

Review Artikel: PENGGUNAAN FORMULASI NANOPARTIKEL KITOSAN SEBAGAI SISTEM PENGHANTARAN GEN NON VIRAL UNTUK TERAPI GEN

Lina Winarti

Bagian Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember

ABSTRACT

Gene therapy is a method to repair damaged or defective genes that responsible for the onset of certain diseases. Now, numerous prototypes of DNA can control the progress of the disease through induction or inhibition of genes, but the bad cellular uptake and the rapid in vivo degradation of DNA-based therapy require the use of delivery system that can facilitate the cellular internalization and keep its activity. Cationic polymers are commonly used as gene carrier because it is easy to form complexes and it has higher stability compared with lipoplexes. Cationic polymer chitosan is the most widely used in gene delivery system because of the low toxicity and biocompatible. Gene delivery system using viruses shows high transfection result but it has many disadvantages, such as oncogenic effects and immunogenicity. However, cationic polymers, such as chitosan have the potential for complexation of DNA that can be used as a non-viral vector for gene therapy. Chitosan provides a strong electrostatic interaction with negative charge of DNA to form nanoparticles and effectively protect from nuclease degradation. Those properties make chitosan become a good candidate from non viral gene delivery.

Keywords: Gene therapy, nanoparticle, chitosan, chitosan nanoparticle as gene delivery

Korespondensi (Correspondence): Lina Winarti. Bagian Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember. systemlinna_w@yahoo.com. Telp. 081358822880

Sejumlah prototipe DNA sekarang dapat mengendalikan perkembangan penyakit melalui induksi atau inhibisi gen, namun *cellular uptake* yang jelek dan degradasi yang cepat in vivo dari terapi berbasis DNA membutuhkan penggunaan sistem penghantaran yang dapat memfasilitasi internalisasi seluler dan mempertahankan aktivitasnya.¹ Sejak sistem penghantaran berbasis elemen virus memicu reaksi samping seperti respon imun dan mutagenesis, tren berikutnya yang akan dikembangkan adalah penggunaan sistem penghantaran nonviral.² Hingga taraf tertentu penghantaran non viral dapat memberikan perlindungan bagi asam nukleat dari degradasi ekstraseluler dan intraseluler selama perjalanan panjang menuju inti sel.³

Polimer kationik umum digunakan sebagai pembawa gen karena mudah membentuk kompleks dan stabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan lipoplexes.⁴ Kitosan suatu polimer kationik yang paling banyak digunakan dalam sistem penghantaran gen karena toksisitas rendah, dan biokompatibel. Kitosan telah dimanfaatkan sebagai pembawa untuk penghantaran obat antikanker, gen, dan vaksin.⁵

NANOPARTIKEL

Nanopartikel adalah partikel koloid yang berkisar pada ukuran diameter 1-10 nm, dan diformulasi menggunakan polimer biodegradabel di mana suatu agen terapeutik terperangkap, terserap, atau tergabungkan secara kimia.⁶ Nanopartikel dapat dibuat dari bahan biokompatibel dan biodegradable seperti polimer, baik berasal dari alam (misalnya gelatin dan albumin) atau sintetis (misalnya *polylactides* dan

polyalkylcyanoacrylates), atau dari lemak padat. Di dalam tubuh, obat yang diload ke dalam nanopartikel dilepaskan dari matriks melalui difusi, *swelling*, atau erosi.⁷

Manfaat penting dari teknologi nanopartikel sebagai pembawa obat adalah stabilitas yang tinggi, kapasitas pembawa yang tinggi (yakni banyak molekul obat dapat dimasukkan dalam partikel matrik); memungkinkan penggabungan dua substansi hidrofilik dan hidrofobik, dan memungkinkan berbagai rute administrasi, termasuk oral dan inhalasi. Sistem pembawa ini juga dapat dirancang untuk memungkinkan pelepasan obat berkelanjutan dari matrik.⁷

Partikulat sistem nanopartikel telah digunakan sebagai pendekatan fisik untuk mengubah dan meningkatkan sifat farmakokinetik dan farmakodinamik dari berbagai jenis molekul obat. Nanopartikel telah digunakan secara in vivo untuk melindungi entitas obat dalam sirkulasi sistemik, membatasi akses obat hanya ke tempat yang dipilih dan untuk memberikan obat yang dapat dikontrol secara berkelanjutan pada tempat aksi. Berbagai polimer telah digunakan dalam formulasi nanopartikel untuk penghantaran obat agar manfaat terapeutik meningkat dan meminimalkan efek samping.⁸

