



SiRNA Berbasis Aptamer-PLEGP1800 Enkapsulasi *Chitosan* : *Literature Review* Penatalaksanaan *Triple Negative Breast Cancer*

SiRNA Based Aptamer-PLEGP1800 with Chitosan Encapsulation : Literature Review Management of Triple Negative Breast Cancer

Ni Putu Sri Indrani Remitha, Andreliano Yosua Rompis, Made Violin Weda Yani, I Gede Wikania Wira Wiguna, I Gusti Ayu Stiti Sadvika, I Gusti Made Anom Darma Putra

Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter, Universitas Udayana, Bali, Indonesia

sri_remitha@yahoo.com

DOI: <http://doi.org/10.29080/jhsp.v4i2.369>

Received: Mei 2020, Accepted: Mei 2020, Published: Agustus 2020

Kata Kunci

TNBC,
siRNA,
PLEGP,
Chitosan

Abstrak

Triple Negative Breast Cancer (TNBC) memiliki karakteristik yang berbeda dengan jenis kanker payudara pada umumnya karena bersifat agresif, resisten terhadap pengobatan, proliferasi yang tinggi, dan angka harapan hidup yang rendah. Pemanfaatan siRNA spesifik *silencing* gen mutan p53 dan VEGF sebagai penatalaksanaan TNBC merupakan metode yang menjanjikan. Penulisan *literature review* ini bertujuan untuk mengkaji mekanisme dan efek klinis siRNA-Aptamer-PLEGP1800-*Chitosan* sebagai terapi TNBC berbasis teknologi nano. Metode yang digunakan dalam penulisan *literature review* ini adalah kajian pustaka dengan data menggunakan *search engine* seperti *NCBI*, *Pubmed*, dan *Google Scholar* sehingga ditemukan 28 jurnal yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. SiRNA akan dikonjugasi dengan aptamer dan PLEGP1800. SiRNA-Aptamer-PLEGP1800 juga akan dienkapsulasi dengan *chitosan* untuk meningkatkan bioavailabilitas dan melindungi senyawa di dalamnya dari degradasi serum. Efek klinis beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Silencing* mut-p53 dan TNF secara bersamaan menyebabkan hilangnya viabilitas sel, serta Pemberian siRNA/PLEGP1800 *nanocomplex* menurunkan ekspresi gen VEGF. Hal tersebut menunjukkan bahwa siRNA-Aptamer-PLEGP1800-*Chitosan* memiliki prospek yang baik sebagai penatalaksanaan TNBC.

Keywords

TNBC,
siRNA,
PLEGP,
Chitosan

Abstract

Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) has different characteristics from other types of breast cancer because it is aggressive, resistant to treatment, high proliferation, and low life expectancy. The use of siRNA specific silencing of p53 mutant genes and VEGF as management of TNBC is a promising method. The writing of this literature review aims to examine the mechanism and clinical effects of siRNA-Aptamer-PLEGP1800-*Chitosan* as a TNBC-based nanotechnology therapy. The method used is a literature review in which the data using search engines such as *NCBI*, *Pubmed*, and *Google Scholar*, so that 28 journals are found that meet the inclusion and exclusion criteria. siRNA will be conjugated with aptamer and PLEGP1800. siRNA-Aptamer-PLEGP1800 will also be encapsulated with *chitosan* to enhance bioavailability and protect the compounds inside from serum degradation. Clinical effects of several studies have shown that *mut-p53 silencing* and TNF together cause loss of cell viability, and the administration of siRNA / PLEGP1800 nano complex decreases VEGF gene expression. This shows that siRNA-Aptamer-PLEGP1800-*Chitosan* has good prospects as TNBC management.

Pendahuluan

Kanker payudara adalah salah satu jenis keganasan yang umum terjadi pada wanita dan menempati peringkat kedua sebagai penyebab kematian di dunia. Berdasarkan data GLOBOCAN tahun 2018, prevalensi kanker payudara di Indonesia mencapai 16,7% (1). Sejalan dengan hal tersebut, WHO memprediksi pada tahun 2030 akan terjadi lonjakan penderita kanker payudara di Indonesia hingga tujuh kali lipat (2).

Triple Negative Breast Cancer (TNBC) adalah salah satu subtype kanker payudara yang memiliki persentase sekitar 15-20% dari keseluruhan kasus kanker payudara di setiap tahunnya (3). *Triple Negative Breast Cancer* terdiagnosis dengan fenotipe *triple negative* (ER-/PR-/HER2-) karena tidak mengekspresikan tiga reseptor umum, mulai dari *estrogene receptor* (ER), *progesterone receptor* (PR), hingga *hormone epidermal growth factor receptor 2* (HER2)/neu. *Triple Negative Breast Cancer* memiliki karakteristik yang sangat berbeda dengan jenis kanker payudara pada umumnya karena bersifat agresif, resisten terhadap berbagai pengobatan, tingkat proliferasi yang tinggi, dan angka harapan hidup pasien yang rendah (4). Kanker ini juga memiliki sifat penyebaran atau metastasis yang sangat cepat, *reccurency* yang tinggi, dan prognosis yang lebih buruk dibandingkan dengan kanker yang memiliki reseptor hormon positif (5). Bahkan, TNBC menjadi subtype kanker payudara yang paling sulit diobati sehingga jumlah kejadian TNBC adalah 170.000 kasus per tahunnya (6).

Pada umumnya, penderita kanker di negara maju akan datang ke pelayanan kesehatan ketika menginjak stadium awal, yaitu stadium I-II, sedangkan di negara Indonesia yang merupakan negara berkembang, penderita memeriksakan diri ketika berada di stadium lanjut, yakni stadium III-IV. Hal ini mendorong timbulnya kasus keterlambatan pemeriksaan dini TNBC yang notabene merupakan kanker yang agresif dan paling sulit diobati (7).

Hingga saat ini, pengobatan yang umum dilakukan untuk TNBC adalah pembedahan dan kemoterapi. *Mastectomy radical* merupakan tindakan pembedahan pada kanker payudara, termasuk TNBC, yaitu dengan cara mengangkat seluruh jaringan payudara (8). Namun, *mastectomy radical* menimbulkan banyak efek samping, seperti bentuk payudara yang berubah, terjadinya lymphedema atau pembengkakan, dan hematoma (terkumpulnya darah pada luka). Pengobatan TNBC lainnya adalah kemoterapi. Kemoterapi merupakan pengobatan dengan menggunakan obat-obatan kimia untuk membunuh sel kanker dengan cepat (9). Namun, kemoterapi memiliki efek samping, yaitu tidak hanya membunuh sel kanker, tetapi juga dapat merusak sel normal di dalam tubuh, menyebabkan rentan terhadap infeksi, rambut rontok, diare, mual, dan memperlemah kekebalan tubuh (8). Maka dari itu, terapi terhadap target yang lebih spesifik, minim efek samping dan toksisitas sangat diperlukan untuk meningkatkan kualitas hidup pasien TNBC. Salah satunya yaitu menggunakan siRNA-Aptamer-PLEGP1800.

