

## Combination of Cisplatin-Withaferin Based on PEGylated Liposome Nanoparticles as Alternative Therapy for Ovarian Cancer

Kombinasi Nanopartikel Cisplatin-Withaferin Berbasis *PEGylated Liposome* Sebagai Terapi Alternatif Kanker Ovarium

Made Violin Weda Yani\*, Ida Ayu Widya Anjani\*, Gede Setula Narayana\*, Desak Made Wihandani\*\*, I Gede Putu Supadmanaba\*\*

\* Faculty of Medicine Udayana University, Denpasar, Bali, Indonesia

\*\* Departemen of Biochemistry, Medical Faculty of Udayana University, Denpasar, Bali, Indonesia

E-mail: violinweda@student.unud.ac.id

Received: July 14, 2019

Accepted: February 25, 2020

### Abstract

Ovarian cancer is one of the major health problems in gynecology worldwide. Globocan 2012 data shows that ovarian cancer occurs in 239.000 cases, and is placed fourth as the most malignancy occurred in Indonesia. So far, cisplatin is the most effective therapeutic agent, but the high dosage of administration often caused side effects. A new alternative therapy to overcome the problems by using withaferin-A and nanoparticle PEGylated liposome. WFA has the potential effect to reduce cisplatin resistance but has low bioavailability thus, it needs to be encapsulated. This review's goal is to depict the potency of withaferin-A, cisplatin, and PEGylated liposome combination as a therapeutic agent to treat ovarian cancer. The combination of Cisplatin-Withaferin PEGylated Liposome is constructed by the modified thin lipid film hydration method then administered orally. This combination suppresses 70-80% of the ovarian cancer cell growth in vivo and inhibits NGFR from binding to TRKA, prevents cell migration as much as 50%. Nano-Cisferin-Liposome, inhibits migration of ovarian cancer cell significantly through  $\beta$ -catenin signaling through ALDH1 that disturb the spheroid formation, and increase apoptosis event as much 70-80% by increasing ROS production up to 2,5 times. Thus, Nano-Cisferin-Liposome (NCL) has potential as a therapeutic agent for treating ovarian cancer.

**Keywords:** Cisplatin; ovarian cancer; PEGylated Liposome; Withaferin A

### Abstrak

Kanker ovarium merupakan masalah kesehatan ginekologi wanita di dunia. Data *Global Burden Cancer* (Globocan) tahun 2012 menunjukkan kanker ovarium terjadi sebanyak 239.000 kasus, dan menempati urutan ke-empat di Indonesia. Hingga kini, Cisplatin merupakan agen terapi andalan untuk kanker ovarium namun sering menimbulkan efek samping dalam dosis tinggi. Terapi alternatif dapat menjadi solusi untuk mengatasi masalah tersebut dengan memanfaatkan withaferin A (WFA) serta nanopartikel *PEGylated liposome*. WFA sangat potensial untuk mengurangi resistensi Cisplatin, tetapi memiliki bioavailabilitas rendah sehingga perlu dienkapsulasi. Tujuan tinjauan ini yaitu untuk menggambarkan potensi kombinasi withaferin A, cisplatin, dan *PEGylated liposome* sebagai pengobatan untuk kanker ovarium. Tinjauan pustaka ini dilakukan dengan menggunakan kata: "kanker ovarium, Withaferin A, Cisplatin dan *PEGylated liposome*" sebagai kata kunci pada mesin pencarian. Kombinasi Cisplatin-

Review Article

Withaferin dan nanopartikel *PEGylated* Liposom dilakukan dengan metode *thin lipid film hydration* yang termodifikasi kemudian diberikan melalui jalur oral. Kombinasi Cisplatin-Withaferin ini dapat menekan pertumbuhan kanker ovarium sebesar 70-80% secara *in vivo*, menghambat NGFR berikatan dengan TRKA sehingga mencegah terjadinya migrasi sel sebesar 50%, menghambat migrasi sel kanker secara signifikan melalui jalur persinyalan  $\beta$ -catenin oleh ALDH1, meningkatkan apoptosis sebesar 70-80% melalui peningkatan produksi ROS hingga 2,5 kali lipat, serta mampu mengeliminasi CSC. Karena itu, kombinasi ini merupakan salah satu terapi potensial dalam penatalaksanaan kanker ovarium.

**Kata kunci:** Cisplatin; kanker ovarium; PEGylated liposome; Withaferin A.

### Pendahuluan

Kanker ovarium merupakan keganasan ginekologi yang termasuk dalam tujuh jenis kanker terbanyak diderita oleh wanita di dunia.<sup>1,2</sup> Menurut data Globocan 2012, insiden kanker ovarium dilaporkan sebanyak 239 ribu kasus dan menyebabkan kematian pada 152 ribu jiwa di dunia.<sup>3,4</sup> Berdasarkan data *Center for Disease Control and Prevention*, kanker ovarium memiliki tingkat *five year survival rate* terendah diantara kanker ginekologi di dunia yaitu sebesar 43%.<sup>5</sup> Kanker ovarium di Indonesia menempati urutan ke empat dengan angka kejadian sebesar 15 kasus per 100.000 wanita.<sup>6</sup>

Kanker ovarium yang terdiagnosis pada stadium awal memiliki tingkat keberhasilan penyembuhan sebesar 90% melalui terapi konvensional seperti bedah sitoreduktif dan kemoterapi.<sup>7</sup> Akan tetapi, 75% kasus kanker ovarium yang terdiagnosis pada stadium lanjut (III atau IV) menunjukkan angka *five year survival rate* di bawah 30%.<sup>8,9</sup> Hal ini disebabkan karena kanker ovarium jarang menunjukkan gejala spesifik dan tidak tersedianya *screening* seperti beberapa jenis kanker lainnya sehingga kanker ovarium baru terdiagnosis setelah mengalami proses invasi dan metastasis yang mengarah pada prognosis yang buruk.<sup>9,10</sup>

Salah satu agen kemoterapi andalan yang digunakan untuk kanker ovarium adalah cisplatin.<sup>11</sup> Sekitar 75% pasien kanker ovarium mengalami kemoresistensi terhadap cisplatin yang menyebabkan kekambuhan pasca pengobatan serta penyebab kematian hingga lebih dari 90%. Salah satu penyebab kemoresistensi adalah adanya *cancer stem cell* (CSC). Kondisi ini diperburuk dengan adanya interaksi CSC dan *tumor micro environment* yang banyak terdapat faktor transkripsi serta faktor pertumbuhan. Hal tersebut membantu CSC dalam proses pembaruan diri serta diferensiasi sel sehingga berkorelasi buruk dengan kemoterapi lini pertama.<sup>12</sup> Resistensi cisplatin juga terkait dengan jalur persinyalan AKT1 dan AKT2.

Aktivasi jalur signaling AKT2 akan menyebabkan sel kanker ovarium tidak mampu mengikat cisplatin sehingga *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) dan p-38 tidak akan teraktivasi

Review Article

yang berarti tidak ada yang menginduksi apoptosis.<sup>13,14</sup> Penggunaan cisplatin secara tunggal sebagai agen kemoterapi juga sering menimbulkan efek samping seperti mual muntah, hepatotoksisitas, dan neurotoksisitas. Untuk mengurangi efek samping dan resistensi dari cisplatin tersebut, diperlukan kombinasi terapi cisplatin dengan senyawa herbal.<sup>11</sup>

Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO), 70% populasi di dunia menggunakan obat herbal sebagai salah satu pengobatan alternatif selain pengobatan medis yang dijalaninya, untuk mempercepat proses kesembuhan.<sup>15</sup> Selain sifat penggunaannya yang turun temurun, penggunaan obat herbal dalam bidang pengobatan juga berperan dalam eksplorasi fungsi kekayaan alam serta mampu meningkatkan efek obat medis yang diinginkan tanpa menimbulkan efek samping yang berarti. Salah satu obat herbal dalam bidang pengobatan ini adalah Withaferin A.<sup>11</sup>

