

## **DESKRIPSI PEMBUATAN NANOPARTIKEL siRNA-PLK1 BERBASIS KITOSAN**

### **A. Latar Belakang Pentingnya Produk**

Kanker adalah salah satu penyakit dengan tingkat mortalitas yang tinggi saat ini (1). Beberapa terapi yang sering dilakukan dalam pengobatan penyakit kanker adalah kemoterapi, pembedahan dan radioterapi (1,2). Diantara ketiga metode tersebut kemoterapi merupakan salah satu cara yang sering dipilih karena dipercaya memberikan hasil yang lebih baik. Namun demikian metode ini memiliki sejumlah kelemahan diantaranya kurang selektif dalam memilih dan mengeliminasi sel kanker serta toksisitas yang tinggi pada sel dan jaringan yang sehat (1,2,3).

*Small interfering RNA* (siRNA) adalah satu bagian dari *RNA interference* (RNAi) (4,5). Prinsip dari mekanisme ini adalah memblok mRNA dari suatu gen sebelum ditranslasi dengan cara membentuk double strand RNA (dsRNA) yang akan memicu enzim nuklease mendegradasi mRNA (1,6,7). Melalui metode ini ekspresi dari gen-gen termutasi (abnormal) yang memicu perkembangan sel kanker akan diblok sehingga sel yang mengalami mutasi tidak berkembang menjadi kanker dan terinduksi untuk mengalami kematian (apoptosis) (3,5).

Berdasarkan mekanisme tersebut teknologi siRNA sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai salah satu pendekatan baru dalam terapi penyakit kanker yang tidak menimbulkan banyak efek samping (8,9). Namun demikian terapi kanker berbasis siRNA masih memiliki kekurangan diantaranya siRNA mudah didegradasi oleh enzim nuklease di dalam sel, hambatan dalam melewati membran sel, masa aktif siRNA yang pendek (6,10) dan efisiensi transfeksi yang rendah (11).

Kelemahan pada teknologi siRNA dapat diatasi dengan mengembangkan sistem penghantaran (*delivery system*) menggunakan polimer yang bersifat kationik seperti kitosan. Kitosan bermuatan negatif sehingga mudah membentuk kompleks dengan siRNA, bersifat tidak toksik, *mucoadhesion*, *biocompatible*, *biodegradable*, serta memiliki kestabilan yang tinggi. Kitosan berukuran nano sehingga dapat dikembangkan menjadi nanopartikel. Enkapsulasi siRNA dengan kitosan yang dikombinasi dengan *polyethyleneimine* membentuk nanopartikel akan

meningkatkan efisiensi transfeksi serta penyerapan siRNA ke sel target (11,12). Kitosan juga lebih ekonomis karena sumbernya tersedia melimpah di alam (2).

*Polo-like kinases 1*(PLK1) merupakan salah satu enzim kinase yang ditemukan secara luas pada sel eukariotik. PLK1 memiliki peranan yang sangat penting dalam mengontrol siklus dan pembelahan sel (13, 14). Beberapa penelitian melaporkan bahwa penghambatan ekspresi PLK1 dengan siRNA menyebabkan penghambatan proses proliferasi dan perkembangan sel kanker yang berakhir pada kematian sel (apoptosis) (14,15). Berdasarkan sejumlah hasil penelitian, PLK1 direkomendasikan sebagai salah satu gen target yang potensial dihambat dalam terapi penyakit kanker (16,17).

## **B. Urgensi Produk**

Penyakit kanker menjadi salah satu penyakit dengan kematian yang tinggi saat ini. Terapi penyakit kanker didominasi oleh pengobatan dan kemoterapi dengan tingkat keberhasilan yang cukup rendah. Selain itu kemoterapi memiliki sejumlah efek samping diantaranya kurang selektif dalam mengeliminasi sel kanker serta toksisitas yang tinggi pada sel dan jaringan sehat. Saat ini sangat dibutuhkan alternatif pengobatan penyakit kanker yang memiliki potensi keberhasilan yang tinggi serta aman dari efek samping. Penelitian ini diharapkan bisa berkontribusi dalam menyediakan alternatif pengobatan penyakit kanker berbasis teknologi nanopartikel siRNA-PLK1 yang aman dan efektif.

