

INTISARI

Latar belakang: Kasus *Triple Negative Breast Cancer* (TNBC) seringkali ditemukan dalam keadaan prognosis buruk karena sifatnya yang agresif dan memiliki karakteristik tidak mengekspresikan HER2, PR, dan ER. Tingkat kejadian TNBC mencapai 10-20%. Lini sel 4T1 adalah model lini sel kanker payudara TNBC yang diisolasi dari *Mus musculus*. *Gluthatione S-Transferase Mu 1* (GSTM1) merupakan salah satu gen yang mengalami overekspresi pada kasus TNBC. Kemoterapi paclitaxel masih menjadi opsi utama untuk kasus TNBC walaupun seringkali ditemukan masalah terkait sensitivitas dan resistensi. *Knockout* GSTM1 menginduksi penurunan *gluthatione* (GSH) yang menyebabkan penurunan fungsi detoksifikasi dan pertahanan seluler. Efek dari penurunan GSH dapat meningkatkan sitotoksitas paclitaxel sebagai bentuk respon kemoterapi lini sel 4T1.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek paclitaxel pada lini sel kanker payudara 4T1 dengan *knockout* GSTM1 menggunakan *single* maupun *double* gRNA.

Metode: Metode PCR digunakan untuk melihat secara visual ada tidaknya pita DNA GSTM1 pasca *knockout*, dilanjutkan dengan sekuensing dan analisis ICE untuk membuktikan insersi deleksi GSTM1 dan qRT-PCR untuk memeriksa ekspresi mRNA GSTM1. MTT Assay digunakan untuk uji viabilitas dan menentukan nilai IC₅₀ paclitaxel pada sel 4T1.

Hasil penelitian: Hasil pemeriksaan PCR menunjukkan pita DNA masih terdeteksi baik pada sel yang di KO menggunakan *single* maupun *double* gRNA dibuktikan dengan hasil panjang *base pair* DNA GSTM1. Hasil kuantifikasi sekuensing menunjukkan sel yang di KO menggunakan *single* gRNA menghasilkan persen indel dan *score knockout* lebih rendah dibandingkan sel yang di KO menggunakan *double* gRNA. Hasil ekspresi mRNA menunjukkan sel yang di KO menggunakan *double* gRNA secara signifikan menurunkan ekspresi mRNA GSTM1 di daerah ekson 2 namun tidak pada ekson 4 dibandingkan sel yang di KO menggunakan *single* gRNA. Efek *knockout* menggunakan *single* dan *double* gRNA tidak memengaruhi perbedaan nilai IC₅₀ paclitaxel ($P>0,05$).

Kesimpulan: Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa *knockout* menggunakan *single* dan *double* gRNA tidak menyebabkan deleksi pita DNA GSTM1. Penggunaan *double* gRNA dapat meningkatkan efisiensi CRISPR dalam menginduksi indel pada GSTM1. Penggunaan *double* gRNA signifikan menurunkan ekspresi mRNA GSTM1 di daerah ekson 2. Efek penggunaan *single* dan *double* gRNA tidak menghasilkan perbedaan signifikan terhadap nilai IC₅₀ paclitaxel.

Kata kunci: GSTM1, *guide* RNA, *Knockout*, Paclitaxel, sel 4T1.

ABSTRACT

Background: Cases of Triple Negative Breast Cancer (TNBC) are found oftenly in poor prognostic because aggressive and characterized by absence HER2, PR, and ER. Incidence rate of TNBC 10-20%. 4T1 cell line is a breast cancer model cell line isolated from *Mus musculus*. Gluthatione S-Transferase Mu 1 is one of gene that overexpressed in TNBC. Paclitaxel chemoteraphy still becomes primary option for TNBC, although sensitivity and resistance problems oftenly found. GSTM1 knockout induces deficiency of gluthatione (GSH) which leads to decreased detoxification and cellular defence. The deficiency GSH may increase the cytotoxicity of paclitaxel as a response chemoterpahy for 4T1 cell line.

Objective: This study aim to determine the effect of paclitaxel in 4T1 cell line with knockout GSTM1 using single or double gRNA.

Methods: The PCR method was used to visually see the presence or absence of GSTM1 band DNA after knockout, followed by Sanger sequencing to check insertion deletion GSTM1 and qRT-PCR to check in mRNA level. MTT Assay was used to test viability and to fix the IC₅₀ paclitaxel.

Results: The PCR result showed that DNA bands were still detectable in 4T1 cells which knocked out using single or double gRNA. The quantification of sequencing showed that the cells were treated using single gRNA resulted indel percentage and knockout score relatively lower than the cells were treated using double gRNA. The qRT-PCR result showed that the cells were treated using double gRNA significantly decrease mRNA expression in exon 2, but not in exon 4 than the cells were treated using single gRNA. The IC₅₀ of paclitaxel showed not significantly difference ($P>0,05$), both in cells were treated using single or double gRNA.

Conclusion: The conclusion of this study, knockout using single and double gRNA did not affect in deletion of GSTM1 bands. The usage of double gRNA may increase the efficiency of CRISPR to induce insertion deletion in GSTM1. The usage of double gRNA significantly decreased GSTM1 mRNA in exon 2. The usage of single or double gRNA did not affect signification of paclitaxel IC₅₀.

Keywords: GSTM1, guide RNA, Knockout, Paclitaxel, 4T1 cell line.