

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penghantaran materi genetik ke dalam sel merupakan pendekatan modifikasi fungsi sel yang dapat diaplikasikan dalam terapi gen berbagai penyakit. Vektor merupakan komponen penting dalam sistem penghantaran materi genetik. Materi genetik bersifat rapuh, tidak stabil, dan memiliki ekspresi rendah sehingga diperlukan vektor untuk menghantarkan ke lokasi yang ditargetkan. Secara umum, vektor dapat dikategorikan menjadi vektor viral dan non-viral. Seiring dengan perkembangan penelitian terkait sistem penghantaran gen, vektor non-viral lebih banyak diteliti karena permasalahan keamanan dari vektor viral (Akshaya *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). Salah satu vektor non-viral, misalnya liposom, banyak dikembangkan untuk penghantaran materi genetik dan obat pada umumnya (Alavi *et al.*, 2017).

Liposom sebagai vektor non-viral memiliki kelebihan yakni bersifat biokompatibel dan *biodegradable*. Dalam mekanisme penghantaran obat/materi genetik, liposom dapat mencegah degradasi zat yang dienkapsulasi dan mengirimkan muatan secara selektif melalui penargetan pasif/aktif (Alavi *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2022). Liposom kationik umumnya tersusun atas lipid kationik dengan 12-18 rantai karbon yang dikombinasikan dengan lipid netral seperti *dioleylphosphatidylethanolamine* (DOPE) dan

kolesterol. Liposom kationik bermuatan positif sehingga mudah berinteraksi dengan membran sel bermuatan negatif dan membentuk kompleks dengan materi genetik secara efisien (Nsairat *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2016; Simoes *et al.*, 2005; Nayerossadat *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2022).

Asam linoleat (C18:2) dalam formulasi liposom berperan untuk meningkatkan penetrasi dan penyerapan terhadap membran fosfolipid sel. Peptida sistein, histidin, serin (CHS) berperan meningkatkan stabilitas kompleks, melindungi DNA, dan memfasilitasi mekanisme *endosomal escape*. Peptida *Nuclear Localization Signal* (NLS) berperan dalam penghantaran materi genetik dari sitoplasma ke dalam nukleus (Huang *et al.*, 2022; McErlean *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021; Lo & Wang 2008; Ragin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011). Metode preparasi liposom yang digunakan yaitu metode injeksi etanol karena prosesnya yang cepat, mudah, dan aman (Shaker *et al.*, 2017). Preparasi liposom berbasis lipopeptida kationik asam linoleat diformulasikan dengan fosfolipid *dioleylphosphatidylethanolamine* (DOPE), lipid kolesterol, dan kombinasi antara keduanya ditujukan untuk meningkatkan efektivitas penghantaran materi genetik ke dalam nukleus dengan tingkat sitotoksitas rendah.

Karakterisasi liposom dilakukan untuk mengetahui pengaruh formulasi liposom terhadap kemampuan liposom dalam menghantarkan materi genetik. Karakterisasi fisikokimia liposom antara lain uji mobilitas untuk mengetahui kemampuan liposom mengompleks DNA, uji stabilitas untuk mengetahui kemampuan liposom melindungi DNA dari degradasi

enzim DNase, dan uji kondensasi untuk mengetahui efektivitas liposom dalam mengondensasi DNA. Karakterisasi biologi liposom berupa transfeksi *in vitro* dan uji sitotoksitas liposom pada sel mamalia *Human Embryonic Kidney* (HEK-293T). Agen transfeksi komersial polietilenimin (PEI25K) digunakan sebagai kontrol dalam berbagai uji karakterisasi liposom.