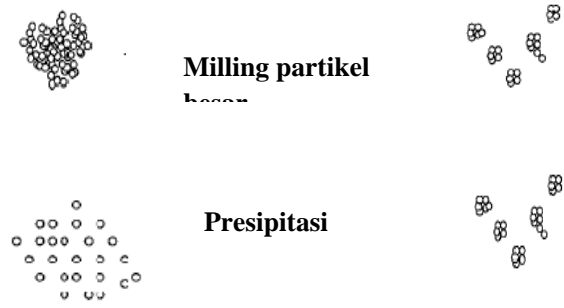
Keuntungan menggunakan nanopartikel untuk aplikasi pengiriman obat merupakan hasil dari tiga sifat dasar utamanya. Pertama, nanopartikel karena ukurannya yang kecil, dapat menembus melalui kapiler yang lebih kecil dapat memungkinkan efisien akumulasi obat di lokasi target.⁹ Kedua, penggunaan bahan biodegradabel untuk penyiapan nanopartikel dapat memungkinkan obat lepas berkelanjutan dalam tempat aksi selama periode hari atau bahkan minggu.¹⁰ Ketiga,

permukaan nanopartikel dapat dimodifikasi untuk mengubah biodistribusi obat atau dapat dikongjugasi dengan ligan untuk mencapai target penyaluran obat-spesifik.¹¹

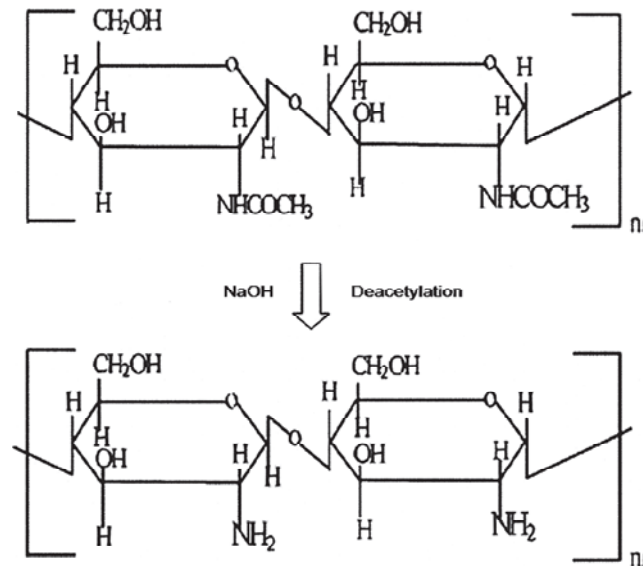
TEKNIK PEMBUATAN NANOPARTIKEL

Pendekatan umum untuk produksi nanopartikel terdiri atas 2 kategori yaitu teknik

bottom-up dan *top-down*. Teknik *bottom-up* berawal dari molekul dalam larutan yang kemudian mengalami asosiasi membentuk partikel padat. Sedangkan pada teknik *top-down* dari material kasar kemudian diaplikasikan gaya untuk mendisintegrasi ke dalam ukuran nano.¹²



Gambar 1. Teknik Produksi Nanopartikel¹³



Gambar 2. Struktur Kimia Kitin (a) dan Kitosan (b)

Metode yang paling sering digunakan untuk menyiapkan nanopartikel diantaranya adalah : (i) metode dispersi polimer, (ii) metode polimerisasi, dan (iii) metode koaservasi atau metode gelasi ionik. Namun demikian metode lain seperti *supercritical fluid technology* juga disebutkan dalam literatur untuk produksi nanopartikel.¹⁴

KITOSAN

Kitosan merupakan polimer alami karbohidrat termodifikasi yang dibuat melalui N-deasetilasi parsial chitin, suatu biopolimer alami berasal dari kulit kepiting, udang dan lobster. Kitosan juga ditemukan di beberapa mikroorganisme ragi dan jamur.¹⁵ Unit utama polimer chitin adalah 2-deoxy-2-(acetylamino) glukosa. Unit ini dikombinasikan dengan β -polimer (1,4) glikosidik membentuk rantai panjang linier.

Kitosan dibuat melalui deasetilasi kitin. Untuk mempersiapkan kitin, cangkang kepiting dan kerang udang didemineralisasi dalam larutan asam klorida (HCl), kemudian dideproteinasi dalam sodium hidroksida (NaOH), dan pemucatan dalam kalium permanganat (KMnO₄). Chitin tersebut kemudian dideasetilasi menjadi kitosan melalui perebusan dalam natrium hidroksida pekat. Kitosan terpurifikasi dibuat dengan mengulangi proses deasetilasi. *Pharmaceutical grade* deasetilasi kitosan adalah antara 90 dan 95% dan untuk *food grade* antara 75 hingga 80%.¹⁵

SIFAT FISIKA –KIMIA KITOSAN

Sifat kitosan berhubungan dengan polielektrolit dan karakter polimer karbohidrat. Kehadiran sejumlah gugus amino memungkinkan kitosan untuk bereaksi secara kimia dengan sistem anionik, yang menyebabkan perubahan karakteristik fisikokimia kombinasi tersebut. Hampir semua sifat fungsional dari kitosan bergantung pada panjang rantai, kepadatan muatan, dan distribusi muatan. Kitosan tersedia dalam variasi berat molekul dan derajat deasetilasi yang luas. Berat molekul dan derajat deasetilasi merupakan faktor utama yang mempengaruhi ukuran partikel, pembentukan partikel, dan agregasi.¹⁶ Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa bentuk garam, berat molekul, dan derajat deasetilasi serta pH kitosan mempengaruhi penggunaan polimer ini dalam farmasi.