Withaferin A (WFA) merupakan senyawa bioaktif yang ditemukan pada tanaman *Withania somnifera* atau ginseng india.<sup>11</sup> Bibit ginseng india ini dapat dibeli dengan harga terjangkau dan cocok dibudidayakan di Indonesia.<sup>16,17</sup> Beberapa fungsi biologis dari WFA yaitu sebagai antimigrasi dan antiinvasi, serta induksi apoptosis melalui inaktivasi AKT serta penurunan ekspresi Bcl-2.<sup>18-20</sup> Withaferin pada sel kanker ovarium CaOV3 dan SKOV3 berperan dalam penurunan ekspresi Notch-3 dan Bcl-2 serta aktivasi caspase 3.<sup>21</sup> Menurut Fong *et al.* (2012), WFA secara sinergis menyebabkan penurunan 70-80% pertumbuhan sel kanker ovarium secara *in vivo*.<sup>22</sup>

Withaferin A juga berperan dalam menghambat metastasis sel kanker epitelial ovarium melalui penghambatan fosforilasi AKT.<sup>20</sup> Menurut Kakar *et al.* (2012), WFA dapat meningkatkan sensitivitas sel kanker ovarium A2780 terhadap cisplatin. Pemberian cisplatin secara tunggal pada sel CaOV3 menyebabkan peningkatan viabilitas sel menjadi 100% sedangkan kombinasi WFA dan cisplatin dapat menurunkan viabilitas sel menjadi 25%. Kombinasi WFA dan cisplatin juga mampu meningkatkan 70-80% kematian sel melalui peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS).<sup>11</sup>

Pengobatan kanker ovarium dengan kombinasi cisplatin dan WFA dapat bertindak sinergis untuk menginduksi kematian sel sehingga diperlukan dosis cisplatin yang lebih rendah untuk mencapai efek terapeutik yang sama.<sup>11</sup> WFA memiliki kelemahan yaitu *half life* yang rendah dan bersifat *lipid soluble* sehingga dapat terjadi penurunan konsentrasi obat di dalam darah.<sup>23</sup> Oleh sebab itu diperlukan penggunaan teknologi nanopartikel salah satunya *PEGylated Liposome* untuk mempermudah penghantaran WFA dan meningkatkan *half life* WFA dalam tubuh. Liposom yang normal akan mudah terdegradasi oleh *reticulo endothelial system* (RES),

## Review Article

sehingga perlu dikombinasi dengan *polyethylene glycol* (PEG).<sup>24</sup>

PEG memiliki keunggulan diantaranya dapat meningkatkan solubilitas modalitas, meningkatkan *half life* dan melindungi modalitas dari degradasi RES.<sup>25</sup> Meskipun PEG liposom sangat potensial, akan tetapi pada studi fase I menunjukkan masih terdapat efek samping pemberian liposomal cisplatin pada kanker ovarium, berupa *mild gastrointestinal toxicity* (mual dan muntah), anemia ringan hingga kelemahan otot.<sup>26</sup> Lebih lanjut, pemberian cisplatin tunggal yang memicu nefrotoksisitas juga terbukti berkaitan dengan regulasi protein Bcl-2 yang memicu resistensi. Demi mengatasi hal tersebut, WFA telah terbukti mampu menurunkan regulasi Bcl-2 sehingga dapat menjadi kombinasi potensial dalam mengobati kanker ovarium serta mengurangi nefrotoksisitas.<sup>11</sup>

Melihat potensi dari kombinasi WFA dan cisplatin serta pemanfaatan teknologi *PEGylated liposome*, perlu dibahas lebih lanjut modalitas yang diberi nama kombinasi Cisplastin-Withaferin Berbasis Nanopartikel *PEGylated* Liposom ini, sehingga dapat memberikan prospek yang lebih baik dalam tatalaksana kanker ovarium.

### Metode

Penulisan karya ilmiah ini menggunakan metode studi pustaka. Sumber literatur yang digunakan terdiri atas jurnal-jurnal relevan dari mesin pencari seperti scholar.google.com, www.pubmed.com, dan proquest.com. Kata kunci yang digunakan yaitu “Cisplatin, Ovarian Cancer, *PEGylated Liposome*, Withaferin A” Kriteria inklusi adalah semua sampel kanker ovarium dan referensi tidak boleh lebih dari 10 tahun terakhir, kecuali jika memang tidak terdapat penelitian baru yang menentang isi dari referensi tersebut. Dari 80 jurnal yang ditinjau, didapatkan 76 jurnal yang relevan untuk dijadikan referensi dalam literatur ini.

### Diskusi

#### **Peranan Komponen Bioaktif dari Kombinasi Cisplastin-Withaferin Berbasis Nanopartikel *Pegylated* Liposom Pada Kanker Ovarium**

Withaferin A (WFA) merupakan komponen bioaktif dari tumbuhan *Withania somnifera* yang memiliki efek luas pada kanker ovarium.<sup>11,22,27-31</sup> Dalam proses karsinogenesis kanker ovarium, *nerve growth factor* (NGF) yang merupakan molekul polipeptida kecil memiliki peran dalam proses proliferasi dan migrasi. Afinitas yang tinggi dimiliki oleh NGF terhadap reseptor *tyrosine kinase A* (TRKA) dan banyak terekspresikan pada kanker ovarium selain bentuk aktifnya berupa p-TRKA.<sup>32</sup>

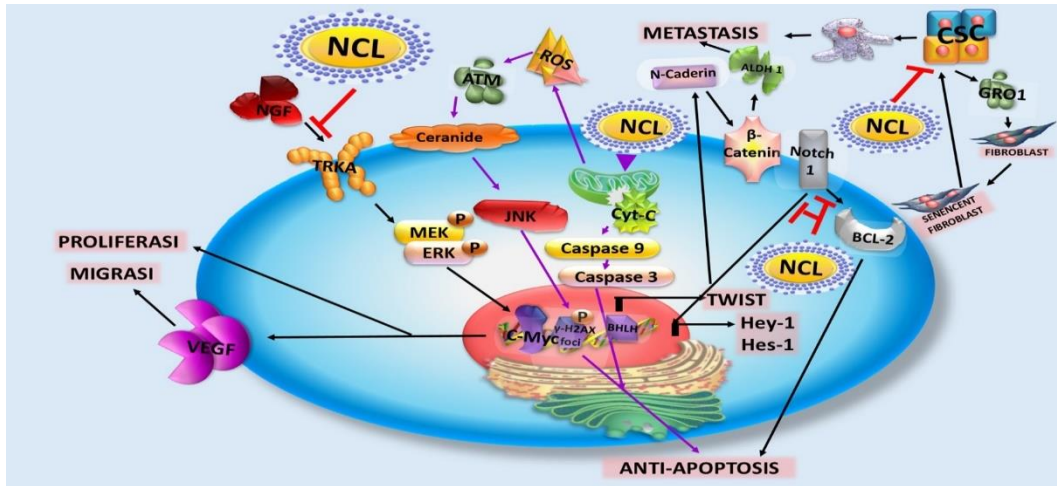
Review Article

NGFR mampu mengaktivasi TRKA menjadi p-TRKA yang menyebabkan *mitogen activated protein kinase* (MEK) dan *extracellular signaling-regulated kinase* (ERK) terfosforilasi, dan selanjutnya mentranslokasikan keduanya ke faktor transkripsi (C-Myc) sehingga terjadi proliferasi sel serta peningkatan ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang menyebabkan terjadinya migrasi sel. Pada proses ini, komponen bioaktif WFA akan menghambat NGFR berikatan dengan TRKA sehingga mencegah terjadinya migrasi sel.<sup>33</sup> WFA juga mampu menghambat proliferasi dengan mekanisme yang berbeda, mencegah metastasis, mencegah kekambuhan (*relaps*) dan kemoresisten dengan mengeliminasi *cancer stem cell* (CSC).<sup>29</sup> Penjelasan terkait kekambuhan pada kanker ovarium, erat kaitannya dengan pembawaan sifat resisten dan interaksi dengan *tumor microenvironment*.<sup>35-37</sup>