Small interfering RNA (siRNA) memiliki keunggulan dalam terapi kanker karena bersifat lebih spesifik dalam *silencing* gen. siRNA akan dikonjugasi dengan aptamer dan PLEGP1800. Aptamer berfungsi untuk meningkatkan kestabilannya dan PLEGP1800 digunakan karena memiliki *sitotoksitas* yang rendah dan mampu meningkatkan ransfeksi dan konsentrasi yang lebih efisien. siRNA-Aptamer-PLEGP1800 juga akan dienkapsulasi dengan *chitosan* untuk melindungi senyawa di dalamnya dari degradasi serum, meningkatkan bioavailabilitas, dan meningkatkan penyerapan ke gen target. Terapi berbasis teknologi nano yang mengkombinasikan siRNA, aptamer, PLEGP1800, dan enkapsulasi *chitosan* merupakan modalitas yang menjanjikan dalam penatalaksanaan TNBC (10). Modalitas siRNA-Aptamer-PLEGP1800-*Chitosan* akan dirancang spesifik dalam men-*silence* gen mutan p53 dan VEGF yang berperan penting dalam patogenesis TNBC sehingga mampu meminimalisir efek samping, seperti efek dari pembedahan dan kemoterapi, dan meningkatkan kerja modalitas. Penulisan *literature review* ini bertujuan untuk mengkaji lebih dalam mengenai mekanisme dan efek klinis siRNA-Aptamer-PLEGP1800-*Chitosan* sebagai terapi TNBC berbasis teknologi nano.

Metode Penulisan

Metode yang digunakan dalam penulisan *literature review* ini adalah kajian pustaka di mana data yang digunakan berasal dari berbagai sumber dan literatur yang relevan, yaitu menggunakan *search engine* seperti *NCBI*, *Pubmed*, dan *Google Scholar*. Literatur yang didapatkan selanjutnya disaring berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan. Kriteria inklusi meliputi jurnal membahas poin-poin pada kata kunci (TNBC, siRNA, PLGP, *Chitosan*), baik jurnal *review* artikel dan penelitian, serta memiliki rentangan waktu jurnal maksimal sepuluh tahun terakhir. Kriteria eksklusi yaitu jurnal yang tidak memuat informasi pada kata kunci, jurnal *protocol only article*, serta memiliki rentangan waktu lebih dari sepuluh tahun terakhir, kecuali jika tidak ada penelitian terbaru yang relevan dengan referensi tersebut. Dari 28 jurnal yang ditelaah, diperoleh 18 jurnal yang sesuai untuk dijadikan referensi pada penulisan *literature review* ini. Data yang didapatkan berupa data kualitatif dan kuantitatif yang kemudian disusun secara sistematis dan sesuai dengan masing-masing topik bahasan sehingga didapatkan simpulan yang merepresentasikan keseluruhan isi *literature review*.

Hasil Penelitian

Gambaran Umum Patogenesis TNBC

Gen p53 dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) merupakan dua *marker* yang memiliki peran penting dalam patogenesis kanker payudara subtype TNBC. Gen p53 berkontribusi dalam menentukan siklus sel ketika DNA mengalami kerusakan dengan menahan sel untuk memasuki siklus berikutnya dan memberikan kesempatan pada DNA untuk melakukan *repair* (11). Mutasi pada p53 mengakibatkan progresi siklus sel tidak terkontrol dan memicu karsinogenesis (12). Gen mutan p53 mampu menurunkan sensitivitas terhadap kemoterapi dan radioterapi, mampu berinteraksi dengan *disabled homolog 2-interacting protein* (DAB2IP) dalam sitoplasma, mengaktifasi *nuclear factor kappa B subunit* (NF- κ B), dan menentukan pensinyalan yang menginduksi invasi. Jalur NF- κ B menghambat apoptosis dengan merangsang sintesis gen antiapoptotik, seperti *B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family* (12). VEGF berperan dalam progresivitas kanker melalui angiogenesis yang diregulasi oleh mekanisme hipoksia sehingga meningkatkan permeabilitas vaskuler pembuluh darah dan ekstrasvasi protein plasma (13).

Gambaran Umum siRNA-Aptamer-PLEGP1800-Chitosan

Terapi berbasis siRNA merupakan pendekatan antikanker baru yang menjanjikan (10). Terapi berbasis siRNA memiliki potensi besar untuk terapi kanker, termasuk TNBC. Terapi siRNA juga memiliki beberapa keunggulan berbeda dibandingkan obat-obatan farmasi tradisional. Terlebih, siRNA merupakan suatu mekanisme *post-transcription gen silencing* yang bekerja dengan memicu degradasi mRNA melalui penempelan *double-stranded RNA* (dsRNA) ke dalam sel target. siRNA mampu menghambat ekspresi gen yang terdapat pada sekuens spesifik melalui pemutusan mRNA yang memiliki sekuens pendek homolog (14). Nantinya, siRNA akan dirancang dwispesifik gen mutan p53 dan VEGF sehingga mampu bekerja dalam men-*silence* gen mutan p53 dan VEGF yang sangat berperan penting dalam patogenesis TNBC.

Metode terapi *gene silencing* dengan menggunakan siRNA merupakan metode yang memberikan beragam kelebihan. Namun, siRNA memiliki kelemahan, yaitu ketidakstabilan molekul siRNA ketika berada di dalam sel akibat adanya aktivitas enzim *nuclease* yang memecah struktur siRNA menjadi basa nukleotidanya, molekul yang bersifat hidrofilik sehingga mudah terdegradasi, dan molekul yang harus masuk ke dalam sel untuk melaksanakan fungsinya sehingga menyebabkan siRNA tidak dapat berfungsi secara optimal sebagai terapi berbasis *gene silencing* (15). Maka dari itu, untuk meningkatkan kestabilan siRNA dalam berikatan dengan target, siRNA akan dikongjugasi dengan Aptamer. Aptamer adalah urutan oligonukleotida pendek untai tunggal yang terdiri dari asam nukleat dengan afinitas tinggi sehingga efektif mengikat target spesifik yang diinginkan (16). Aptamer memiliki beragam keuntungan, yaitu murah dan mudah dalam proses produksi, memiliki kestabilan yang tinggi, indeks terapi yang luas, toksisitas dan imunogenik yang sangat rendah, serta berukuran kecil sehingga sangat mudah masuk ke dalam kompartemen biologis (17).