Kitosan sedikit larut dalam air, praktis tidak larut dalam etanol (95%), pelarut organik lainnya, dan larutan netral atau alkali pada pH lebih dari 6,5. Setelah pelarutan, gugus amina polimer terprotonasi menghasilkan polisakarida bermuatan positif (RNH₃⁺) dan garam kitosan (klorida, glutamat, dan lain-lain) yang larut dalam air, kelarutan dipengaruhi oleh tingkat deasetilasi.¹⁷ Berbagai jenis viskositas secara komersial tersedia. Viskositas kitosan meningkat dengan

peningkatan konsentrasi kitosan, penurunan temperatur, dan peningkatan derajat deasetilasi.

KEGUNAAN & MEKANISME AKSI KITOSAN

Kitosan telah dimanfaatkan sebagai pembawa untuk penghantaran obat antikanker, gen, dan vaksin. Selain itu Kitosan telah digunakan dalam aplikasi farmasi seperti tablet salut film, sistem mikropartikel, kapsul, sistem gel, sistem *sustained release*, dan bioadesi.¹⁸ Kitosan adalah poliamine kationik dengan kepadatan muatan yang tinggi pada pH <6.5 dan berikatan dengan permukaan bermuatan negatif serta mengkelat ion logam.

Kitosan menunjukkan *swelling* yang bergantung pH dan memiliki sifat mengontrol pelepasan obat. Kepadatan muatan merupakan faktor penting dalam interaksi elektrostatik yang bergantung pada pH larutan. Mekanisme aksi kitosan untuk meningkatkan penyerapan obat merupakan kombinasi sifat mukoadesi dan kemampuan membuka sambungan ketat (*tight junction*) antara sel epitel yang berdekatan.¹⁹

KITOSAN SEBAGAI PEMBAWA DALAM PENGHANTARAN GEN

Terapi gen adalah teknik memperbaiki gen yang rusak atau cacat yang bertanggungjawab atas timbulnya penyakit tertentu.²⁰ Selama ini pendekatan terapi gen yang berkembang adalah menambahkan gen-gen normal ke dalam sel yang mengalami ketidakknormalan. Pendekatan lain adalah menghilangkan gen abnormal dengan melakukan rekombinasi homolog. Pendekatan ketiga adalah mereparasi gen abnormal dengan cara mutasi balik selektif sehingga akan mengembalikan fungsi gen tersebut. Selain pendekatan-pendekatan tersebut, ada pendekatan lain untuk terapi gen yaitu mengendalikan regulasi ekspresi gen abnormal.²¹

Dua jenis vektor yang digunakan dalam terapi gen adalah virus dan non-virus. Sistem penghantaran gen menggunakan virus menunjukkan hasil transfeksi tinggi tetapi memiliki banyak kelemahan, seperti efek onkogenik dan imunogenisitas. Namun polimer kationik, seperti kitosan memiliki potensi untuk kompleksasi DNA yang dapat dimanfaatkan sebagai vektor non-virus untuk aplikasi terapi gen.²²

Kitosan relatif rendah toksisitasnya dan memberikan interaksi elektrostatik yang kuat dengan muatan negatif DNA untuk membentuk nanopartikel.²³ Sifat ini yang menyebabkan kitosan menjadi calon yang baik untuk penghantaran gen nonviral.²⁴ Kitosan mengkondensasi DNA secara efektif dan melindungi dari degradasi nuklease. Hal ini memberi keuntungan sebagai polimer kationik nontoksik dengan imunogenisitas rendah.

Tabel 1. Sifat biologis dan kimiawi dari kitosan

Sifat Biologis	Sifat Kimiawi
1. Polimer alami, biokompatibel	1. Poliamin kationik dengan densitas muatan yang tinggi pada pH <6.5
2. Biodegradabel oleh unsur tubuh normal	2. Berat molekul tinggi
3. Aman dan non toksik	3. Polielektrolit linear
4. Melekat pada mukosa	4. Kondensasi asam nukleat
5. Hemostatik	5. Khelat beberapa logam transisional
6. Antimikrobal dan antiviral	6. Mudah dimodifikasi secara kimiawi
7. Antitumoral	7. Gugus amino/hidroksi reaktif
8. Mempunyai aktivitas immunoadjuvan	
9. Biaya terjangkau dan serbaguna	

Sumber : Hejazi dan Amiji²⁵

Diantara polimer larut air, kitosan merupakan salah satu yang paling banyak dipelajari. Hal ini dikarenakan kitosan memiliki beberapa sifat ideal sebagai polimer pembawa untuk nanopartikel, seperti biokompatibel, biodegradable, non toksik, dan murah. Selain itu memiliki muatan positif dan menimbulkan efek peningkatan absorpsi¹⁶. Sifat biologis dan kimia dari kitosan tercantum dalam tabel diatas.

