

Preparasi, Karakterisasi, dan Evaluasi in vitro Agen Transfeksi Berbasis Liposom dari Polietilenimin (PEI-800) dan Kolesterol sebagai Penghantar Materi Genetik pada Galur Sel Human Embryonic Kidney (HEK-293T) = Preparation, Characterization, and in vitro Evaluation of Liposome-based Transfection Agent from Polyethylenimine (PEI-800) and Cholesterol as Gene Delivery Vehicle in Human Embryonic Kidney (HEK-293T) Cell Lines

Bismi Yasinta Maharani, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920528287&lokasi=lokal>

Abstrak

Agen pembawa materi genetik atau vektor berperan penting dalam mekanisme penghantaran gen. Vektor non-viral seperti liposom merupakan alternatif yang menjanjikan karena memiliki imunogenisitas yang lebih rendah daripada vektor viral. Namun, instabilitas dan rendahnya ekspresi gen merupakan tantangan utama dari penghantaran gen menggunakan vektor non-viral. Penggunaan polimer kationik polietilenimin (PEI) dengan berat molekul tinggi seperti PEI-25.000 efektif dalam menghasilkan ekspresi gen yang tinggi, tapi bersifat toksik terhadap sel. Maka dari itu Oleh karena itu, formulasi liposom berbasis PEI yang memiliki berat molekul rendah diperlukan untuk meningkatkan efektivitasnya sebagai agen transfeksi. Pada penelitian ini, digunakan PEI bercabang dengan berat molekul 800 Da (PEI-800) yang diformulasikan dengan kolesterol dan Tween menjadi liposom dengan PEI-800 dan PEI-25.000 sebagai kontrol pembanding. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan kompleks DNA-liposom berbasis PEI-800 dan kolesterol (1:0,5; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4) dalam mengkondensasi dan melindungi materi genetik dari degradasi enzim, efektivitas liposom sebagai agen transfeksi pada galur sel Human Embryonic Kidney (HEK-293T), dan toksisitas liposom terhadap galur sel HEK-293T. Liposom dipreparasikan dengan metode dispersi etanol dan kompleks DNA-liposom dikarakterisasi secara lebih lanjut untuk mengetahui mobilitas, stabilitasnya terhadap degradasi enzim, dan kemampuannya mengkondensasi DNA. Liposom juga dievaluasi secara in vitro dengan uji MTT untuk mengetahui tingkat sitotoksitasnya dan digunakan untuk transfeksi gen pengode Green Fluorescence Protein (GFP) pada galur sel HEK-293T untuk mengetahui efektivitas transfeksinya. Kompleks DNA-liposom dengan perbandingan 1:2 sampai 1:4 terhadap DNA mampu mengkondensasi DNA dan melindungi DNA dari degradasi enzim DNase secara sempurna sehingga tidak terbentuk pita DNA pada gel elektroforesis. Liposom yang diformulasikan tidak mampu mengekspresikan GFP dengan baik pada galur sel HEK-293T, tapi bersifat non-toksik, yaitu menunjukkan 70% viabilitas sel. Liposom berbasis polimer kationik PEI-800 yang diformulasikan dengan kandungan kolesterol yang tinggi (10 µmol) dan Tween lebih efektif dalam mengkondensasi DNA dibandingkan kontrol. Karakterisasi kompleks DNA-liposom perlu dilakukan lebih lanjut dengan menentukan ukuran partikel dan zeta potensial. Evaluasi secara in vitro kompleks DNA-liposom juga perlu dilakukan pada galur sel mamalia lain dan secara in vivo untuk mengetahui efektivitasnya.

.....Gene delivery vehicles or vectors play a very important role in the mechanism of delivery. Non-viral vectors such as liposomes are promising alternatives to viral vectors because they are less immunogenic. However, instability and low expression are the major challenges in gene delivery using non-viral vectors. The use of cationic polymer polyethyleneimine (PEI) with high molecular weight like PEI-25.000 is

effective in resulting high gene expression, but is toxic to the cells. Therefore, formulations of cationic polymer PEI with low molecular weight are needed to increase the efficiency. In this study, branched polyethyleneimine with molecular weight of 800 Da (PEI-800) that is formulated with cholesterol and Tween as cationic polymer based liposome, and PEI-800, PEI-2500 is used to as controls. This study aims to understand the ability of PEI-800 and cholesterol-based liposome complexes with DNA (1:0.5; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4) in condensing and protecting genetic materials from enzyme degradation, efficiency of liposomes as transfection agents in Human Embryonic Kidney (HEK-293T) cell lines, and the toxicity of liposomes to HEK-293T cell lines. Liposomes were prepared using ethanol dispersion method and DNA-liposomes complexes were further characterized for their mobility, stability against enzyme degradation, and the ability to condense DNA. Liposomes are also evaluated in vitro for the cytotoxicity using MTT assay and are used to transfect Green Fluorescent Protein (GFP) encoding gene to HEK-293T cell lines to know their transfection efficiency. DNA-liposomes complexes with 1:2 to 1:4 ratio were able to condense DNA and protect DNA against the degradation of DNase effectively. Although DNA-liposomes complexes resulted in low expression of GFP in HEK-293T cell lines, liposomes were non-toxic, showing 70% cell viability. Liposomes with higher cholesterol content (10 μ mol) and presence of Tween are more effective in condensing DNA than controls. Further characterization of DNA-liposome complexes', particle size and zeta potential for instance is needed. In vitro evaluation in other mammalian cell lines and in vivo evaluation are needed to further determine the efficiency of low molecular weight PEI based liposomes.