Metastasis diinisiasi oleh CSC yang berdiferensiasi menjadi *ovarian cancer stem cell* (ovarian CSC) dan memproduksi *Growth-regulated oncogene 1* (GRO-1) sehingga menginisiasi transformasi *fibroblast* menjadi *senescent fibroblast*. *Senescent fibroblast* memicu transformasi sel sehingga terjadi metastasis melalui pembentukan *epithelial-mesenchymal transition* (EMT).<sup>37</sup> Metastasis dapat juga terjadi melalui pembentukan *spheroid* yang diinisiasi oleh perubahan struktur sel dari epitelial menjadi mesenkimial. Proses tersebut diinisiasi oleh *basic helix-loop-helix* (BHLH) yang merupakan faktor transkripsi yang mengekspresikan Twist. Twist dapat meningkatkan ekspresi N-chaderin dan berikatan dengan  $\beta$ -Catenin yang berperan dalam proses regresi.  $\beta$ -Catenin secara langsung meningkatkan ekspresi *aldehyde dehydrogenase-1* (ALDH1), yang kemudian akan membentuk *spheroid*. Melalui penargetan CSC dan penghambatan ekspresi  $\beta$ -Catenin, WFA mampu mencegah metastasis pada sel kanker ovarium.<sup>38,39</sup>

Potensi WFA dalam proses apoptosis sel kanker ovarium dikaitkan dengan kemampuannya dalam peningkatan produksi ROS yang dihasilkan oleh aktivitas mitokondria. Akumulasi ROS akan menyebabkan kerusakan DNA dengan menghancurkan membran mitokondria yang kemudian menyebabkan aktivasi *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) sehingga meningkatkan sintesis *ceramide*.<sup>40</sup> *Ceramide* nantinya akan mengaktivasi jalur persinyalan *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) yang memfosforilasi *Hea-induced phosphorylated histone foci formation* ( $\gamma$ -H2AX foci) sehingga menyebabkan kerusakan DNA.<sup>11,41-43</sup> Selain jalur persinyalan JNK dan MAPK, ROS juga mampu menginduksi persinyalan caspase 3. Proses ini melalui protein apoptosis mitokondrial yaitu sitokrom-c yang kemudian mengaktivasi caspase 3 melalui caspase 9, dan menginduksi apoptosis.<sup>22,44</sup>

Review Article



Gambar 1 Peranan NCL dalam Kanker Ovarium. <sup>32-46</sup>

Peran sentral WFA yaitu mampu menginduksi kematian sel melalui produksi ROS sebagai mekanisme utama. *Reactive oxygen species* akan merusak membran mitokondria dan mengakibatkan kebocoran ROS ke sitosol sehingga merusak organel lain, selain dapat menyebabkan kerusakan DNA. Sementara itu, cisplatin akan menginduksi kerusakan DNA melalui mekanisme utama yaitu pengikatan langsung DNA dan menyebabkan pembentukan DNA *adducts*. Pemberian cisplatin tunggal yang memicu nefrotoksisitas akibat regulasi protein Bcl-2 yang memicu resistensi dapat diatasi dengan pemberian kombinasi WFA. WFA telah terbukti mampu menurunkan regulasi Bcl-2 sehingga menjadi kombinasi potensial dalam mengobati kanker ovarium serta mengurangi nefrotoksisitas.<sup>11</sup> WFA juga dapat menghambat Notch-1 yang menurunkan regulasi Bcl-2 anti apoptosis dan meningkatkan regulasi Bax pro-apoptosis sehingga mengarah pada kematian sel kanker. Selain itu, peningkatan ekspresi reseptor Notch1 menyebabkan peningkatan *hairy/enhancer of split 1* (Hes 1) dan *hes-related with YRPW motifs 1* (Hey1) yang berfungsi dalam pengaturan transkripsi gen yang terlibat dalam proses apoptosis (Gambar 1).<sup>28,45-47</sup>

### Mekanisme Konstruksi, Administrasi, dan Distribusi dari Kombinasi Cisplatin-Withaferin Berbasis Nanopartikel *Pegylated Liposom*

Nanopartikel merupakan salah satu pendekatan dalam sistem penghantaran obat di dalam tubuh karena dapat memberikan beberapa keuntungan seperti peningkatan efektivitas serta waktu paruh dari kombinasi Cisplatin-Withaferin berbasis nanopartikel menggunakan *PEGylated liposome* sebagai pembawa dalam sistem penghantaran obat. Liposom merupakan



Review Article

salah satu metode penghantaran obat dengan wujud berupa vesikel artifisial yang berbentuk bulat.<sup>48,49</sup> Rongga dan membran fosfolipid *bilayer* yang terdapat pada liposom memungkinkan obat hidrofilik maupun hidrofobik terangkut di dalamnya.<sup>50</sup> Liposom yang digunakan dikombinasikan dengan *polyethylene glycol* (PEG) untuk menghasilkan efek yang lebih baik. Konjugasi liposom dengan PEG bertujuan untuk meningkatkan lama waktu paruh, meningkatkan solubilitas, serta dapat menghindarkan modalitas dari degradasi oleh RES dan sistem imun sehingga meningkatkan efektivitas dari modalitas.<sup>51,52</sup>

Pembuatan kombinasi ini dimulai dengan menggunakan metode *thin lipid film hydration* yang termodifikasi.<sup>53</sup> Langkah pertama yang dilakukan adalah melarutkan *egg-phosphatidylcholine* (EPC), kolesterol, dan *1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000]* (DSPE-mPEG) dalam campuran kloroform dan metanol dengan perbandingan masing-masing 2:1 (v/v). Withaferin A didapatkan dengan cara mengekstraksi daun *Withania somnifera* beserta cisplatin juga ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Larutan kemudian dievaporasi menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* dengan tekanan yang rendah pada suhu 45°C. Film lipid tipis yang didapatkan kemudian diletakkan pada bagian dalam gelas. Film yang berisikan lipid kering didispersi dengan rotasi ringan pada suhu ruangan dalam larutan PBS dengan pH 7.4. Hasil dispersi liposom kemudian diaduk dan disonikasi selama 10 menit. Liposom yang terbentuk kemudian disentrifugasi selama 15 menit (50.000 g, 15 °C) dengan tujuan untuk menghilangkan modalitas yang tidak terenkapsulasi serta *multilamellar vehicle* (MLV) yang terbentuk, sehingga dihasilkan liposom *unilamellar* utuh dengan ukuran kurang dari 100 nm. Liposom yang terbentuk kemudian disaring menggunakan *polyvinylidene difluoride* (PVDF) 450 nm dengan tujuan untuk menghilangkan liposom yang berukuran lebih besar. Liposom final yang tersisa dalam larutan PBS pH 7.4 disimpan dalam suhu 4°C untuk dapat digunakan selanjutnya.<sup>53</sup>

Terdapat berbagai cara dalam administrasi obat dengan keunggulan dan kelemahan masing-masing, salah satunya adalah jalur administrasi per oral. Administrasi per oral memiliki keunggulan dalam kenyamanan pemberian, tidak menyakitkan, dan biaya yang diperlukan sangat minimal.<sup>54,55</sup> Pada administrasi rute per oral, masih terdapat garam empedu, asam lambung, dan enzim pada usus halus yang dapat memicu degradasi liposom.<sup>56</sup>

Studi oleh Niu *et al.* (2011) menunjukkan bahwa memodifikasi liposom dengan polimer pada permukaannya dapat meningkatkan stabilitas liposom dan meningkatkan ketahanan terhadap degradasi melewati rute gastrointestinal (GIT).<sup>57</sup> *Polyethylene glycol* (PEG) merupakan salah satu polimer yang dapat meningkatkan ketahanan liposom dari degradasi GIT. Pada

Review Article

*PEGylated liposome*, PEG akan membungkus liposom dari luar sehingga mencegah permukaan liposom berinteraksi dengan lingkungan yang dapat mendegradasinya. Lebih lanjut, modalitas akan dapat sampai di usus halus dan siap untuk diabsorpsi.<sup>55</sup>