Lima barrier utama yang perlu diatasi untuk keberhasilan penghantaran gen adalah (1) stabilitas *in vivo*, (2) *cell entry*, (3) *endosome escape*, (4) *intracellular trafficking*, dan (5) masuknya ke inti sel/nukleus. Polimer kationik seperti kitosan menunjukkan sebagai agen penghantar gen yang menjanjikan karena sifat polikationik memproduksi partikel yang mengurangi satu atau lebih barrier tersebut di atas. Sebagai contoh dengan memformulasi DNA menggunakan kitosan akan mengurangi muatan negatif dan meningkatkan muatan positif, ikatan pada permukaan sel dan endositosis akan ditingkatkan.²⁶ Pada banyak kasus polimer kationik menghasilkan kompleks yang lebih stabil sehingga memberikan proteksi selama *cellular trafficking*.²⁷

Efisiensi transfeksi pada kitosan lebih tinggi pada pH 6,9 daripada pH 7,6. Hal ini dapat dijelaskan bahwa pada pH dibawah 7 gugus amin pada kitosan terprotonasi sehingga memfasilitasi ikatan antara kompleks dan muatan negatif permukaan sel. Efisiensi transfeksi kitosan dengan berat molekul tinggi > 100kDa lebih kecil daripada berat molekul rendah 15 dan 25 kDa.¹⁶

Selain dapat digunakan sebagai sistem penghantaran gen non viral, nanopartikel kitosan juga dapat digunakan sebagai sistem penghantaran melalui oral, parenteral, okular, dan penghantaran vaksin. Untuk penghantaran mukosal kitosan memberikan efek peningkatan absorpsi melalui kemampuan membuka *tight junction* secara reversibel sehingga meningkatkan permeasi paraselular menembus jaringan mukosa.²⁸

KARAKTERISTIK FISIK NANOPARTIKEL KITOSAN-DNA

1. Ukuran Partikel & Distribusi Ukuran Partikel

Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel merupakan faktor kritis pada kinerja nanopartikel. *Batch* dengan variasi ukuran yang besar menunjukkan variasi pada bioavailabilitas, efikasi, dan pelepasan obat. Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel dapat ditentukan menggunakan teknik *light scattering* dan *scanning* atau *transmission electron microscopy*. Nanopartikel masuk ke dalam sel melalui endositosis, peningkatan ukuran partikel akan menurunkan *uptake* dan bioavailabilitas obat.²⁹

2. Zeta Potensial

Zeta potensial menunjukkan potensial listrik partikel dan dipengaruhi oleh komposisi partikel dan medium dimana partikel didispersikan. Zeta potensial merupakan parameter penting dalam berbagai bidang seperti farmasi dan pengolahan limbah dan dalam nanopartikel kitosan dapat digunakan untuk mengevaluasi stabilitas suspensi dan adesi partikel pada sistem biologi.³⁰

Nanopartikel dengan zeta potensial sekitar (+/-) 30 mV menunjukkan sebagai sifat suspensi yang stabil, karena muatan pada permukaan mencegah agregasi partikel. Muatan pada permukaan nanopartikel akan mempengaruhi distribusi dalam tubuh dan jumlah yang di *uptake* ke dalam sel. Karena sel bermuatan negatif terdapat afinitas elektrostatik bagi nanopartikel yang bermuatan positif, sehingga permukaan nanopartikel kationik atau netral dapat dimodifikasi untuk bermuatan positif untuk meningkatkan efikasinya.³¹

STABILITAS TERHADAP DNase I

Nuklease sangat mudah mendegradasi DNA yang tidak terproteksi. *Naked* DNA akan terfragmentasi dalam beberapa menit *in vivo* setelah injeksi. DNase I digunakan untuk mengevaluasi stabilitas nanopartikel-pDNA terhadap degradasi enzimatis. DNase I merupakan endonuklease yang dikode oleh gen manusia DNAase 1.

Deoksiribonuklease I (DNase I) adalah DNase yang pertama kali ditemukan dan merupakan endonuklease yang menghasilkan 5' fosforil dinukleotid dan 5' oligonukleotida fosforil yang terjadi dalam jaringan dan cairan tubuh yang berbeda.³² Wroblewski and Bodansky (1950) pertama kali melaporkan adanya DNase dalam serum darah. DNase I pankreas manusia memiliki sifat fisik dan karakteristik yang sama dengan enzim dalam serum.³³ DNase I merupakan nuklease yang tergantung pada Ca^{2+}/Mg^{2+} . Ion kalsium diperlukan untuk aktivitas DNase I, namun penggunaan EGTA atau buffer bebas kalsium dapat mereduksi aktivitas DNase.³⁴

Kondensasi DNA dengan polimer kationik dapat meningkatkan resistensi DNA terhadap degradasi enzimatis³⁵. Hal ini dikarenakan adanya hambatan sterik terhadap nuklease untuk masuk ke dalam nanopartikel dan berinteraksi dengan DNA.³⁴ Formulasi nanopartikel kitosan-pDNA yang dilakukan oleh Indrawati (2010) dan Mutmainah (2010) menggunakan kitosan rantai pendek dan rantai sedang pada pH 4 dan 5 menghasilkan DNA yang tetap stabil setelah inkubasi dengan DNase I yang ditandai tidak adanya migrasi DNA pada gel elektroforesis karena kompleks kitosan-pDNA tetap tinggal dalam well dan DNA tetap terlindungi dalam kompleks.^{37,38} Selain penelitian di atas telah banyak penelitian yang menyatakan kemampuan nanopartikel kitosan sebagai sistem penghantaran gen yang dapat memproteksi DNA dari degradasi enzimatis.