Di sisi lain, guna mengatasi kelemahan siRNA yang mudah terdegradasi, diperlukan suatu metode yang dapat meningkatkan konsentrasi dan transfeksi yang lebih efisien, serta memiliki sitotoksitas yang rendah. Poly[bis(Lys-PEI)Glut-PEG] Copolymer (PLEGP1800) merupakan jawaban dari kelemahan tersebut. PLEGP1800 disintesis dengan mengkonjugasi rantai PEIs LMW ke dalam poly[bis(ϵ -Lys) Glut-PEG] (18). PLEGP1800 akan melapisi siRNA sehingga membentuk struktur nanokompleks yang stabil, melindungi siRNA dari degradasi serum, dan meningkatkan kemampuan kondensasi siRNA dengan asam nukleat (19). Nanokompleks siRNA-Aptamer-PLEGP1800 akan terakumulasi dalam jaringan tumor melalui efek permeabilitas dan peningkatan retensi (EPR) (20,21). Nanokompleks siRNA-Aptamer-PLEGP1800 memasuki sel melalui endositosis dan melepaskan siRNA ke dalam sitoplasma melalui “efek spons proton” (20). Nantinya, modalitas ini akan diadministrasikan secara oral karena memberikan kenyamanan dan kemudahan pada pasien, tidak bersifat invasif, dan tidak memerlukan tenaga ahli (22). Oleh sebab itu, guna mencegah degradasi oleh pH asam lambung, siRNA-Aptamer-PLEGP1800 akan dienkapsulasi dengan nanopartikel *chitosan*.

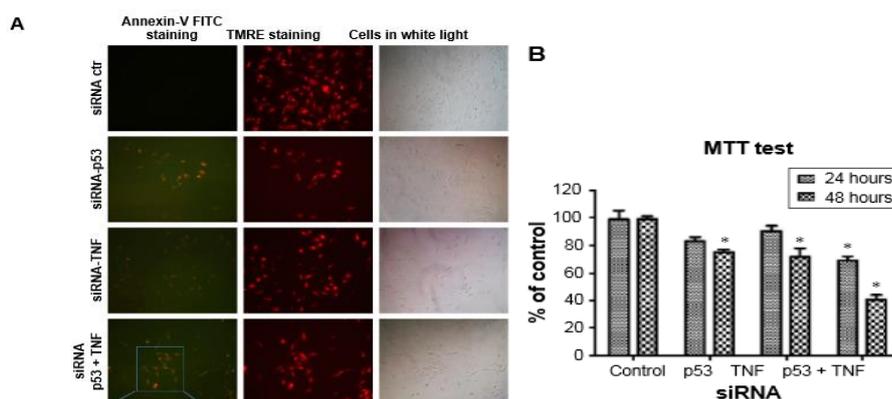
Chitosan merupakan biopolimer paling melimpah dan berasal dari kitin alami yang umumnya terdapat pada *exoskeleton arthropoda*, cangkang *crustacea*, serangga, dan dinding sel jamur (22). *Chitosan* bersifat nontoksitas, *mucoadhesion*, *biocompatible*, *biodegradable*, dan bioaktivitas yang tinggi. *Chitosan* memiliki kestabilan yang tinggi dan berukuran nano (10,250 nm) sehingga dapat meningkatkan efisiensi serta penyerapan obat ke sel target. *Chitosan* lebih ekonomis, murah, terdapat melimpah di alam dibandingkan formulasi *nanocarrier* lipid komersial saat ini, mampu mengurangi efek samping, tidak toksik, dan aman (21,22).

Modalitas siRNA-Aptamer-PLEGP1800-*Chitosan* akan diadministrasikan secara oral, diserap dalam usus besar, didistribusikan melalui sirkulasi darah hingga mencapai target *silencing*-nya, lalu diekskresikan melalui feses dan urin. *Chitosan* sangat tepat dijadikan sebagai enkapsulasi obat yang diadministrasikan secara oral karena mampu melindungi molekul di dalamnya dari pH asam lambung

yang kuat dan respons aliran darah, meningkatkan bioavailabilitas senyawa di dalamnya, serta mampu melekat pada jaringan mukosa untuk meningkatkan penyerapan obat (21,22).

Tabel 1. Hasil Penelitian siRNA-Aptamer- PLEGP1800-Chitosan

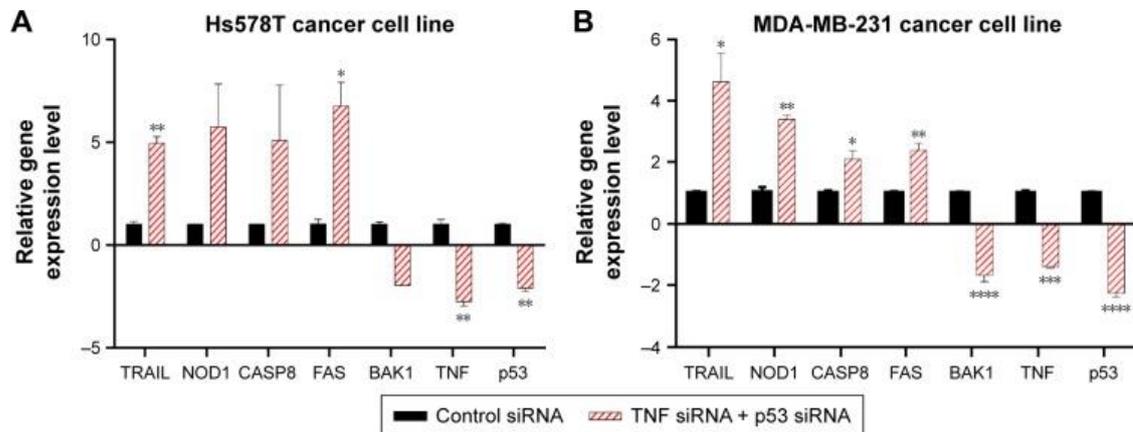
Peneliti (Tahun)	Jenis Penelitian	Temuan	Referensi
Pileczki, dkk (2016)	<i>In vitro</i>	<i>Silencing</i> mut-p53 dan TNF secara bersamaan menyebabkan hilangnya viabilitas sel (Gambar 1B), dimulai pada 24 jam setelah transfeksi yang diikuti oleh peningkatan substansial setelah 48 jam.	(23)
Zhao dkk (2019)	<i>In vitro</i>	Pemberian siRNA/PLEGP1800 <i>nanocomplex</i> menurunkan ekspresi gen VEGF dengan toksisitas sel yang masih dapat diterima dibandingkan kelompok dengan PLEGP10k. siRNA/PLEGP 1800 juga memiliki efek antiproliferatif pada sel kanker payudara MDA-MB-231.	(24)
Braicu dkk (2013)	<i>In vitro</i>	P53siRNA mengurangi <i>cell index</i> (CI) secara signifikan, menghambat pertumbuhan, dan meningkatkan apoptosis sel Hs578T TNBC ($p < 0,05$)	(18)
Berindan, dkk (2012)	<i>In vitro</i>	Terdapat efek kumulatif antiproliferatif dan peningkatan ekspresi gen <i>pro-apoptotic</i> dan penurunan ekspresi gen <i>antipro-apoptotic</i> dari kombinasi EGCG dan p53siRNA	(25)
Song dkk (2018)	<i>In vitro</i> dan <i>in vivo</i>	Pemberian kombinasi PEG=MT/PC sebagai penghantar kombinasi VEGF siRNA dan PIGF siRNA (SiV-P) memiliki aktivitas antitumor dan antiproliferatif pada sel kanker payudara 4T1 dan M2-TAMS. Secara <i>in vivo</i> , kombinasi tersebut menghambat pertumbuhan sel	(26)
Jafari dkk (2019)	<i>In vitro</i>	Kombinasi anti mucin1 aptamer (Apt) terkonjugasi nanopartikel chitosan IGF-1R siRNA menurunkan <i>cell viability</i> dari sel kanker payudara SKBR3 ($p < 0,0001$) dan menurunkan ekspresi gen VEGF	(27)
Yu dkk, 2019	<i>In vitro</i> dan <i>in vivo</i>	Pemberian AS1411 aptamer-liposom dikombinasikan dengan paclitaxel (PTX) dan siRNA meningkatkan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7 dan menurunkan angiogenesis pada sel tumor tikus BALB/c	(28)