Sistem penghantaran obat menggunakan nanopartikel liposom mengakibatkan modalitas dapat diserap melalui jalur intraselular melalui enterosit. Bioavailabilitas dari modalitas yang terbungkus menggunakan nanopartikel liposom dapat meningkat sebab area permukaan yang berkontak langsung dengan permukaan enterosit juga meningkat.<sup>56</sup> Penggunaan liposom juga dapat mencegah modalitas mengalami *first pass metabolism* di hati. Hal ini disebabkan karena modalitas yang terbungkus dengan liposom tidak masuk ke dalam aliran darah vena porta hepatica melainkan menuju sistem limfatik usus, namun mekanisme detail mengenai jalur ini masih belum diketahui.<sup>56,58</sup>

Penggunaan liposom dengan ukuran kurang dari 100 nm pada Cisplastin-Withaferin berbasis nanopartikel *pegylated* liposom menyebabkan modalitas dapat terakumulasi pada jaringan kanker. Hal ini disebabkan oleh struktur endotelium tumor yang berbeda dengan endotelium pada jaringan normal. Endotelium tumor memiliki celah antar sel sebesar 100-400 nm, dibandingkan dengan endotelium normal yang berikatan tanpa celah pada hubungan antarselnya.<sup>59</sup> Kondisi tersebut dapat memberikan keuntungan karena dapat mengurangi jumlah Cisplastin-Withaferin berbasis nanopartikel *pegylated* liposom yang terakumulasi pada jaringan normal, sehingga dapat mengurangi efek toksik yang mungkin timbul dari pemberian Cisplastin-Withaferin berbasis nanopartikel *pegylated* liposom. Keuntungan lain dari penggunaan liposom yaitu dapat menghantarkan WFA yang bersifat hidrofobik dan impermeabel terhadap membran sel untuk masuk ke dalam sel.<sup>60,61</sup>

Nanopartikel liposom yang membawa modalitas dikonstruksi agar berikatan dengan PEG dengan tujuan untuk memberikan efek yang lebih baik dibandingkan tanpa penggunaan PEG. Modifikasi liposom dengan PEG dapat meningkatkan waktu paruh modalitas. Modifikasi tersebut mengubah struktur alami dari liposom sehingga tidak dapat dikenali oleh protein komplemen, immunoglobulin, dan apolipoprotein yang biasanya mengenali liposom dan berperan dalam degradasi liposom.<sup>62</sup> Liposom yang berikatan dengan PEG dapat terhindar oleh sistem retikulo endotelial (RES) yang merupakan sistem yang dapat mendegradasi liposom bebas.<sup>51</sup>

Modifikasi liposom dengan PEG juga dapat meningkatkan efektivitas dari obat-obatan kanker.<sup>51,63</sup> Penggunaan PEG berguna untuk meningkatkan solubilitas modalitas di dalam air karena PEG merupakan molekul dengan polaritas yang tinggi, sehingga mampu meningkatkan



Review Article

kelarutan dari modalitas yang berikatan dengannya.<sup>64</sup> Kombinasi Cisplastin-Withaferin berbasis nanopartikel *pegylated* liposom akan dieliminasi dari tubuh terutama melalui urin. Cisplatin memiliki dua jalur utama dalam ekskresi. Lebih dari 90% cisplatin yang diadministrasi akan diekskresikan melalui sistem ekskresi ginjal, dan kurang dari 10% sisanya akan dieliminasi melalui empedu.<sup>65</sup>

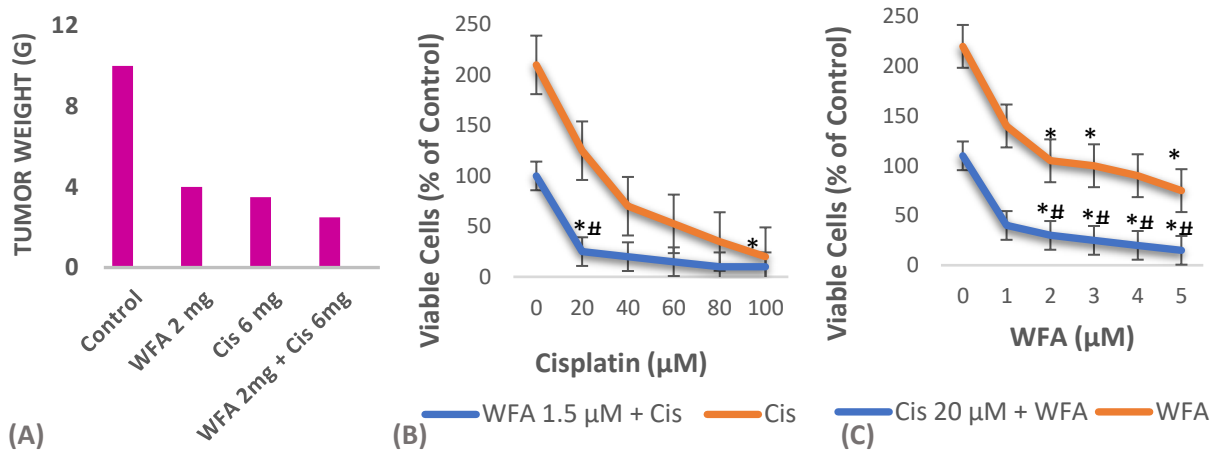
Withaferin A akan dimetabolisasi oleh hati menjadi senyawa yang lebih hidrofilik sehingga dapat diekskresikan melalui urin. Nanopartikel PEG yang berikatan dengan liposom merupakan molekul hidrofilik sehingga tidak akan terakumulasi di dalam tubuh dan akan diekskresikan melalui feses serta urin.<sup>66</sup> Liposom yang merupakan nanopartikel utama pembawa pada kombinasi Cisplastin-Withaferin berbasis nanopartikel *pegylated* liposom akan dapat dieliminasi dari darah melalui internalisasi oleh sel fagosit ataupun degradasi oleh enzim intraselular.<sup>48</sup>

### **Efek Klinis dari Kombinasi Cisplastin-Withaferin Berbasis Nanopartikel *Pegylated* Liposom dalam Menghambat Pertumbuhan Sel Kanker Ovarium**

Withaferin A merupakan salah satu komponen molekul biologis yang tergolong ke dalam kelas *steroidal lactone metabolites*. Bahan alam ini memiliki bioavailabilitas yang rendah terutama jika di konsumsi secara oral karena terdegradasi oleh asam lambung, dan enzim – enzim pencernaan saat mencerna makanan. Untuk mengurangi efek yang tidak diinginkan, WFA perlu dienkapsulasi guna meningkatkan bioavailabilitasnya. Selain itu, penelitian berbasis *clinical trial* terkait WFA pada kanker juga masih terbatas sehingga masih terdapat pro dan kontra akan potensi WFA dalam penanganan kanker.<sup>67,68</sup> Misalnya pada penelitian Prabu (2015), secara *in vivo* kandungan WFA pada daun tidak menimbulkan adanya toksisitas pada maternal maupun fetus dari segi berat badan tikus, jumlah korpus lutea, implantasi, janin tikus yang hidup, maupun malformasi dari viseral. Akan tetapi, pada WFA yang diekstrak dari akar dengan dosis 2000mg/kg/hari dapat menimbulkan toksisitas secara *in vivo*.<sup>69</sup>

Mekanisme WFA dalam menghambat pertumbuhan sel kanker ovarium yaitu menghambat *nerve growth factor* (NGFR) untuk mengaktivasi TRKA menjadi p-TRKA sehingga tidak menyebabkan fosforilasi dari MEK dan ERK.<sup>33</sup> Menurut Kakar *et al.* (2014), kombinasi WFA (2 mg/kg) dan CIS (6 mg/kg) menyebabkan penurunan berat tumor sebesar 70-80% dan sangat efektif menekan pertumbuhan tumor ovarium secara *in vivo* (Gambar 2A). Kondisi ini menunjukkan bahwa kombinasi WFA dan CIS dapat mengurangi dosis terapi CIS sekaligus menurunkan efek samping terkait pengobatan CIS dosis tinggi.<sup>28</sup>