PENELITIAN PENGGUNAAN NANOPARTIKEL KITOSAN SEBAGAI PENGHANTAR GEN

Penelitian telah dilakukan untuk mengembangkan kitosan sebagai pembawa gen, diantaranya kompleks DNA/kitosan dilaporkan efektif mentransfeksi beberapa tipe sel diantaranya HEK293,⁵ sel karsinoma paru-paru manusia A549,^{38,39} sel melanoma B16,^{39,40} African green monkey kidney cell COS-1,^{24,41} sel HeLa,^{38,42} human osteosarcoma cell MG63,⁵ dan sel Caco-2.⁴¹ Beberapa

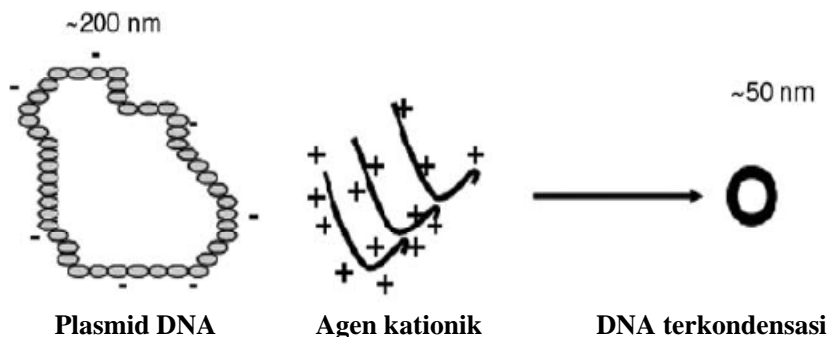
penelitian yang lain dilakukan untuk mengetahui pengaruh pH, serum, berat molekul, dan derajat deasetilasi pada transfeksi in vitro nanopartikel kitosan. MacLaughlin dkk (1998) menemukan bahwa kitosan dengan berat molekul lebih kecil dari 100 kDa membentuk kompleks dengan ukuran diantara 100 dan 200 nm. Berat molekul kitosan terbukti memberikan pengaruh pada ekspresi gen in vitro dan efisiensi transfeksi meningkat pada medium kultur pH 6,9.²⁴

Indrawati (2010) dan Mutmainah (2010) melakukan formulasi nanopartikel kitosan rantai pendek dan rantai sedang dengan *pEGFP* menggunakan metode kompleks koaservasi dengan hasil nanopartikel yang terbentuk sferis berukuran 200-700nm, stabil dalam DNase I dan serum, serta relatif rendah sitotoksitasnya terhadap sel SP-C1. Selain itu nanopartikel kitosan-*pEGFP* baik menggunakan kitosan rantai pendek maupun sedang dapat mentransfeksi sel SP-C1.^{37,38}

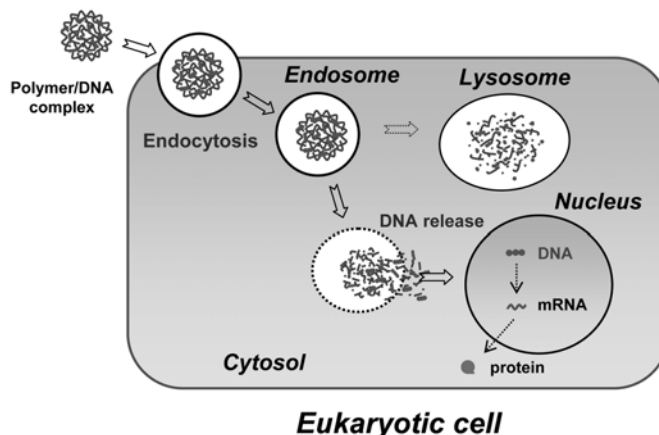
Winarti (2011) memformulasi nanopartikel kitosan rantai pendek yang tidak termodifikasi dan termodifikasi dengan TPP sebagai *crosslinker*. Dari penelitian tersebut nanopartikel tanpa TPP dan dengan TPP sebagai *crosslinker* dapat mentransfeksi sel kanker payudara T47D, stabil terhadap inkubasi DNase I hingga 1 jam inkubasi, stabil terhadap garam pH 7.0, serta tidak mempengaruhi viabilitas sel kanker payudara T47D yang diinkubasi dengan nanopartikel kitosan-pDNA. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa nanopartikel kitosan rantai pendek maupun sedang dapat digunakan sebagai penghantar DNA untuk terapi gen.⁴³