Gambar 1. *Silencing* gen p53 dan TNF oleh siRNA dengan pewarnaan annexin-V and TMRE. Sel diwarnai dengan TMRE dan Annexin-V pada 24 jam setelah transfeksi dengan satu atau kedua siRNA untuk *silencing* p53 dan TNF (1A). Uji viabilitas sel dilakukan setelah 24 dan 48 jam dari *knockdown* gen tunggal atau ganda p53 dan TNF dan dibandingkan dengan kontrol (1B) (* $P \leq 0,05$) (23).

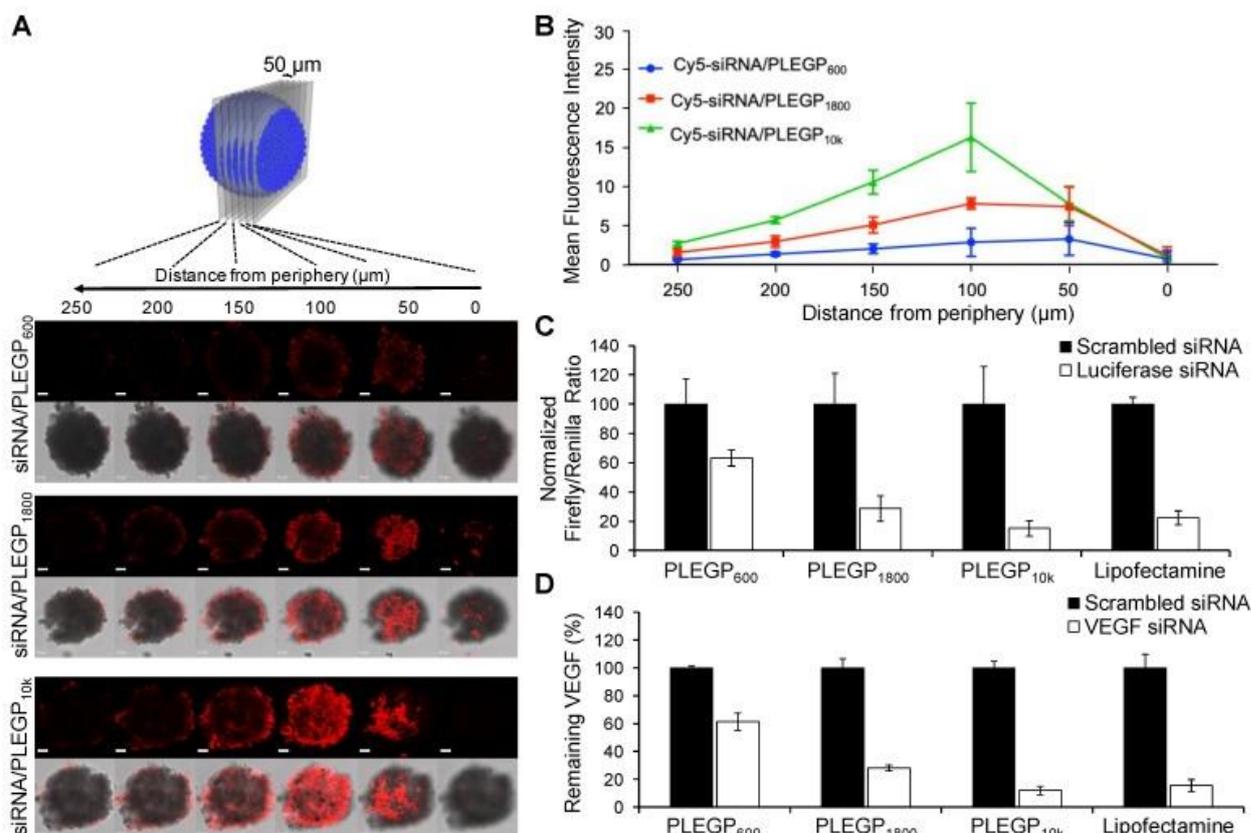
Berdasarkan penelitian Pileczki, dkk pada tahun 2016 diperoleh bahwa sebagian besar sel dapat hidup dan tidak mengalami apoptosis atau masih dalam tahap awal apoptosis (Gambar 1A). *Silencing* mut-p53 dan TNF secara simultan setelah 24 jam transfeksi dilakukan sebagai pembandingan untuk menentukan sel mengalami apoptosis awal berdasarkan pewarnaan sel TMRE dan Annexin V-FITC (Gambar 1A). Pileczki, mengukur viabilitas sel dengan uji MTT untuk menentukan apakah induksi apoptosis berkorelasi dengan penurunan jumlah sel. *Silencing* mut-p53 dan TNF secara bersamaan menyebabkan hilangnya

viabilitas sel (Gambar 1B), dimulai pada 24 jam setelah transfeksi yang diikuti oleh peningkatan substansial setelah 48 jam. *Silencing* gen mut-p53 memiliki efek yang sedikit lebih kuat pada viabilitas sel Hs578T dibandingkan dengan *silencing* oleh TNF siRNA (Gambar 1B) (23).