Review Article



**Gambar 2 Proliferasi Sel Kanker Ovarium CaOV3.**

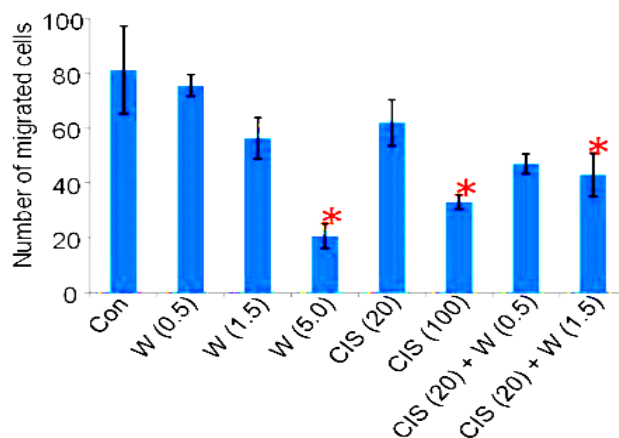
(A) Berat tumor pada tikus setelah diinjeksi CIS, WFA dan kombinasi CIS dan WFA. \* Mewakili signifikan dibandingkan dengan kontrol pada  $p \leq 0.05$ . (B dan C) Perbedaan pertumbuhan sel yang diobati dengan CIS saja, WFA saja dan kombinasi CIS dan WFA. \* $p < 0.05$  dibandingkan dengan kontrol, # $p < 0,05$  dibandingkan dengan CIS atau WFA secara tunggal. WFA, Withaferin-A; Cis, Cisplatin.<sup>11,28</sup>

Kombinasi WFA dan CIS secara signifikan menurunkan kemampuan pertumbuhan sel kanker ovarium hingga empat kali lipat dibandingkan pengobatan 006E dengan CIS atau WFA secara tunggal (Gambar 2B dan 2C).<sup>11</sup> Efek WFA dalam proliferasi juga ditemukan pada sel kanker lambung AGS terkait penurunan siklin B1 sehingga menunda perkembangan sel dari fase G2 menuju mitosis. Withaferin A dengan konsentrasi 2.5 hingga 5 µM menyebabkan penurunan pertumbuhan sel kanker lambung dibandingkan kontrol yaitu sebesar 80%.<sup>70</sup>

**Efek Klinis dari Kombinasi Cisplatin-Withaferin Berbasis Nanopartikel PEGylated Liposom dalam Penghambatan Migrasi Kanker Ovarium**

Withaferin A mampu menghambat NGFR berikatan dengan TRKA sehingga mencegah terjadinya migrasi sel.<sup>33</sup> Kombinasi WFA dan CIS mampu menghambat migrasi sel kanker ovarium secara *in vitro* dibandingkan dengan sel kontrol. Kombinasi 20 µM CIS dan 15 µM WFA mampu menekan migrasi sel kanker ovarium dibandingkan pemberian WFA atau CIS secara tunggal sebesar 50%. Hal tersebut membuktikan, kombinasi WFA dengan Cisplatin lebih efektif daripada masing-masing agen yang digunakan secara tunggal (Gambar 3).<sup>28</sup> Lee *et al.* (2015) membuktikan, bahwa WFA dapat meningkatkan protein E-cadherin sehingga terjadi penghambatan EMT yang menekan proses migrasi. WFA dengan konsentrasi 2 µM secara signifikan menurunkan kemampuan migrasi sel kanker payudara MCF-10A yaitu dari 100% menjadi 25%.<sup>71</sup>

Review Article



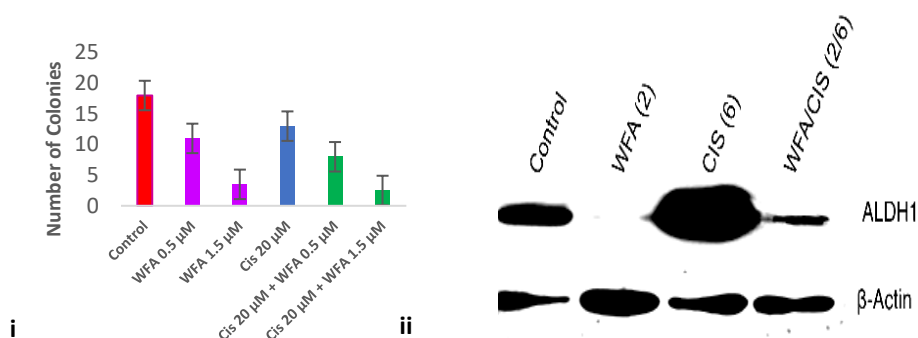
**Gambar 3 Pengaruh WFA dan CIS Secara Tunggal dan Kombinasi pada Migrasi Sel Kanker.<sup>28</sup>**

Keterangan : Satuan  $\mu\text{M}$ ; W, withaferin-A; CIS, cisplatin.<sup>28</sup>

### Efek Klinis dari Kombinasi Cisplatin-Withaferin Berbasis Nanopartikel *Pegylated Liposom* dalam Pengobatan Metastasis Kanker Ovarium dengan Target CSC

Metastasis kanker ovarium dikaitkan dengan peran  $\beta$ -catenin dalam mengatur ekspresi ALDH1+ dan kemampuan CSC membentuk *spheroid*. *Spheroid* merupakan agregat tumor ganas yang berfungsi untuk mengevaluasi kemampuan CSC untuk bermetastasis secara *in vitro*.<sup>29,72</sup> *Spheroid* dalam kanker ovarium berfungsi sebagai kendaraan untuk penyebaran sel kanker di rongga peritoneum, melindungi sel dari anoikis dan menghambat akses agen kemoterapi seperti cisplatin menuju sel kanker.<sup>73,74</sup> Penghambatan jalur persinyalan  $\beta$ -catenin akan mengganggu pembentukan agregat multiseluler (*spheroid*) dan menghambat metastasis secara *in vivo*. Sementara itu, aktivasi  $\beta$ -catenin akan menyebabkan peningkatan ekspresi ALDH1 yang meningkatkan pembentukan *spheroid* dan jalur untuk pembaharuan diri bagi CSC.<sup>74</sup>

Kombinasi WFA dan CIS sangat efektif untuk menginduksi kematian *spheroid* yang ditandai dengan berkurangnya ukuran dan jumlah *spheroid* dibandingkan kontrol secara signifikan (Gambar 4i). Pemberian CIS secara tunggal akan meningkatkan ekspresi protein ALDH1 sedangkan kombinasi WFA dan CIS dapat menurunkan ekspresi ALDH1 (Gambar 4ii). Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi WFA + CIS sangat efektif menekan ekspresi ALDH1.<sup>29</sup>



**Gambar 4 Pengaruh WFA dan CIS Pada Pembentukan Sferoid dan Ekspresi ALDH1.**

i) Analisis kuantitatif *spheroid*. \* $P < 0.005$ , ii) Analisis Western Blot ekspresi protein ALDH1. WFA, withaferin-A; CIS, cisplatin; WFA/CIS, kombinasi withaferin-A dan cisplatin; ALDH1, *aldehyde dehydrogenase-1*.<sup>28</sup>

### Efek Klinis dari Kombinasi Cisplatin-Withaferin Berbasis Nanopartikel *Pegylated Liposom* dalam Peningkatan Apoptosis Kanker Ovarium