BIODISTRIBUSI & TRAFFICKING NANOPARTIKEL KITOSAN-DNA

Plasmid DNA ketika membentuk kompleks dengan sebuah polikation akan mengalami perubahan konformasi dari ukuran hidrodinamik 200-300nm menjadi partikel kurang dari 100nm. Dengan demikian, DNA terkondensasi hanya menempati 10^{-4} - 10^{-3} volume plasmid DNA.⁴⁴



Gambar 3. Proses kondensasi DNA dengan agen kationik



Gambar 4. Skema Proses Transfeksi Sel Eukariotik oleh Komplek Polimer-DNA

Plasmid DNA memiliki struktur kimia yang sangat terorganisir. Volume yang ditempati oleh sebuah koil acak DNA tergantung pada berat molekul serta ukurannya. Fleksibilitas DNA dicirikan oleh panjang dan jarak antara ujung-ujungnya. Investigasi mekanistik menyimpulkan bahwa polimer polikationik menyebabkan kondensasi DNA melalui beberapa cara seperti lokalisasi tekukan atau distorsi DNA dan penurunan muatan total pada pasangan DNA dengan menurunkan interaksi segmen-segmen DNA yang tidak menguntungkan.⁴⁵

Mekanisme transfer penghantar gen nonviral dalam kultur sel terutama melalui pinositosis difasilitasi oleh elektrostatis atau interaksi hidrofobik antara vektor gen dan permukaan sel. Tidak bisa disangkal banyak proses transfer gen oleh nanopartikel adalah karena bermuatan elektropositif dan terikat secara ionik pada permukaan elektronegatif sel yang terdiri dari proteoglikan atau sialil glikoprotein.⁴⁶

Setelah internalisasi ke dalam sel target, penting untuk mengeluarkan DNA dari endosome untuk menghindari transportasi ke lisosom yang merupakan tempat utama dari metabolisme DNA. Menghindari endosomal adalah salah satu hambatan yang paling sulit untuk sistem nanopartikel untuk penghantaran gen. Polimer dengan kandungan atom nitrogen amino dengan muatan proton yang tinggi mampu mengatasi pH endolisosom, melindungi DNA dari degradasi dan menyebabkan struktur endolisosom membengkak dan pecah. Hipotesis bahwa muatan positif berpengaruh pada *endosomal escape* didukung oleh data yang diperoleh dengan nanopartikel polistiren yang bermuatan negatif tidak mencapai sitosol tetapi tetap berada pada kompartemen endosom pada sel otot halus yang digunakan dalam penelitian.⁴⁷

Pelepasan dari endosom ke dalam sitoplasma sel disebabkan oleh muatan positif permukaan nanopartikel yang menghasilkan

penghantaran ke sitoplasma. Setelah pelepasan ke sitosol, DNA harus diinternalisasi dalam inti untuk ekspresi gen.⁴⁸ Polimer kationik tetap terikat pada plasmid setelah pelepasan endosomal dan mampu melindungi DNA dari degradasi nuklease intra seluler. Dengan asumsi bahwa DNA tetap stabil dalam sitoplasma, DNA harus masuk ke nukleus agar transkripsi terjadi serta melewati *barrier* dalam nukleus. Penghantaran DNA dari medium sitoplasma ke nukleus dibatasi oleh adanya selubung nukleus. Dalam sel eukariotik yang sedang membelah, transfer nukleositolasmik DNA dapat terjadi ketika selubung nukleus rusak selama mitosis. Sel dalam fase tidak membelah biasanya tahan terhadap transfer nukleositolasmik dari plasmid DNA.⁴⁹ Dalam sel yang tidak membelah, pertukaran molekul nukleositolasmik terjadi melalui *nuclear pore complexes* (NPC) yang menjangkau selubung nukleus.⁵⁰ Oleh karena itu, selubung nukleus bertindak sebagai saringan molekuler, memungkinkan molekul kecil air hingga diameter 9 nm (<17-kDa) untuk berdifusi bebas melalui NPC. Molekul yang lebih besar sampai 25 nm (> 41 kDa) seperti plasmid DNA dan fragmen DNA yang lebih besar mengalami proses transpor aktif melibatkan beberapa komponen seluler.^{50,51}

KESIMPULAN

Kitosan memberikan interaksi elektrostatis yang kuat dengan muatan negatif DNA untuk membentuk nanopartikel dan secara efektif melindungi dari degradasi nuklease serta membantu internalisasi seluler gen yang dibawa. Sifat ini yang menyebabkan kitosan menjadi calon yang baik untuk penghantaran gen nonviral.