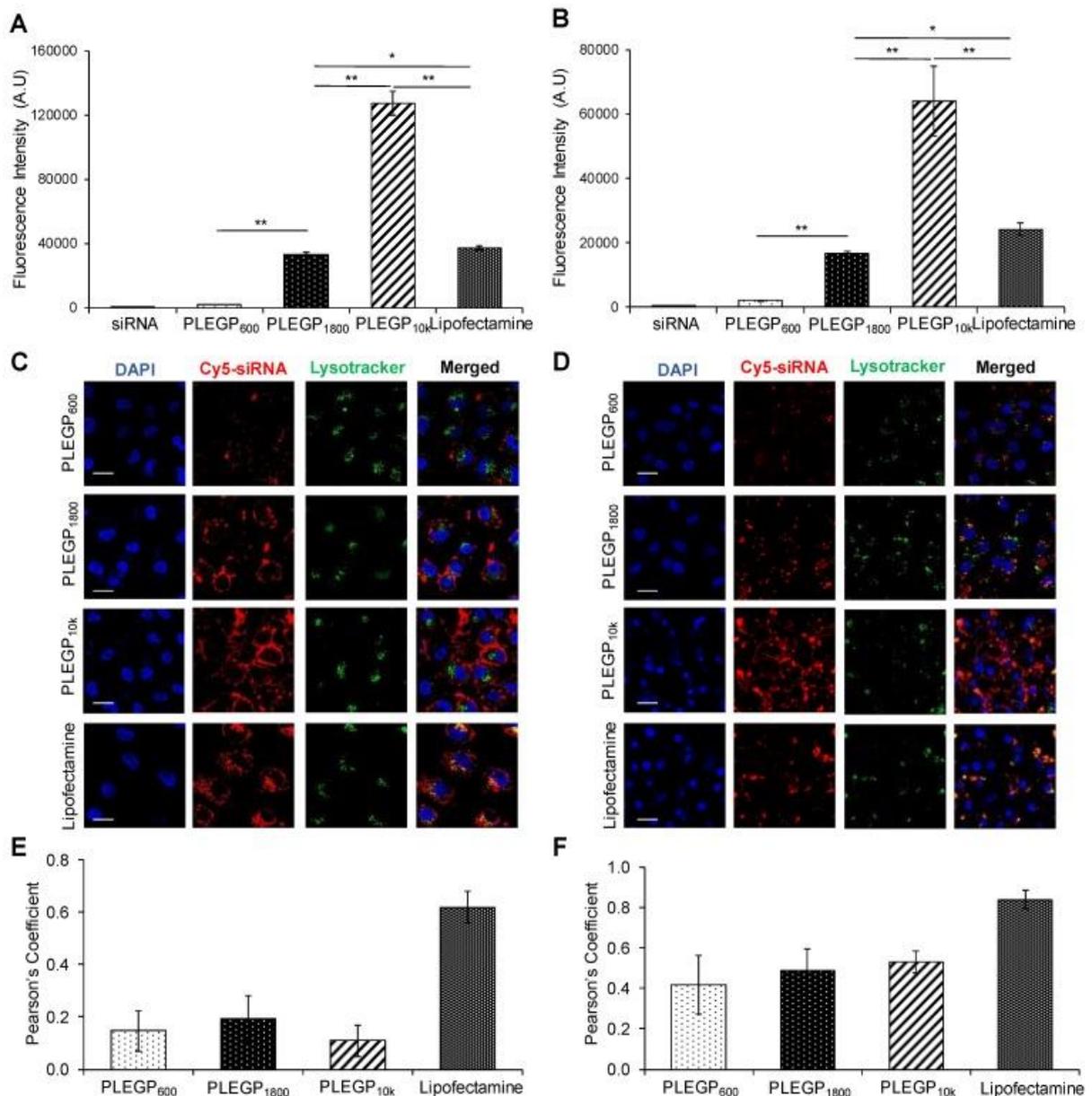
Gambar 2. Tingkat ekspresi gen mRNA pada dua sel TNBC, yaitu Hs578T (2A) dan MDA-MB-231 (2B) yang dievaluasi melalui uji TaqMan setelah *knockdown* siRNA mut-p53 dan gen TNF siRNA. Data ditampilkan sebagai rata-rata \pm SEM, nilai-P direpresentasikan sebagai * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$ (24).

Penelitian Pileczki, pada tahun 2016 menggunakan tujuh gen yang diidentifikasi mampu mengubah level ekspresi dalam *array* dan dievaluasi kembali dengan uji ekspresi gen TaqMan. Evaluasi ini berperan sebagai validasi teknis percobaan *array* RT-PCR (Gambar 2A). Selanjutnya, Pileczki, memvalidasi temuan pada sel TNBC yang kedua untuk melihat penghambatan siRNA mutR-p53 dan TNF pada TNBC. Tingkat ekspresi gen TaqMan dijadikan sebagai bahan evaluasi kadar mRNA dari gen yang dipilih sebelumnya. MDA-MB-231 dipilih sebagai model kedua karena menunjukkan mutasi p53 dan tingkat ekspresi TNF yang tinggi seperti pada sel Hs578T. Penelitian Pileczki, dkk memperoleh hasil bahwa di antara tujuh gen, empat menunjukkan peningkatan signifikan dalam ekspresi gen di kedua sel dan satu gen menunjukkan penurunan regulasi dan dua lainnya adalah p53 dan TNF (Gambar 2B) (24).



Gambar 3. Studi penetrasi dan aktivitas *silencing* dari nanokompleks siRNA/PLEGP pada sel HeLa dan MDA-MB-231 dalam model *spheroid* 3D.²⁴

Penetrasi tumor merupakan salah satu tantangan dalam pengembangan terapi kanker, khususnya terapi berbasis teknologi nano seperti siRNA. Penelitian Zhao, dkk pada tahun 2019 mengkaji mengenai kemampuan penetrasi nanokompleks siRNA/PLEGP dalam model *spheroid* 3D. Nanokompleks Cy5-siRNA/PLEGP10k menunjukkan intensitas fluoresensi tertinggi di pusat spheroids dan penetrasi terdalam setelah 6 jam inkubasi dengan spheroids MDA-MB-231 (Gambar 3A). Nanokompleks Cy5-siRNA/PLEGP600 menunjukkan kemampuan penetrasi yang terbatas dan intensitas fluoresensi yang jauh lebih lemah. Gambar 3A juga menjelaskan bahwa nanokompleks Cy5-siRNA/PLEGP1800 mampu menembus ke dalam inti *spheroid* dan intensitas fluoresensi dari nanokompleks Cy5-siRNA/PLEGP10k sekitar 63% (Gambar (Gambar 3B)). Efisiensi transfeksi dari nanokompleks siRNA/PLEGP pertama kali dievaluasi dalam sel HeLa karena memiliki efisiensi transfeksi yang tinggi dan telah banyak digunakan dalam studi transfeksi. Pertama, *renilla plasmid* dan *luciferase* ditransfusikan ke sel HeLa, kemudian diikuti dengan transfeksi sel dengan nanokompleks *luciferase* siRNA/PLEGP. Sejalan dengan itu, gambar 3C menunjukkan bahwa nanokompleks luciferase siRNA/PLEGP10k mampu *silence* ekspresi dari *luciferase* plasmid sebesar 85%, diikuti 71% untuk PLEGP1800, dan hanya 36% untuk PLEGP600. Di sisi lain, efisiensi *silencing* sebesar 77% pada sel HeLa ditunjukkan pada kontrol positif Lipofectamine 2000 (18).



Gambar 4. Serapan seluler dari nanokompleks siRNA / PLEGP dalam HeLa dan MDA-MB-231 sel menggunakan *flow cytometry* dan *confocal microscopy*. siRNA diberi label dengan Cy5 untuk analisis fluoresensi menggunakan *flow cytometry* (4A, 4B) dan *confocal microscopy* (4C, 4D). Intensitas fluoresensi sel HeLa (4A) dan sel MDA-MB-231 (4B) yang mengambil nanokompleks siRNA/PLEGP. Gambar *confocal* representatif dari sel HeLa (4C) dan MDA-MB-231 sel (4D) yang obati dengan nanokompleks siRNA. Bilah skala mewakili 20 μ m. Colokalisasi dari Cy5-siRNA dan *Lysotracker* dalam sel HeLa (4E) dan MDA-MB-231 sel (4F) dihitung secara kuantitatif menggunakan ImageJ. Data hasil disajikan sebagai rata-rata \pm SD (n = 3). (*P < 0,05; * P < 0,01) (18).