## **C. Kajian Ilmiah Produk**

RNAi adalah salah satu mekanisme alami yang terjadi pada makhluk hidup untuk menekan ekspresi dari suatu gen. Prinsip dari mekanisme ini adalah memblok mRNA dari suatu gen sebelum ditranslasi dengan cara membentuk *double strand mRNA* (17,18). Mekanisme ini banyak ditiru oleh ilmuwan untuk berbagai tujuan praktis diantaranya dalam pengobatan penyakit yang disebabkan karena kelainan genetik seperti kanker (11,9,19).

Salah satu bentuk dari RNAi adalah siRNA. Teknik siRNA dilakukan dengan cara memasukkan nukleotida pendek ke dalam sel dengan bentuk dsRNA dengan ukuran sekitar 21-23 pasangan basa (pb) yang komplemen dengan gen

target (3,4,5). Didalam sel potongan kecil dari dsRNA akan dipotong-potong oleh enzim *Dicer* menjadi dsRNA yang lebih pendek dengan ukuran 2-3 pb yang selanjutnya dipecah lagi menjadi untai tunggal yang terdiri atas untai sense dan antisense (1,6,7). Untai sense akan didegradasi oleh enzim endonuklease sementara antisense akan berikatan dengan mRNA gen yang menjadi target. Proses ini kemudian menginduksi sistem *post-transcriptional gene silencing* di dalam sel untuk mendegradasi mRNA gen target sehingga mRNA gen target tidak akan ditranslasi menjadi protein (1,20).

Pemahaman tentang mekanisme siRNA dalam menghambat ekspresi gen telah dikembangkan untuk tujuan praktis, diantaranya adalah untuk mengetahui peranan suatu gen atau protein dalam mekanisme seluler (5,20). Hartono *et al* (2019) melaporkan bahwa penghambatan ekspresi gen Nup58 pada sel kanker serviks (*Hela*) dengan menggunakan siRNA-Nup58 menyebabkan penghambatan proses mitosis dan berujung pada kematian sel (21). Penelitian yang lain juga melaporkan bahwa penghambatan ekspresi gen Nup62 dan TPR menggunakan metode siRNA berdampak pada penghambatan perkembangan dan kematian pada beberapa jenis sel kanker (22,23).

Terapi penyakit berbasis siRNA merupakan pendekatan anti kanker baru yang menjanjikan. Terapi siRNA memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan terapi kanker dengan menggunakan obat-obatan farmasi (8,9). Namun demikian, siRNA memiliki kelemahan yaitu ketidakstabilan molekul siRNA ketika berada di dalam sel akibat aktivitas enzim nuklease yang bisa memecah struktur siRNA menjadi basa nukleotidanya, hambatan dalam melewati membran sel, masa aktif siRNA yang pendek dan efisiensi transfeksi yang rendah (11,24).

Kitosan merupakan polisakarida alami yang bersifat kationik. Kitosan memiliki beberapa karakteristik diantaranya sangat efisien berikatan dengan siRNA membentuk kompleks dalam bentuk nanopartikel, bersifat tidak toksik, resisten terhadap nuklease, *mucoadhesion*, *biocompatible*, *biodegradable*, dan memiliki kestabilan yang tinggi. Perubahan sederhana dapat dilakukan pada struktur polikasarida yang akan berdampak pada perubahan sifat sehingga meningkatkan kemampuan penyerapan siRNA oleh sel. Beberapa penelitian melaporkan bahwa

modifikasi struktur pada kitosan dengan *Polyethylene glycol* (PEG) dapat meningkatkan kelarutan dan stabilitasnya dalam bentuk nanopartikel (2,11,12).