DAFTAR PUSTAKA

1. Patil, S., D., Rhodes, D., G., Burgess, D., J., DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A

- Comprehensive Review, AAPS J. 2005, E61 - E77
2. Kay, M., A., Glorioso, J., C., Naldini, L., Viral Vectors for Gene Therapy: The Art of Turning Infectious Agents into Vehicles of Therapeutics, *Nat Med.*, 2001; 7: 33 - 40.
 3. Ouahabi, A., Thiry, M., Pector, V., Fuks, R., Ruysschaert, J., M., The Role of Endosome Destabilizing Activity in The Gene Transfer Process Mediated by Cationic Lipids, *FEBS lett.*, 1997; 8; 414(2):187-92.
 4. Audouy, S., Molema, G., de Leij, L., Hoekstra, D., Serum as a Modulator of Lipoplex-Mediated Gene Transfection: Dependence of Amphiphile, Cell Type and Complex Stability, *J. Gene Med.*, 2000, 2: 465 - 476 .
 5. Corsi, K., Chellat, F., Yahia, L., Fernandes, J., C., Mesenchymal Stem Cells, MG63 and HEK293 Transfection Using Chitosan-DNA Nanoparticles, *Biomaterials*, 2003, 24: 1255-1264.
 6. Sahoo, S., K., Labhasetwar, V., Nanotech Approaches to Drug Delivery and Imaging, *Drug Discov. Today*, 2003, 8:1112-1120.
 7. Bala, I., Hariharan, S., Kumar, M., N., PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of The Art, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2004, 21:387-422
 8. Mohanraj, V., J., Chen, Y., Nanoparticles – A Review, *Pharm. Research*, 2006, 5 (1): 561-573
 9. Sahoo, S., K., Ma, W., Labhasetwar, V., Efficacy of Transferrin-conjugated Paclitaxel-loaded Nanoparticles in a Murine Model of Prostate Cancer, *Int. J. Cancer*, 2004, 112: 335-340.
 10. Prabha, S., Labhasetwar, V., Nanoparticle-mediated Wild-type p53 Gene Delivery Results in Sustained Antiproliferative Activity in Breast Cancer Cells, *Mol. Pharm.*, 2004, 1:211-219.
 11. Moghimi, S., M., Hunter, A., C., Murray, J., C., Long-circulating and Target-specific Nanoparticles: Theory to Practice, *Pharmacol. Rev.*, 2001, 53: 283-318.
 12. The Royal Society, Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties, London: Royal Society, 4. 2004,
 13. Gupta, R., M., Nanoparticle Technology for Drug Delivery, Taylor & Francis, 2006.
 14. Reverchon, E., Adami, R., Nanomaterials and Supercritical Fluids, *The J. of Supercritical Fluids*, 2006, 37:1-22.
 15. Illum, L., Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharm. Res.*, 1998, 15: 1326-1331.
 16. Tiyafoonchai, W., Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery, *Naresuan University J.*, 2003, 11(3): 51-66
 17. Singla, A., K., Chawla, M., Chitosan: Some Pharmaceutical and Biological Aspects- an update, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001, 53:1047-67.
 18. Kumar, M., N., V., R., A Review of Chitin and Chitosan Applications, *React Funct. Polym.*, 2000, 46: 1-27.
 19. Artusson, P., T., Lindmark, S., S., Davis, Illum, L., Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2), *Pharm. Res.*, 1994, 11: 1358-1361
 20. Moelyoprawiro, S., Peran Biologi dalam Kesehatan, Disampaikan dalam Seminar Nasional dan Konggres Biologi XIII, Yogyakarta, UGM. 2005.
 21. Holmes, B., Gene therapy may switch off Huntington's, *NewScientist.com*. 2003,
 22. Sania, M., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., Fernandes, J., C., Chitosan-DNA Nanoparticles as Non-viral Vectors in Gene Therapy: Strategies to Improve Transfection Efficacy, *ScienceDirect, J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57:8, 1-8
 23. Fang, N., Chan, V., Mao, H., Q., Interactions of Phospholipid Bilayer with Chitosan: Effect of Molecular Weight and pH, *Biomacromol.*, 2001, 2:1161-8
 24. MacLaughlin, F., C., Mumper, R., J., Wang, J., Chitosan and Depolymerized Chitosan Oligomers as Condensing Carriers for In Vivo Plasmid Delivery, *J. Control. Release*, 1998, 56:259-72.
 25. Hejazi, R, Amiji, M., Chitosan-based Gastrointestinal Delivery Systems, *J. Cont. Release*, 2003, 89:151-65.