Penelitian Zhao, menunjukkan beberapa perbedaan dalam serapan seluler nanokompleks siRNA/PLEGP dalam sel HeLa dan MDA-MB-231 yang dianalisis menggunakan *flow cytometry* dan *confocal microscopy* (24). Berat molekul PEI dalam polimer sangat berkorelasi dengan serapan seluler dari nanokompleks siRNA/PLEGP. Penelitian Zhao, dkk memperoleh hasil bahwa serapan seluler PLEGP10k jauh lebih tinggi daripada *Lipofectamine* 2000 dalam sel HeLa dan MDA-MB-231. Sebaliknya, PLEGP600 diduga bukan merupakan kandidat yang baik untuk pengiriman siRNA karena PLEGP600 menunjukkan serapan terendah dalam sel terlepas dari keamanannya. Di sisi lain, *confocal microscopy* juga digunakan untuk menentukan distribusi intraseluler dari nanokompleks siRNA/PLEGP pada sel HeLa (Gambar 4C) dan MDA-MB-231 (Gambar 4D) sel. Hal ini menunjukkan hasil yang konsisten dengan data dari analisis *flow cytometry*. Nanokompleks siRNA / PLEGP10k menunjukkan serapan seluler tertinggi pada sel HeLa dan MDA-MB-231, sedangkan siRNA/PLEGP1800 menunjukkan serapan seluler yang sama dengan *Lipofectamine* 2000, dan nanokompleks (18).

Pembahasan

Penggunaan modalitas berbasis siRNA-Aptamer-PLEGP1800-chitosan memiliki efek yang menjanjikan sebagai modalitas terapi *triple negative human breast cancer* (TNBC). Hasil penelitian Zhao, dengan menggunakan VEGF siRNA yang dihantar oleh *biocompatible linear copolymer poly[bis(ϵ -Lys-PEI)Glut-PEG]* (PLEGP) untuk terapi TNBC secara *in vitro* menunjukkan bahwa kompleks siRNA/PLEGP1800 secara signifikan menghambat migrasi dan invasi sel TNBC. Hasil uji ELISA menunjukkan kelompok yang diberikan VEGF siRNA/PLEGP1800 menunjukkan adanya penurunan ekspresi gen VEGF sebesar 78%, walaupun pemberian atau kombinasi dengan PLEGP10k memperlihatkan hasil sebesar 88%. Kelemahan yang ditunjukkan oleh PLEGP10K adalah tingginya toksisitas sel yang dihasilkan sedangkan PLEGP1800 cenderung tidak menimbulkan toksisitas sel yang signifikan. Hasil uji proliferasi sel dan *HUVEC tube formation* menunjukkan bahwa VEGF siRNA/PLEGP1800 secara signifikan menghambat proliferasi *cell line* MDA-MB-231 dengan persentase 73,1% selama 48 jam dan 67% sebesar 72 jam (24).

Penelitian yang dilakukan oleh Braicu secara *in vitro* menunjukkan bahwa pemberian terapi p53siRNA memberikan dampak positif untuk terapi TNBC. Braicu, menggunakan *cell line* Hs578T dan p53siRNA yang telah dicampurkan dengan 5 ML siPORT NeoFX. Selanjutnya, dilakukan *scanning* dengan menggunakan *xCELLigence systems*, analisis apoptosis dengan menggunakan *flow cytometry* dan Hoechst 3334 *staining*, evaluasi protein melalui *immunoblotting* dan analisis gen-gen terkait dengan menggunakan *PCR array* (18). Hasil yang didapatkan dari *xCELLigence system* menunjukkan bahwa p53siRNA (50 Nm) pada Hs578T *Triple Negative Breast Cancer* bahwa p53siRNA memiliki efek penghambat dalam pertumbuhan sel Hs578T. Penggunaan CIM-plate16 juga menunjukkan adanya hambatan dari migrasi sel pada interval waktu 0 sama 30 jam setelah diberikan p53siRNA. Adapun hasil dari *flow cytometry* dan Hoechst 3342 *staining* menunjukkan apoptosis sel meningkat secara signifikan dengan pemberian terapi p53siRNA ($P < 0,05$). Adanya peningkatan aktivitas apoptosis kemudian dievaluasi lebih lanjut dengan *immunoblotting* yang menunjukkan bahwa p53siRNA menginduksi apoptosis dengan meregulasi protein p53. Hasil PCR menunjukkan adanya aktivitas apoptosis yang tinggi dan antiproliferasi dari pemberian p53siRNA ditekankan pada peran BCL-2 *pro-apoptotic* gen. Selain itu, terdapat dua gen lain, yaitu BAD dan BAK1 yang juga memiliki peranan penting. Adanya peningkatan ekspresi BAK1 dan BAD ternyata dapat meningkatkan sensitivitas agen kemoterapi dan memicu apoptosis lewat *intrinsic pathway* (18).

Penelitian yang dilakukan oleh Berindan-Nagoel, tahun 2012 secara *in vitro* menunjukkan bahwa kombinasi pemberian epigallocatechin-3-gallate (EGCG) dan p53siRNA menunjukkan adanya kumulatif efek antiproliferasi, aktivasi beberapa *pro-apoptotic* gen dan terhambatnya ekspresi *anti-apoptotic* protein dibandingkan dengan pemberian kedua agen tersebut tanpa dikombinasi. Hasil dari uji MTT assay menunjukkan pemberian kombinasi agen terapi siRNA dan EGCG memberikan efek antiproliferatif pada 72 jam lebih tinggi sesudah pemberian dibandingkan pemberian kedua agen tanpa kombinasi serta kelompok kontrol yang digunakan (siPORT neoFX). Adanya efek antiproferatif ini juga dikaitkan dengan kemampuan p53 dan EGCG dalam meningkatkan ekspresi gen *pro-apoptotic* seperti BAD, BAX, BCL2L1, BCL2L2, MCL1 dan NOL3. Selain itu, efek p53 siRNA dan EGCG diketahui juga menurunkan ekspresi gen anti *pro-apoptotic* seperti TNF family, TRAF dan CARD (25).