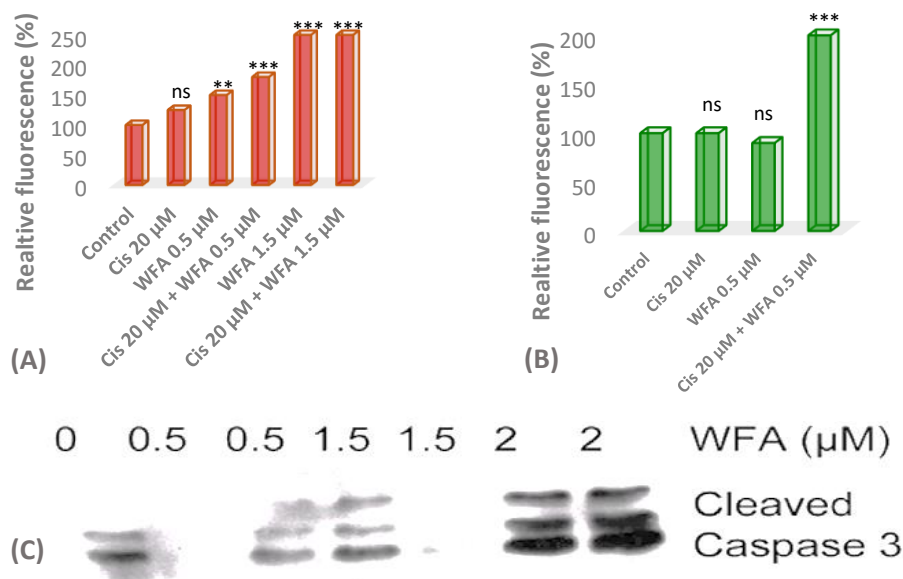
Withaferin A mampu meningkatkan apoptosis sel kanker ovarium melalui beberapa mekanisme. WFA mampu menginduksi pembentukan ROS yang dapat menyebabkan kerusakan mitokondria dan menyebabkan kerusakan DNA melalui aktivasi jalur persinyalan JNK. *c-Jun amino-terminal kinases* (JNK) dapat memediasi pembentukan  $\gamma$ -H2AX foci sebagai mekanisme penting dalam respon kerusakan DNA.<sup>42</sup> Aktivasi JNK dapat menyebabkan translokasi Bax serta menonaktifkan protein BCL-2 antiapoptosis sehingga menginduksi apoptosis pada sel kanker ovarium SKOV3.<sup>75</sup>

Menurut penelitian Fong *et al.* (2012), mekanisme WFA dalam meningkatkan apoptosis juga terkait aktivasi caspase 3.<sup>22</sup> Peningkatan ROS menyebabkan indikasi disfungsi mitokondria sehingga terjadi penurunan pasokan energi yang mengarah pada fragmentasi mitokondria dan terlepasnya sitokrom-c ke sitosol yang nantinya akan mengaktifkan kaskade caspase 3. Hal tersebut mendorong terjadinya *cell cycle arrest* sehingga terjadi apoptosis.<sup>76</sup> Kombinasi WFA dan CIS menyebabkan peningkatan kematian sel sebesar 70-80% yang menunjukkan bahwa peningkatan produksi ROS merupakan mekanisme utama dalam apoptosis sel oleh kombinasi WFA dan CIS.<sup>28</sup>

Sel A2780 yang diobati dengan cisplatin 20  $\mu$ M saja dan WFA 0,5  $\mu$ M saja menghasilkan jumlah sel positif berturut-turut dengan nilai RF  $105,89 \pm 7,59\%$  dan  $132,63 \pm 5,81\%$  dibandingkan dengan kontrol (RF = 100%). Sel yang diberi cisplatin 20  $\mu$ M dan WFA 0,5  $\mu$ M atau 1,5  $\mu$ M menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam menginduksi pembentukan ROS dengan nilai-nilai RF dari  $183,44 \pm 4,00\%$  dan  $260,00 \pm 13,60\%$  masing-

Review Article

masing (Gambar 5B).<sup>26</sup> WFA dengan konsentrasi 0,5 mM menunjukkan tidak ada indikasi kematian sel, sementara WFA 1,5 dan 2 mM menunjukkan peningkatan ekspresi dan aktivasi dari caspase 3 (Gambar 5D).<sup>22</sup> Kombinasi cisplatin 20  $\mu$ M dengan WFA 0,5  $\mu$ M mengakibatkan kerusakan DNA yang intens di hampir setiap sel (Gambar 5C) dengan nilai RF 208,14  $\pm$  27,40%. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi WFA dan CIS memunculkan efek sinergis pada induksi kerusakan DNA yang menyebabkan kematian sel.<sup>28</sup>



**Gambar 5 Pengaruh WFA dan Cisplatin pada Produksi ROS dan Kerusakan DNA.**

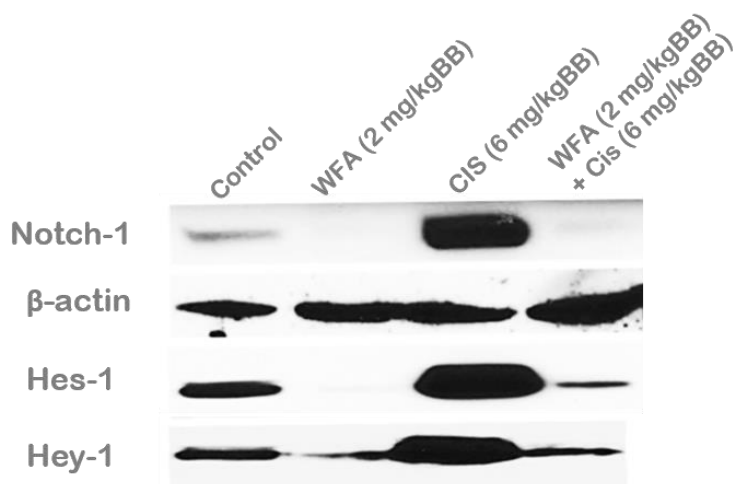
A) RF untuk sel positif ROS. B) RF untuk sel kerusakan DNA. Nilai yang ditunjukkan rata-rata  $\pm$  SEM. Ns = tidak signifikan, \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,0001$ . C) Analisis Western blot jalur caspase 3 dari sel A2780.<sup>21,27</sup>

WFA dapat meningkatkan apoptosis melalui penghambatan jalur persinyalan Notch-1 dan *downstream* (Hes1 dan Hey1).<sup>28</sup> Penghambatan Notch-1 akan menurunkan regulasi Bcl-2 anti apoptosis dan meningkatkan regulasi Bax pro-apoptosis sehingga mengarah pada kematian sel kanker.<sup>45</sup> Kemampuan WFA dalam meningkatkan apoptosis juga dibuktikan pada beberapa sel kanker secara *in vivo*. Menurut Liu *et al.* (2017), 10  $\mu$ M WFA meningkatkan pembentukan ROS sebesar 5 kali lipat dibandingkan kontrol yang menginduksi apoptosis sebesar 38% pada sel A549 melalui regulasi Bax/Bcl2.<sup>26</sup> WFA pada sel melanoma meningkatkan apoptosis sebesar 40% melalui aktivasi jalur mitokondria secara berurutan terkait dengan produksi ROS, penipisan *glutathione* (GSH), translokasi Bax, pelepasan sitokrom c, Bcl-2 *down-regulation*, aktivasi caspase 3 dan 9, dan fragmentasi nukleus.<sup>19</sup>

Withaferin A (2 mg / kg) mampu menghambat ekspresi Noch 1, Hes1 dan Hey1 yang sangat signifikan dibandingkan dengan kontrol secara *in vivo*. Sebaliknya, hewan coba yang

Review Article

diobati hanya dengan Cisplatin (6 mg /kgBB) menunjukkan peningkatan yang sangat signifikan pada gen Notch1, Hes1 dan Hey1. Sementara itu, kombinasi WFA (2 mg /kgBB) dengan Cisplatin (6 mg /kgBB) menunjukkan penurunan kadar Notch1 serta Hes1 dan Hey1 yang signifikan (Gambar 6). Hal ini menunjukkan penurunan regulasi Notch1 diatur oleh persinyalan dari WFA maupun kombinasi WFA dengan Cisplatin yang mengarah pada peningkatan apoptosis sel kanker ovarium.<sup>28</sup>



**Gambar 6 Analisis Western Blot Notch1, Hes1 dan Hey 1 Protein Secara In Vivo.**

Con = kontrol, W = WFA, CIS = cisplatin, W/CIS= kombinasi WFA dan Cisplatin. Nilai yang ditunjukkan dalam kurung adalah mg / kg. Con, control; W, withaferinA; CIS, cisplatin; W/CIS, kombinasi withaferin A dan cisplatin; Hey/Hes1, Hairy/Enhancer of Split 1.<sup>27</sup>

## Simpulan

Cisplastin-Withaferin berbasis nanopartikel *pegylated* liposom merupakan salah satu potensi terapi bagi kanker ovarium melalui kombinasi senyawa bioaktif withaferin A dengan agen terapi cisplatin. Kelemahan pemberian cisplatin tunggal yang memicu nefrotoksisitas terbukti berkaitan dengan regulasi protein Bcl-2 yang memicu resistensi, dan demi mengatasi hal tersebut, WFA terbukti mampu menurunkan regulasi Bcl-2 sehingga dapat menjadi kombinasi potensial dalam mengobati kanker ovarium serta mengurangi nefrotoksisitas. Mekanisme konstruksi pengobatan ini menggunakan metode *thin lipid film hydration* yang termodifikasi melalui ekstraksi daun *Withania somnifera* yang dikombinasikan dengan cisplatin, kemudian diadministrasikan melalui oral.