26. Mislick, K., A., Baldeschwieler, J., D., Evidence for The Role of Proteoglycans in Cation Mediated Gene Transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, 93: 12349-12354.
27. Hwang, S., J., Davis, M., E., Cationic Polymers for Gene Delivery: Design for Overcoming Barriers to Systemic Administration, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2001, 3: 183-191.
28. Borchard, G., Chitosans for Gene Delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 52:145 - 150
29. Redhead, H., M., Davis, S., S., Illum, L., Drug Delivery in Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles Surface Modified With Poloxamer 407 and Poloxamine 908: In Vitro Characterisation and In Vivo Evaluation, *J. Control. Release*, 2001, 70: 353-363.
30. Lee, Y., K., 2007, Chitosan and Its Derivatives for Gene Delivery, *Macromolecular Res.*, 15: 3, 195-201
31. Couvreur, P., Kante, B., Lenaerts, V., Scailteur, V., Roland, M., Speiser P., Tissue Distribution of Antitumor Drugs Associated with Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles, *J. Pharm. Sci.*, 1980, 69: 199-202.
32. Laskowski, M., Deoxyribonuclease I, In: Boyer, P., D., *The enzymes*, 3rd ed. Vol 4, Academic Press, New York, 1971, pp 289-311
33. Wroblewski, F., Bodansky, Presence of Deoxyribonuclease Activity in Human Serum, *Proc. R. Soc. Ex.p Biol. Med.*, 1950, 74:443-445
34. Martien, R., Loretz, B., Chitosan Thioglycolic Acid Conjugate:an Alternative Carrier for Oral Nonviral Gene Delivery?, *J. Biomed. Mater Res. A*, 2007, 82(1):1-9
35. Bielinska, A., U., Latallo, K., J., F., Baker, J., R., The Interaction of Plasmid DNA with Polyamidoamine Dendrimers: Mechanism of Complex Formation and Analysis of Alterations Induced in Nuclease Sensitivity and Transcriptional Activity of The Complexed DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, 1353:180-190
36. Indrawati, M., I., M., Formulasi Nanopartikel Menggunakan Chitosan Rantai Pendek dan Transfeksinya pada Sel Kanker SP-C1, Tesis, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2010.
37. Mutmainah, N., Formulasi Nanopartikel Menggunakan Chitosan Rantai Sedang dan Transfeksinya pada Sel Kanker SP-C1, Tesis, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2010.
38. Wan, L., Q., Hu, F., Q., Yuan, H., Study of the Uptake of Chitosan Oligosaccharide Nanoparticles by A549 Cells, *Pub. Med.*, 2004, 39:227.
39. Sato, T., T., Ishii, Okahata, Y., In Vitro Gene Delivery Mediated by Chitosan. Effect of pH, Serum, and Molecular Mass of Chitosan on The Transfection efficiency, *Biomaterials*, 2001, 22: 2075-2080.
40. Shikata, F., Tokumitsu, H., Ichikawa, H., Fukumori, Y., In Vitro Cellular Accumulation of Gadolinium Incorporated into Chitosan Nanoparticles Designed for Neutron-Capture Therapy of Cancer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2002, 53:57.
41. Thanou, M., Florea, B., I., Geldof, M., Junginger, H., E., Borchard, G., Quaternized Chitosan Oligomers as Novel Gene Delivery Vectors in Epithelial Cell Lines, *Biomaterials*, 2002, 23:153
42. Dastan, T., Turan, K., In Vitro Characterization and Delivery of Chitosan-DNA Microparticles into Mammalian Cells, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2004, 7:205
43. Winarti, L., Formulasi Nanopartikel Chitosan Rantai Pendek Dan Chitosan Rantai Pendek-TPP Sebagai Sistem Penghantaran Gen Non Viral Yang Ditransfeksi Pada Sel Kanker Payudara T47D, Tesis, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2011.
44. De Smedt, S., C., Demeester, J., Hennink, W., E., Cationic Polymer Based Gene Delivery Systems, *Pharm. Res.*, 2000, 17:113-126
45. Vijayanatham, V., Thomas, T., Thomas, T., J., DNA nanoparticles and Development of DNA delivery vehicles for genes therapy, *Biochemistry*, 2002, 41:14085-14094
46. Ogris, M., Steinlein, P., Kurs, M., Mechtler, K., Kircheis, R., Wagner, E., 1998, The Size of DNA/transferring-PEI Complexes is an Important Factor for

- Gene Expression in Cultured Cells,
Gene Ther., 5:1425-1433
47. Panyam, J., Zhou, W., Z., Prabha, S.,
Rapid Endolysosomal Escape of Poly
(DL-lactide-co-glycolide)
Nanoparticles: Implications for Drug
and Gene Delivery, *Faseb. J.*, 2002,
16:1217-26
 48. Vacik, J., Dean, B., S., Zimmer, W., E.,
Dean, D., A., 1999, Cell-specific
nuclear import of plasmid DNA,
Gene Ther., 6:1006-1014.
 49. Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S.,
Cotten, M., Saltik, M., Wagner, E.,
Cell Cycle Dependence of Gene
Transfer by Lipoplex, Polyplex and
Recombinant Adenovirus, *Gene
Ther.*, 2000, 7:401-407
 50. Ludtke, J., J., Zhang, G., Sebestyen,
M., G., Wolff, J., A., A Nuclear
Localization Signal Can Enhance
Both the Nuclear Transport and
Expression of 1 kb DNA, *J. Cell Sci.*,
1999, 112
 51. Ohno, M., Fornerod, M., Mattaj, I.W.,
Nucleocytoplasmic Transport: The
Last 200 Nanometers, *Cell*, 1998,
92:327-336