Selain target gen p53, target gen VEGF juga menjadi sasaran yang menjanjikan dalam pengobatan kanker, khususnya kanker payudara. Penelitian Song tahun 2018 yang menggunakan modalitas siRNA dengan target gen VEGF dan PIGF yang digabungkan dengan *polyethylene glycol* (PEG) dan *mannose modified trimethyl chitosan conjugate* (PEG=MT) serta *anionic poly-(allylamine hydrochloride)-citric anhydride* (PAH-Cit, PC) menunjukkan bahwa kombinasi PEG=MT/PC NPs menunjukkan pelepasan siRNA intraselular secara efektif sehingga berdampak pada penurunan ekspresi gen sel target yang efisien. Hasil dari penelitian secara *in vitro*, menunjukkan bahwa kombinasi nanopartikel PEG =MT/PC memiliki kemampuan untuk mencapai sel target dalam sel. Kombinasi nanopartikel tersebut dapat menurunkan ekspresi gen VEGF sebesar 63,65% dan 60,1% pada *cell line* 4T1 dan 16,0% dan 52,7% pada *macrophage plasticity induces M2 like tumor-associated macrophages* (M2-TAMs). Hasil uji MTT assay untuk melihat efek berkurangnya ekspresi gen PIGF dan VEGF didapati pemberian kombinasi nanopartikel PEG=MT/PC/siV-P paling efektif menghambat proliferasi dengan sel viabilitas sebesar 46,2% pada sel 4T1 (26).

Penelitian Song, juga melakukan penelitian secara *in vivo* dengan menggunakan tikus dengan kanker payudara (*in situ model*) yang diberikan perlakuan pemberian kombinasi nanopartikel setiap 4 hari dengan dosis 200 ug siRNA selama 30 hari. Adapun pemberian kombinasi nanopartikel VEGF siRNA dan PIGFsiRNA dapat menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan tumor sebesar 60,8% dan 69,5%, walaupun tidak sebesar jika kedua siRNA ini digabungkan. Selanjutnya, uji metastasis ke paru menunjukkan pemberian kombinasi nanopartikel siRNA VEGF dan siRNA PIGF menghambat metastasis jika dibandingkan dengan kelompok lain tanpa siRNA sedangkan kombinasi kedua siRNA (VEGF dan PIGF)

memberikan hasil yang lebih signifikan. Dari penelitian ini diketahui, pemberian terapi dengan mengkombinasi siRNA dengan PEG yang dienkapsulasi *chitosan* memiliki efek yang lebih baik dalam menekan pertumbuhan dan metastasis kanker payudara lewat penurunan ekspresi gen VEGF dan PIGF (26).

Selain penelitian-penelitian sebelumnya, beberapa lain penelitian yang mengkombinasi siRNA-Aptamer-PLEGP-*chitosan* juga memiliki hasil yang cukup signifikan untuk dijadikan dasar pengembangan kombinasi ini untuk terapi TNBC ke depannya. Penelitian Jafari tahun 2019 yang menggabungkan Docetaxel (DTX) dan IGF-1R siRNA ke dalam Anti-Mucin1 Aptamer (Apt) yang dikonjugasi dengan nanopartikel *chitosan* (NP) menunjukkan bahwa gabungan aptamer dan nanopartikel meningkatkan uptake selular dan menunjukkan adanya *augmented effect*. Hasil evaluasi MTT *bioassay* menunjukkan semua kelompok uji yang menggunakan aptamer yang digabungkan dengan nanopartikel *chitosan* menurunkan secara signifikan *cell viability* dari *cell line* SKBR3 (NP-Apt- DTX ($p < 0,0001$), NP-Apt-DTX ($p < 0,05$), dan NP-Apt-DTX-siRNA ($p < 0,0001$)) setelah 24 jam pemberian. Dari hasil uji ekspresi gen, didapati pemberian NP-Apt-siRNA secara signifikan ($p < 0,0001$) menurunkan ekspresi gen dari IGFR pada SKBR3 setelah 24 jam jika dibandingkan dengan kontrol grup setelah 24 jam pemberian. Pemberian kombinasi NP-siRNA, NP-DTX, NP-DTX-siRNA juga secara signifikan menurunkan ekspresi dari gen STAT3 pada sel SKBR3 setelah 24 jam ($p < 0,001$, $p < 0,001$, dan $p < 0,0001$). Selain itu, pemberian kombinasi NP-siRNA, NP-DTX, dan NP-DTX-siRNA juga menurunkan ekspresi gen VEGF pada SKBR3 pada 24 jam dan 48 jam sesudah pemberian ($p < 0,0001$). Adapun uji ekspresi gen MMP9, juga menunjukkan bahwa pemberian kombinasi baik NP-siRNA, NP-DTX, NP-DTX-siRNA secara signifikan menurunkan ekspresi gen MMP9 pada sel SKBR3 sesudah 24 jam jika dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0,001$, $p < 0,001$, dan $p < 0,0001$) (27).

Kombinasi aptamer, siRNA dan *lipid carrier*/liposom juga memiliki dampak positif yang dapat dijadikan potensi kedepannya. Penelitian yang dilakukan Yu tahun 2019 yang menguji pemberian agen kemoterapi paclitaxel (PTX) bersamaan dengan kombinasi aptamer AS1411-liposom dan PLK1siRNA pada sel kanker payudara MCF-7 menunjukkan terjadi peningkatan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan penurunan angiogenesis. Hasil uji ekspresi gen dengan RT-PCR, pemberian aptamer AS1411 liposom yang dikombinasikan dengan paclitaxel serta siRNA (AS1411/Lipo-PTX-siPLK1) dengan dosis siRNA (100 nmol), PTX (0,5 mg) menunjukkan terjadinya penurunan ekspresi mRNA PLK1 sebesar 79%. Hasil analisis western blot menunjukkan 48 jam setelah transfeksi didapati penurunan ekspresi protein PLK1 (28).

Selain itu, Yu juga melakukan penelitian secara *in vivo* dengan menginjeksi sel MCF-7 (3×10^6) pada tikus putih BALB/c sebagai model xenograft kanker payudara.. Tikus-tikus dengan ukuran tumor 100 mm³ kemudian dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok dengan liposom, paclitaxel, dan PLK1siRNA (Ctr/Lipo-PTX-siPLK1), kelompok aptamer AS1411/, liposom, paclitaxel, dan siRNA (AS1411/Lipo-PTX-siPLK1 serta kelompok dengan liposom saja sebagai kontrol. Setelah 21 hari pemberian atau terapi didapatkan kelompok dengan pemberian S1411/Lipo-PTX-siPLK1 menunjukkan efek antitumor yang lebih kuat dibandingkan dengan kelompok lainnya yang ditandai dengan ukuran tumor yang lebih kecil. Selain itu, hasil analisis imunohistokimia menunjukkan pemberian AS1411/Lipo-PTX-SiPLK1 menghambat angiogenesis. Penggunaan modalitas yang digunakan Yu dengan mengkombinasikan paclitaxel, aptamer AS1411, liposom dan PLK1 didasarkan oleh paclitaxel sebagai agen kemoterapi kanker payudara utama tapi memiliki kelemahan berupa sukar larut dalam air, resistensi pengobatan dan efek samping dosis berlebih. Adapun liposom dan aptamer digunakan untuk meningkatkan waktu paruh, dan afinitas terhadap sel target sedangkan PLK1siRNA digunakan karena PLK1 juga merupakan salah satu proto-onkogen yang diekspresikan secara berlebih pada kanker payudara (28).