## Daftar Pustaka

1. World Health Organization [database on the Internet]. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [Cited 2018 Aug 8]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)



Review Article

2. World Cancer Research Fund International [database on the Internet]. Ovarian Cancer Statistics. 2012. [Cited 2018 Aug 8]. Available from: <https://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/ovarian-cancer-statistics>
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
4. American Cancer Society [database on the Internet]. Cancer Facts & Figures. 2018. [Cited 2018 Aug 8]. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>
5. Centers for Disease Control and Prevention [database on the Internet]. Ovarian Cancer Statistics. 2013. [Cited 2018 Aug 8]. Available from: <https://www.cdc.gov/cancer/ovarian/statistics/index.htm>
6. Kementerian Kesehatan RI [database on the Internet]. Situasi Penyakit Kanker. 2015. [Cited 2018 Aug 8]. Available from: <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/infodatin-kanker.pdf>
7. Yeung LT, Leung CS, Yip KP, Yeung CLA, Wog ST, Mok SC. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis: A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;309(7):1-13.
8. Buys S.S, Partridge E, dan Black A. Effect of Screening on Ovarian Cancer Mortality: The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2011; 305(22): 2295-303.
9. Yurkovetsky Z, Skates S, Lomakin A, Nolen B, Pulsipher T, Modugno F, et al. Development of a multimarker assay for early detection of ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28:2159-66.
10. Yang MF, Lou YL, Liu SS, Wang SS, Yin CH, Cheng XH, et al. Capn4 overexpression indicates poor prognosis of ovarian cancer patients. *J Cancer*. 2018;9(2):304-9.
11. Kakar SS, Jala VR, and Fong M.Y. Synergistic cytotoxic action of cisplatin and withaferin A on ovarian cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;423(4):819-25.
12. Li SS, Ma J, and Wong AST. Chemoresistance in ovarian cancer: exploiting cancer stem cell metabolism. *J Gynecol Oncol*. 2018;29(2):1-11.
13. Chan DW, Liu VW, Tsao GS, KM Yao, Furukawa T, Chan KK, et al. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008; 29(1):1742–50.
14. Brasseur K, Gevry N and Asselin E. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget*. 2017;8(3):4008-42.
15. Savai J, Varghese A, Pandita N, Chintamaneni M. Investigation of CYP3A4 and CYP2D6 Interactions of *Withania somnifera* and *Centella asiatica* in Human Liver Microsomes. *Phytother Res*. 2015;29(5):785-90.
16. Hidayat T, Priyandoko D, Wardiny PY and Islami DK. Molecular Phylogenetic Screening of *Withania somnifera* Relative From Indonesia Based on Internal Transcribed Spacer Region. *Hayati J Biosci*. 2016;23(2):1-4.
17. Biswal BM, Sulaiman SA, Ismail HC, Zakaria H, Musa KI. Effect of *Withania somnifera* (Ashwagandha) on the development of chemotherapy-induced fatigue and quality of life in breast cancer patients. *Integr Cancer Ther*. 2013;12(4):312-22.
18. Oh JH, Kwon TK. Withaferin A inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of cell adhesion molecules by inactivation of Akt and NF-kappaB in human pulmonary epithelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2009; 9(1):614–19.
19. Mayola E, Gallerne C, Esposti DD, Martel C, Pervaiz S, Larue L, et al. Withaferin A induces apoptosis in human melanoma cells through generation of reactive oxygen species and down-regulation of Bcl-2. *Apoptosis*. 2011;16(1): 1014–27.
20. Koduru S, Kumar R, Srinivasan S, Evers MB, Damodaran C. Notch-1 inhibition by Withaferin-A: a therapeutic target against colon carcinogenesis. *Mol Cancer Ther*. 2010; 9(1):202–10.
21. Lee IC and Choi BY. Withaferin-A—A Natural Anticancer Agent with Pleiotropic Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):290.
22. Fong MY, Jin S., Rane M., RK Singh, Gupta R., Kakar SS. Withaferin A synergizes the therapeutic effect of doxorubicin through ROS-mediated autophagy in ovarian cancer. *PLoS ONE*. 2012;7(7):1-16.
23. Khedgikar V, Kushwaha P, Gautam J, Verma A, Changkija B, Kumar A et al. Withaferin A: a proteasomal inhibitor promotes healing after injury and exerts anabolic effect on osteoporotic bone. *Cell Death Dis*. 2013;4(8):1-17.
24. He K, Tang M. Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects. *Chem Biol Interact*. 2018;295(1):13-19.
25. D'souza A, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(9):1257-75.
26. Liu X, Chen L, Liang T, Tian XD, Liu Y, Zhang T. Withaferin A induces mitochondrial-dependent apoptosis in non-small cell lung cancer cells via generation of reactive oxygen species. *J Buon*. 2017;22(1):244-50.
27. Yeung LT, Leung CS, Yip KP, Yeung CLA, Wog ST, Mok SC. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis: A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;309(7):1-13.