Proses transfeksi *in vitro* meliputi penyisipan materi genetik berupa plasmid pCSII-EF-AcGFP yang mengandung *insert* gen *Green Fluorescent Protein* (GFP), plasmid pcDNA 3.1 C-His Spike Full mengandung *insert* gen protein *spike* virus SARS-CoV-2, atau plasmid pcDNA 3.1 C-His Spike RBD mengandung *insert* gen protein *Receptor Binding Domain* (RBD) virus SARS-CoV-2 ke dalam sel mamalia *Human Embryonic Kidney* (HEK-293T). Pada transfeksi pendahuluan, plasmid yang digunakan adalah plasmid pCSII-EF-AcGFP karena deteksi ekspresi GFP yang mudah dan dapat diamati secara langsung, sedangkan pada transfeksi dengan plasmid pcDNA 3.1 C-His Spike Full dan plasmid pcDNA 3.1 C-His Spike RBD membutuhkan uji *indirect Immunofluorescence Assay* (iIFA) untuk deteksi ekspresi protein *spike* dan RBD secara tidak langsung. Uji iIFA dilakukan terhadap sel HEK-293T untuk deteksi antigen spesifik oleh antibodi primer dan sekunder. Antigen yang dideteksi oleh antibodi primer berupa protein *spike* oleh plasmid pcDNA 3.1 C-His Spike Full dan *Receptor Binding Domain* oleh plasmid pcDNA 3.1 C-His Spike RBD. Antibodi sekunder dengan pewarna fluoresens kemudian ditambahkan sehingga menghasilkan pendaran cahaya yang dapat diamati pada sel uji mamalia di bawah mikroskop fluoresensi. Uji

sitotoksitas ditujukan untuk mengetahui tingkat sitotoksitas liposom terhadap sel HEK-293T melalui penambahan senyawa 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) dan pengamatan terbentuknya kristal formazan sebagai indikator viabilitas sel (Tarwadi *et al.*, 2008; Siregar & Hadijono, 2000; Jaswir *et al.*, 2011).

1.2. Rumusan Masalah

- 1.2.1. Bagaimana kemampuan liposom berbasis lipopeptida kationik asam linoleat yang diformulasikan dengan fosfolipid *dioleylphosphatidylethanolamine* (DOPE), lipid kolesterol, dan kombinasi antara keduanya dalam pembentukan kompleks dan perlindungan materi genetik dari degradasi enzim DNase?
- 1.2.2. Bagaimana efektivitas liposom berbasis lipopeptida kationik asam linoleat yang diformulasikan dengan fosfolipid *dioleylphosphatidylethanolamine* (DOPE), lipid kolesterol, dan kombinasi antara keduanya sebagai agen transfeksi materi genetik pada sel mamalia *Human Embryonic Kidney* (HEK-293T)?
- 1.2.3. Berapa tingkat sitotoksitas liposom berbasis lipopeptida kationik asam linoleat yang diformulasikan dengan fosfolipid *dioleylphosphatidylethanolamine* (DOPE), lipid kolesterol, dan kombinasi antara keduanya terhadap sel mamalia *Human Embryonic Kidney* (HEK-293T)?

1.3. Tujuan

- 1.4.1. Mengetahui kemampuan liposom berbasis lipopeptida kationik asam linoleat yang diformulasikan dengan fosfolipid *dioleylphosphatidylethanolamine* (DOPE), lipid kolesterol, dan kombinasi antara keduanya dalam pembentukan kompleks dan perlindungan materi genetik dari degradasi enzim DNase.
- 1.4.2. Mengetahui efektivitas liposom berbasis lipopeptida kationik asam linoleat yang diformulasikan dengan fosfolipid *dioleylphosphatidylethanolamine* (DOPE), lipid kolesterol, dan kombinasi antara keduanya sebagai agen transfeksi materi genetik pada sel mamalia *Human Embryonic Kidney* (HEK-293T).
- 1.4.3. Mengetahui tingkat sitotoksitas liposom berbasis lipopeptida kationik asam linoleat yang diformulasikan dengan fosfolipid *dioleylphosphatidylethanolamine* (DOPE), lipid kolesterol, dan kombinasi antara keduanya terhadap sel mamalia *Human Embryonic Kidney* (HEK-293T).

1.4. Manfaat

Manfaat dari penelitian yakni dapat memberikan informasi dan data terkait kandidat agen transfeksi berupa liposom berbasis lipopeptida kationik asam linoleat yang diformulasikan dengan fosfolipid *dioleylphosphatidylethanolamine* (DOPE), lipid kolesterol, dan kombinasi antara keduanya.