Simpan dan Saran

Berdasarkan penjelasan tersebut, dapat disimpulkan bahwa *silencing* gen mutan p53 menggunakan modalitas siRNA-Aptamer-PLEGP1800-*Chitosan* dapat menekan proliferasi sel kanker yang tidak terkontrol dan menginduksi terjadinya apoptosis dengan meningkatkan pelepasan faktor pro-apoptosis. *Silencing* VEGF menggunakan modalitas siRNA mampu menghambat ekspresi faktor VEGF dan HIF- α sehingga mencegah angiogenesis melalui penurunan regulasi molekul yang terlibat dalam angiogenesis. siRNA-Aptamer-PLEGP1800 yang dienkapsulasi *chitosan* memiliki kelebihan berupa kestabilan yang tinggi dan berukuran nano (10,250 nm) sehingga dapat meningkatkan efisiensi serta penyerapan obat ke sel target. Dengan demikian, siRNA-Aptamer-PLEGP1800 merupakan modalitas terapi kuratif berbasis teknologi nano yang sangat menjanjikan. Oleh sebab itu, diperlukan penelitian yang lebih mendalam terkait pemilihan dosis, lama terapi, kombinasi yang tepat, dan efek samping lebih lanjut dari siRNA-Aptamer-PLEGP1800 dalam penatalaksanaan TNBC

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada setiap partisipan yang telah berperan dalam penyusunan review ini.

Daftar Pustaka

1. International Agency for Research on Cancer. Cancer Today (powered by GLOBOCAN 2018) [Internet]. 2018. Available from: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2018--2018>
2. Anders CK, Carey LA. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2013;9(suppl 2):S73–8.
3. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights Into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov*. 2019;9(2):176–98.
4. Kaplan HG, Malmgren JA, Atwood M. T1N0 Triple Negative Breast Cancer: Risk of Recurrence and Adjuvant Chemotherapy. *Breast J*. 2009;15(5):454–60.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):384–424.
6. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor HK.01.07/MENKES/414/2018 Tentang Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Kanker Payudara [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 30]. Available from: <http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PNPKPayudara.pdf>
7. Hadi N, Soltanipour S, Talei A. Impact of Modified Radical Mastectomy on Health-Related Quality of Life in Women With Early Stage Breast Cancer. *Arch Iran Med*. 2012;15(8):504–7.
8. Turner NC, Ro J, Andre F, Loi S, Verma S, H. I. Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373:209–19.
9. Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Harashima H. Gene Silencing via RNAi and siRNA Quantification in Tumor Tissue Using MEND, a Liposomal siRNA Delivery System. *Molecular Therapy*. 2013;21(6):1195–203.
10. Andreuzzi E, Colladel R, Pellicani R, Tarticchio G. The Angiostatic Molecule Multimerin 2 is Processed by MMP-9 to Allow Sprouting Angiogenesis. *Matrix Biol*. 2017;64:40–53.
11. Colladel R, Pellicani R, Andreuzzi E, Paulitti A, Todaro F, Colombatti A. MULTIMERIN2 Binds VEGF-A Primarily Via the Carbohydrate Chains Exerting an Angiostatic Function and Impairing Tumor Growth. *Oncotarget*. 2016;7(2):2022–37.
12. Di Minin G, A B, M DF, C G, S N, S B. Mutant p53 Reprograms TNF Signaling in Cancer Cells Through Interaction With The Tumor Suppressor DAB2IP. *Mol Cell*. 2014;56(5):617–29.
13. Malik A. RNA Therapeutic, Pendekatan Baru dalam Terapi Gen. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2005;2(2):51–61.
14. Wu X, Shaikh AB, Yu Y, Li Y, Ni S, Lu A, et al. Potential Diagnostic and Therapeutic Applications of Oligonucleotide Aptamers in Breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(9):1851.
15. Lakhin AV, Tarantul VZ, Gening LV. Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. *Acta naturae*. 2013;5(4):34–43.
16. Deb S, Patra HK, Lahiri P, Dasgupta AK, Chakrabarti K, Chaudhuri U. Multistability in Platelets and Their Response to Gold Nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med*. 2011;7(4):376–84.
17. Guo Q, Guo Q, Yuan J, Zeng J. Biosynthesis of gold nanoparticles using a kind of flavonol: Dihydromyricetin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014;441:127–132.
18. Braicu O, Pileczki V, Braicu C, Achimas-Cadariu P, Irimie A, Berindan-Neagoe I. p53 siRNA - a therapeutic tool with significant implication in the modulation of apoptosis and angiogenic pathways. *Clujul Med*. 2015;88(3):333–7.
19. Verma P, Thakur AS, Deshmukh K, Jha DAK, Verma S. Routes of Drug Administration. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 2010;1(1):54–9.
20. Liang Z, Gong T, Sun X, Tang J. Chitosan Oligomers as Drug Carriers for Renal Delivery of Zidovudine. *Carbohydr Polym*. 2012;87(3):2284–90.
21. Motiei M, Kashanian S, Lucia LA, Khazaei M. Intrinsic Parameters for The Synthesis and Tuned Properties of Amphiphilic Chitosan Drug Delivery Nanocarriers. *J Control Release*. 2017;260:213–25.
22. Hardy A, Seguin C, Brion A, Lavalle P, Schaaf P, Fournel S, et al. beta-Cyclodextrin-Functionalized Chitosan/Alginate Compact Polyelectrolyte Complexes (CoPECs) as Functional Biomaterials with Anti-Inflammatory Properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(35):29347–56.
23. Pileczki V, Pop L, Braicu C, Budisan L, Bolba Morar G, Monroig-Bosque C, et al. Double Gene siRNA

- Knockdown of Mutant p53 and TNF Induces Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Oncotargets and Therapy*. 2016;9:6921–33.
24. Zhao Z, Li Y, Shukla R, Liu H, Jain A, Barve A, et al. Development of a Biocompatible Copolymer Nanocomplex to Deliver VEGF siRNA for Triple Negative Breast Cancer. *Theranostics*. 2019;9(15):4508–24.
 25. Berindan-Neagoe I, Braicu C, Irimie A. Combining The Chemotherapeutic Effects of Epigallocatechin 3-Gallate With siRNA-Mediated p53 Knock-Down Results in Synergic Pro-Apoptotic Effects. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:6035–6047.
 26. Song Y, Tang C, Yin C. Combination Antitumor Immunotherapy With VEGF and PIGF siRNA Via Systemic Delivery of Multi-Functionalized Nanoparticles to Tumor-Associated Macrophages and Breast Cancer Cells. *Biomaterials*. 2018;185:117–132.
 27. Jafari R, Majidi Zolbanin N, Majidi J. Anti-Mucin1 Aptamer-Conjugated Chitosan Nanoparticles for Targeted Co-Delivery of Docetaxel and IGF-1R siRNA to SKBR3 Metastatic Breast Cancer Cells. *Iran Biomed J*. 2019;23(1):21–33.
 28. Yu S, Bi X, Yang L. Co-Delivery of Paclitaxel and PLK1-Targeted siRNA Using Aptamer-Functionalized Cationic Liposome for Synergistic Anti-Breast Cancer Effects In Vivo. *J Biomed Nanotechnol*. 2019;15(6).