Review Article

28. Kakar S.S, Ratajczak M, Powe K.S, Moghadamfalahi M, Miller DM, Batra SK, et al. Withaferin A Alone and in Combination with Cisplatin Suppresses Growth and Metastasis of Ovarian Cancer by Targeting Putative Cancer Stem Cells. *PloS One*. 2014;9(9):1-9.
29. Kakar S, Parte S, Carter K, Joshua I, Worth C, Rameshwar P, et al. Withaferin A (WFA) inhibits tumor growth and metastasis by targeting ovarian cancer stem cells. *Oncotarget*. 2017;8(43):74494-505.
30. Zhang, X.; Samadi, A.K.; Roby, K.F.; Timmermann, B.; Cohen, M.S. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis in ovarian carcinoma cell lines CaOV3 and SKOV3 by natural withanolide Withaferin-A. *Gynecol Oncol*. 2012;124(1):606–12.
31. Sarkar S, Horn G, Moulton K., Oza A, Byler S, Kokolus S, et al.. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int J Mol Sci*. 2015;14(10):21087-113.
32. Vera C, Tapia V, Vega M, Romero C. Role of nerve growth factor and its TRKA receptor in normal ovarian and epithelial ovarian cancer angiogenesis. *J. Ovarian Res*. 2014;7(1):1-8.
33. Retamales-Ortega, R., Oróstica, L., Vera, C., Cuevas, P., Hernández, A., Hurtado, I., Vega, M. and Romero, C. Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3): 507.
34. Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):225–38.
35. Lau EY, Ho NP, and Lee TK. Cancer stem cells and their microenvironment: biology and therapeutic implications. *Stem Cells Int*. 2017;2017(1):1-11.
36. Varas-Godoy M, Rice G, Illanes S. The Crosstalk between Ovarian Cancer Stem Cell Niche and the Tumor Microenvironment. *Stem Cells Int*. 2017;2017(1):1-8.
37. Lawrenson K, Grun B, Benjamin E, Jacobs IJ, Dafou D, Gayther SA. Senescent fibroblasts promote neoplastic transformation of partially transformed ovarian epithelial cells in a three-dimensional model of early stage ovarian cancer. *Neoplasia*. 2010;12(4):317–25.
38. Wang C, Michener CM, Belinson JL, Vaziri S, Ganapathi R, Sengupta S. Role of the 18:1 lysophosphatidic acid/ovarian cancer immunoreactive antigen domain containing 1 (OCIAD1)-integrin axis in generating late-stage ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(6):1709–18.
39. Sengupta S, Michener CM, Escobar P, Belinson J, Ganapathi R. Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1 (OCIAD1), a key player in ovarian cancer cell adhesion. *Gynecol Oncol*. 2008;109(2):226–33.
40. Tomita M. Involvement of DNA-PK and ATM in Radiation- and Heat-induced DNA Damage Recognition and Apoptotic Cell Death. *J. Radiat. Res*. 2010;51(1):493–501.
41. Chang H, Li R, Wang H, Liu J, Tang J, Huang H, et al. Withaferin A Induces Oxidative Stress-Mediated Apoptosis and DNA Damage in Oral Cancer Cells. *Front Physiol*. 2017;8(1):1-11
42. Yang J, Zhao X, Tang M, Li L, Lei Y, Cheng P et al. The role of ROS and subsequent DNA-damage response in PUMA-induced apoptosis of ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(14):23492-506.
43. Cleaver JE, Feeney L, Revet I. Phosphorylated H2Ax is not an unambiguous marker for DNA double strand breaks. *Cell Cycle*. 2011;10(1):3223–4.
44. Liu JF, Chen CY, Chen HT, Chang CH, Tang CH. BL-038, a Benzofuran Derivative, induces cell apoptosis in human chondrosarcoma cells through reactive oxygen species/mitochondrial dysfunction and the caspases dependent pathway. *Int. J. Mol. Sci*. 2016;17(1491): 1-16.
45. Groeneweg J, Foster R, Growdon W, Verheijen R, Rueda B. Notch signaling in serous ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2014;7(1):95:1-12.
46. Silva F, Félix A, Serpa J. Functional redundancy of the Notch pathway in ovarian cancer cell lines. *Oncology Letters*. 2016;12(4):2686-91.
47. D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G: The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 2008;27(1):5148–67.
48. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo S, Zarghami N, Hanifehpour Y et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Let*. 2013;8(1):1-9.
49. He K, Tang M. Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects. *Chem Biol Interact*. 2018;295(1):13-9.
50. Goldberg MS. Immunoengineering: how nanotechnology can enhance cancer immunotherapy. *Cell*. 2015;161(2):201-4.
51. Milla P, Dosio F, Cattel L. PEGylation of Proteins and Liposomes: a Powerful and Flexible Strategy to Improve the Drug Delivery. *Curr Drug Metab*. 2012;13(1):105-19.
52. Liu Y, Gao D, Zhang X, Liu Z, Dai K, Ji B, et al. Antitumor drug effect of betulinic acid mediated by polyethylene glycol modified liposomes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;64(1):124-32.
53. Cho H, Lee C, Lee Y. Preparation and Evaluation of PEGylated and Folate-PEGylated Liposomes Containing Paclitaxel for Lymphatic Delivery. *J Nanomater*. 2015;2015(1):1-10
54. Patel VF, Liu F, Brown MB. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Control Release*. 2011;153(2):106-16.
55. Desai PP, Date AA, Patravale VB. Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations - opportunities and limitations. *Drug Discov Today Technol*. 2012;19(2):71-4.

Review Article

56. Silva A, Santos D, Ferreira DM, Lopes C. Lipid-based Nanocarriers As An Alternative for Oral Delivery of Poorly Water- Soluble Drugs: Peroral and Mucosal Routes. *Curr Med Chem*. 2012;19(26):4495-510.
57. Niu M, Lu Y, Hovgaard L, Wu W. Liposomes containing glycocholate as potential oral insulin delivery systems: preparation, in vitro characterization, and improved protection against enzymatic degradation. *Int J Nanomedicine*. 2011;6(1):1155-66.
58. Fricker G, Kromp T, Wendel A, Blume A, Zirkel J, Rebmann H, et al. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. *Pharm Res*. 2010;27(8):1469-86.
59. Chow EK, Ho D. Cancer nanomedicine: from drug delivery to imaging. *Sci Transl Med*. 2013;5(216):1-12.
60. Bodhankar S, Devkar S, Kandhare A, Sloley B, Jagtap S, Lin J et al. Evaluation of the bioavailability of major withanolides of *Withania somnifera* using an in vitro absorption model system. *J Adv Pharm Technol Res*. 2015;6(4):159-64.
61. Mudshinge SR, Deoreb AB, Patil S, Bhalgat CM. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharm J*. 2011;19(1):129-41.
62. Knudsen KB, Northeved H, Kumar PE, Permin A, Gjetting T, Andresen TL, et al. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine*. 2015;11(2):467-77.
63. Al-Azayzih A, Missaoui WN, Cummings BS, Somanath PR. Liposomal-mediated delivery of the p21 activated kinase-1 (PAK-1) inhibitor IPA-3 limits prostate tumor growth in vivo. *Nanomedicine*. 2016;12(5):1231-9.
64. Nayak AK, Panigrahi PP. Solubility enhancement of etoricoxib by cosolvency approach. *ISRN Phys Chem*. 2012;2012(1):1-5.
65. Tsang R, Al-Fayea T, Au H. Cisplatin Overdose. *Drug Safety*. 2009;32(12):1109-22.
66. Gossen P, Witzigmann D, Sieber S, Huwyler J. PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application. *J Control Release*. 2017;260(1):46-60.
67. Mirjalili MH, Fakhr-tabatabaei SM, Alizadeh H, Ghassempour A, Mirzajani F. Genetic and Withaferin A Analysis of Iranian Natural Populations of *Withania Somnifera* and *W. Coagulans* by RAPD and HPTLC. *Nat Prod Com*. 2009;4(3):337-46.
68. U.S National Library of Medicine [ database on the Internet]. Search of: withaferin A List Results ClinicalTrials. 2019 [Cited 2019 Aug 13]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=withaferin+A&cntry=&state=&city=&dist=>
69. Prabu PPC. Prenatal developmental toxicity evaluation of *Withania somnifera* root extract in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol*. 2015;38(1):50-6.
70. Hijau K, Kim TH, Hwang EH, Chang KT, Hong JJ, Park JH. Withaferin A inhibits the proliferation of gastric cancer cells by inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Oncol Lett*. 2017;14(1):416-22.
71. Lee J, Hahm E.R, Marcus A and Singh S.V. Withaferin A Inhibits Experimental Epithelial-Mesenchymal Transition in MCF-10A Cells and Suppresses Vimentin Protein Level in Vivo in Breast Tumors. *Mol Carcinog*. 2015;54(6):417-29.
72. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. 2017;108(3):238-89.
73. Shield K, Ackland M, Ahmed N, Rice G. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecologic Oncology*. 2009;113(1):143-8.
74. Condello S, Morgan C.A, Nagdas S, Cao L, Turek J, Hurley TD, et al. Beta-Catenin Regulated ALDH1A1 is a Target in Ovarian Cancer Spheroids. *Oncogen*. 2015;34(18):2297-308.
75. Xu L, Yu J, Zhai D, Zhang D, Shen W, Bai L et al. Role of JNK Activation and Mitochondrial Bax Translocation in Allicin-Induced Apoptosis in Human Ovarian Cancer SKOV3 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014(1):1-6.
76. Chowdhury SR, Ray U, Chatterjee BP, Roy SS. Targeted apoptosis in ovarian cancer cells through mitochondrial dysfunction in response to *Sambucus nigra* agglutinin. *Cell Death Dis*. 2017;8(5):1-12.

### Daftar Singkatan

ALDH1: *aldehyde dehydrogenase-1*  
ATM: *Ataxia-telangiectasia mutated*  
BHLH: *Basic helix-loop-helix*  
CSC: *Cancer Stem Cell*  
Cyt-c: *cytochrome c*  
ERK: *Extracellular signaling-regulated kinase*  
Hey/Hes-1: *Hairy/Enhancer of Split 1*  
JNK: *c-Jun N-terminal kinases*

MEK: *Mitogen activated protein kinase*  
NCL: *Nano-Cisferin-Liposom*  
NGF: *Nerve growth factor*  
NGFR: *Nerve Growth Factor Receptor*  
ROS: *Reactive Oxygen Species*  
TRKA: *Tyrosine kinase A*  
 $\gamma$ -H2AX foci: *Hea-induced phosphorylated histone foci formation*