PLK1 merupakan salah satu jenis enzim kinase yang merupakan anggota dari kelompok enzim kinase *serine/threonine* yang ditemukan secara luas pada sel eukariotik. PLK1 memiliki peranan yang sangat penting dalam mengontrol siklus sel khususnya ketika sel melakukan replikasi DNA (Fase S) dan pada saat sel akan memasuki fase mitosis (*G2/M checkpoint*). Selama proses mitosis berlangsung, PLK1 berperan dalam meregulasi pembentukan spindel dan sentrosom, mengatur pemisahan kromosom selama metaphase dan terlibat dalam proses sitokenesis (13,14).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa penghambatan ekspresi gen pengkode enzim PLK1 dengan siRNA secara efektif menghambat proliferasi sel kanker dan menginduksi kematian sel (apoptosis). Kematian ini disebabkan karena adanya penghambatan atau penghentian pada proses pembelahan mitosis sel kanker. Akibatnya sel-sel kanker tidak bisa menyelesaikan proses pembelahan mitosisnya dan berakhir dengan apoptosis (14,15).

Terdapat hubungan antara overekspresi gen PLK1 dengan pembentukan sel kanker. Liu *et al* (2017) meneliti ekspresi gen PLK1 pada 19 tipe sel kanker yang berbeda. Mereka menemukan adanya fenomena overekspresi dari gen PLK1 pada 19 jenis kanker yang diteliti dibandingkan dengan sel normal (14). Pasien kanker dengan overekspresi gen PLK1 juga menunjukkan gejala yang lebih parah. Gen PLK1 juga dilaporkan mengalami overekspresi pada beberapa jenis kanker diantaranya kanker glioma (25), *colorectal cancers* (26), dan *breast cancer* (27). Berdasarkan sejumlah hasil penelitian yang telah dipublikasi sebelumnya, PLK1 direkomendasikan sebagai salah satu gen target yang potensial dihambat dalam terapi penyakit kanker (16,17).

## Prosedur Pembuatan Nanopartikel siRNA-PLK1 Berbasis Kitosan

### Bahan: Nanopartikel siRNA-PLK1 Berbasis Kitosan

1. Kitosan dari crustacea: MW 190-310 kDa, DD 75-85%
2. Isocyanate terminated methoxy-poly(ethylene)glycol (mPEGISC):  $M_n=1000$  g/mol
3. Dimethylformamide (DMF)
4. Hydrazine, anhydrous.
5. Phthalic anhydride
6. siRNAs
7. Sodium tripolyphosphate (TPP)
8. Poly(ethylene imine) (PEI), branched, 25 kDa
9. Sodium asetat dan asam asetat
10. Reagen transfeksi: INTERFERin®, Polyplus transfection™
11. Zetasizer ZS Malvern Instruments Ltd
12. Zeta potential cuvette, Malvern Instruments Ltd
13. Larutan 1% Sodium dodecyl sulfate (SDS) → 1 g SDS + 99 ml air
14. 0.2 M Sodium acetate, pH 4.5
15. Larutan 1 kitosan 1 mg/ml, pH 5.8
16. Larutan CPEG 1 mg/ml
17. Larutan PEI 1 mg/ml
18. Larutan TPP 1 mg/ml
19. Larutan SiRNA 50  $\mu$ M dalam RNase-free water

### Cara Kerja Pembuatan Nanopartikel siRNA-PLK1 Berbasis Kitosan

Larutan kitosan dibuat dengan melarutkan kitosan ke dalam *sodium acetate* untuk memperoleh larutan kitosan dengan konsentrasi akhir 1mg/ml. Larutan kitosan ini kemudian dicampur dengan *poly(ethylene)glycol* (Cpeg) dan *Poly(ethylene imine)* (PEI) yang dilakukan pada tabung eppendorf B (Larutan B). Secara terpisah dibuat larutan A dengan menambahkan larutan *sodium tripolyphosphate* (TPP) dan siRNA-PLK1 atau siRNA-kontrol. Larutan A kemudian ditambahkan ke larutan B kemudian dihomogenkan dengan menggunakan pipet dan vortex selama 30 detik. Larutan yang sudah tercampur selanjutnya disimpan selama 1 jam pada suhu ruang. Larutan nanopartikel ini kemudian disentrifugasi pada kecepatan  $17,860\times g$ , suhu  $25\text{ }^\circ\text{C}$  selama 30 menit kemudian volumenya dicukupkan menjadi 1 ml dengan menambahkan RNAase-free water steril.

## Bagan Pembuatan Nanopartikel siRNA-PLK1 Berbasis Kitosan

