhan. Sedangkan *local alignment* hanya menyejajarkan pada wilayah sekuens tertentu yang memiliki kesamaan yang tinggi (Chao dkk., 2022). Data sekuensing pada penelitian ini dianalisis menggunakan *pairwise alignment* dengan algoritma *local alignment* dari *software* Bioedit.



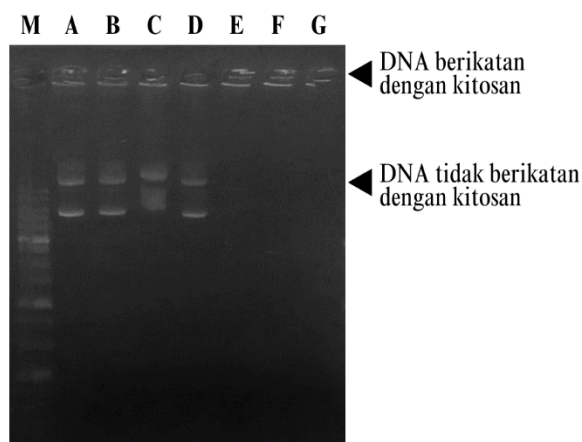
Gambar 3. Analisis *pairwise alignment* hasil sekuensing dengan Bioedit

Data hasil sekuensing yang didapatkan dilakukan pensejajaran dan membentuk urutan basa nuklotida “consensus” yang diberikan label nama “*pEGFP-N1 Sequencing*”. Analisis pensejajaran hasil sekuensing dengan *reference gene* S1 (Gambar 3.) menunjukkan bahwa sampel plasmid tidak menunjukkan adanya mutasi atau perubahan basa nukleotida. Gen S1 sebagai gen target juga berhasil diinsersi pada sekuens plasmid secara sempurna dengan tidak adanya perubahan pada basa nukleotida.

Uji Migrasi atau Gel Retardation Assay pada kompleks pEGFP-N1-S1/K

Kompleks nanopartikel pEGFP-C1-S1/K dan pEGFP-N1-S1/K dalam penelitian ini dipreparasi dengan metode koaservasi kompleks dengan memvariasikan rasio kitosan terhadap DNA menjadi beberapa variasi rasio DNA:Kitosan yaitu 1:0,1 sampai 1:0,7. Pembentukan kompleks kitosan-DNA diamati dengan gel retardation assay/uji migrasi kompleks pada gel agarosa (Gambar 4).

Dengan indikator yang diamati berupa DNA yang mampu terjerat sempurna dalam nanopartikel kitosan dengan harapan tidak ada DNA yang terlepas saat proses visualisasi.



Gambar 4. Visualisasi *retardation assay* pada kompleks nanopartikel pEGFP-N1/K. Marker 1 Kb (M), pEGFP-C1-S1 tanpa kitosan (P), Rasio 1:0,1 (A), Rasio 1:0,2 (B), Rasio 1:0,3 (C), Rasio 1:0,4 (D), Rasio 1:0,5 (E), Rasio 1:0,6 (F), Rasio 1:0,7 (G)

Seiring peningkatan massa kitosan dalam pembuatan nanopartikel, DNA plasmid bebas yang mampu bermigrasi juga semakin berkurang. Hal ini terlihat dari adanya pendaran DNA plasmid bebas pada formulasi dengan rasio 1:0,1 sampai 1:0,5, namun tidak pada formulasi dengan rasio kitosan yang lebih tinggi. Semakin banyak kitosan yang ditambahkan dalam formulasi, semakin banyak DNA plasmid yang terenkapsulasi membentuk kompleks kitosan-DNA. Dari visualisasi di gel agarosa, perbandingan massa 1:0,6 merupakan perbandingan minimum kitosan yang paling efektif dalam mengenkapsulasi DNA plasmid baik pada pEGFP-C1-S1/K. Penelitian tentang pembuatan nanopartikel kitosan/DNA ini telah banyak dilakukan seperti penelitian dari Unsunnidhal *dkk.*, (2019) yang memformulasikan nanopartikel kitosan 0,02% dengan plasmid yang mengandung gen gag-CA dari virus Jembrana. Penelitian ini menghasilkan formulasi yang memiliki rasio minimum 1:2 yang dapat memperangkap plasmid secara keseluruhan. Hasil yang serupa juga didapatkan pada penelitian Ishak *dkk.*, (2019) yang memformulasikan kitosan dengan plasmid yang mengandung gen Env-TM

dari virus Jembrana dengan rasio minimum 1:2 juga.

KESIMPULAN

Plasmid rekombinan yang digunakan dalam penelitian memiliki konsentrasi sebesar 2182,32 ng/ μ L dengan memiliki kemurnian 1,911 dan 2,271. Gen target S1 berhasil diinsertkan pada plasmid pEGFP-N1, yang terbukti dari hasil restriksi menunjukkan dua band berukuran 684 dan 4813 bp. Urutan nukleotida gen target pada plasmid rekombinan identik dengan gen *reference*, hal ini menandakan bahwa gen tidak mengalami perubahan nukleotida atau mutasi saat diinsertkan pada plasmid. Rasio massa DNA: kitosan sebesar 1:0,6 terbukti sebagai formulasi yang optimal untuk membentuk kompleks DNA-Kitosan dengan keseimbangan yang sempurna.

Penelitian ini dapat diteruskan dengan tahap uji karakterisasi fisikokimia pada kompleks nanopartikel DNA/kitosan. Tahapan selanjutnya juga bisa dilakukan transfeksi pada sel eukariot dengan menguji sitotoksitas sel terhadap kompleks nanopartikel maupun melihat ekspresi protein dan RNA dari sel hasil transfeksi.

APRESIASI

Penelitian ini dilakukan dengan hibah dana penelitian pada Program Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Tahun Anggaran 2023 yang diselenggarakan oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset dan Teknologi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi (Kemendikbudristek) dengan nomor kontrak 3211/UN1/DITLIT/Dit-Lit/PT.01.03/2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Andreou, L. (2013). Isolation of Plasmid DNA from Bacteria. In *Laboratory Methods in Enzymology: DNA* (1st ed., Vol. 529). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00010-0>
- Balagurumoorthy, P., Adelstein, S. J. A., & Kassis, A. I. (2008). Method to eliminate linear DNA

- from mixture containing nicked circular, supercoiled, and linear plasmid DNA. *Analytical Biochemistry*, 381(1), 172–174. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.06.037>.
- Bayat, A., Gaëta, B., Ignjatovic, A., & Parameswaran, S. (2019). Pairwise alignment of nucleotide sequences using maximal exact matches. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2827-0>
- Chao, J., Tang, F., & Xu, L. (2022). Developments in Algorithms for Sequence Alignment: A Review. *Biomolecules*, 12(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/biom12040546>
- Clontech. (1999). pEGFP-N1 Vector Information. *Clontech Laboratories, Inc*, 1–3.
- Duan, Y., Wang, S., Zhang, Q., Gao, W., & Zhang, L. (2020). *Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company 's public news and information . January.*
- El Hady, W. E. A., Mohamed, E. A., El-Aazeem Soliman, O. A., & El-Sabbagh, H. M. (2019). In vitro-in vivo evaluation of chitosan-PLGA nanoparticles for potentiated gastric retention and anti-ulcer activity of diosmin. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 7191–7213. <https://doi.org/10.2147/IJN.S213836>
- Ishak, J., Unsunnidhal, 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 (Poland)*, 63(1), 7–16. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0018>
- Liu, P., Avramova, L. V., & Park, C. (2009). Revisiting absorbance at 230 nm as a protein unfolding probe. *Analytical Biochemistry*, 389(2), 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.03.028>
- Lottspeich, F., & Engels, J. W. (2018). *Bioanalytics - Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology*. Wiley-VCH.
- Mallakpour, S., Azadi, E., & Mustansar, C. (2021). Chitosan, alginate, hyaluronic acid, gums, and β -glucan as potent adjuvants and vaccine delivery systems for viral threats including SARS-CoV-2: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182(March), 1931–1940.
- Martien, R., Loretz, B., Thaler, M., Majzoob, S., & Bernkop-Schnürch, A. (2007). Chitosan-thioglycolic acid conjugate: An alternative carrier for oral nonviral gene delivery? *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 82(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31135>
- Nevinsky, G. A. (2021). How enzymes, proteins and antibodies recognize extended dnas; general regularities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–35. <https://doi.org/10.3390/ijms22031369>
- Peng, X. L., Cheng, J. S. Y., Gong, H. L., Yuan, M. Di, Zhao, X. H., Li, Z., & Wei, D. X. (2021). Advances in the design and development of SARS-CoV-2 vaccines. *Military Medical Research*, 8(1), 1–31. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00360-1>
- Pingoud, A., & Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 29(18), 3705–3727. <https://doi.org/10.1093/nar/29.18.3705>
- Roy, U., Mishra, A., Jana, P., Karmakar, S., & Sciences, F. (2018). *A Comparative Study on Different Plasmid Isolation Procedures A Comparative Study on Different Plasmid Isolation Procedures. October.* <https://doi.org/10.18782/2320-7051.6988>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Editio). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Setiati, N., Partaya, & Hidayah, N. (2020). The use of two pairs primer for CO1 gene amplification on traded stingray at fish auction Tasik Agung Rembang The use of two pairs primer for CO1 gene amplification on traded stingray at fish auction Tasik Agung Rembang. *Journal of Physics: Conference Series*, 1567. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1567/3/032056>
- Singhal, T. (2020). Review on COVID19 disease so far. *The Indian Journal of Pediatrics*, 87(April), 281–286.
- Sjafaraenan, S., Lolodatu, H., Johannes, E., Agus, R., & Sabran, A. (2018). Profil Dna Gen Follicle Stimulating Hormone Reseptor (Fshr) Pada Wanita Akne Dengan Teknik Pcr Dan Sekuensing Dna. *Bioma: Jurnal Biologi Makassar*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.20956/bioma.v3i1.3909>
- Tsang, H. F., Chan, L. W. C., Cho, W. C. S., Yu, A. C. S., Yim, A. K. Y., Chan, A. K. C., Ng, L. P. W., Wong, Y. K. E., Pei, X. M., Li, M. J. W., & Wong, S. C. C. (2021). An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 19(7), 877–888. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1863146>
- 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. <https://doi.org/10.21315/tlsr2019.30.3.2>
- Vu, M. N., Kelly, H. G., Kent, S. J., & Wheatley, A. K. (2021). Current and future nanoparticle vaccines for COVID-19. *EBioMedicine*, 74, 103699. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103699>
- Wang, X. Y., Du, Q. J., Zhang, W. L., Xu, D. H., Zhang, X., Jia, Y. L., & Wang, T. Y. (2022). Enhanced Transgene Expression by Optimization of Poly A in Transfected CHO Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.722722>
- Weaver, R. F. (2012). *Molecular Biology, Fifth Edition*. McGraw-Hill Companies, Inc.
- Widłak, W. (2013). *Molecular Biology Not Only for Bioinformaticians*. Springer Heidelberg New York Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45361-8_9
- World Health Organization (2023). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>. Diakses pada tanggal 20 Agustus 2023.