



**TEKNOLOGI CRISPR/CAS9 SEBAGAI MASA DEPAN TERAPI**

Rahma Ajeng Puspitasari

Politeknik Kesehatan KMC Kuningan

*e-Mail: rahmaajengp@gmail.com*

**INFO ARTIKEL**

Artikel Masuk : 2024-01-21

Artikel Review: 2024-01-21

Artikel Revisi: 2024-01-22

Kata Kunci:

**CRISPR/Cas9; gene editing; terapi gen, CRISPR/Cas9 delivery; etika dalam gene editing**

Keywords:

**CRISPR/Cas9; gene editing; gene therapy, CRISPR/Cas9 delivery; ethics in gene editing**

Abstrak

*Teknologi CRISPR/Cas9, yang awalnya ditemukan sebagai sistem pertahanan bakteri terhadap virus, telah berkembang pesat sebagai alat untuk editing genom pada organisme eukariotik, termasuk manusia. CRISPR/Cas9 memungkinkan pemotongan dan modifikasi DNA secara tepat pada lokasi yang ditargetkan, menjadikannya alat yang sangat menjanjikan untuk terapi penyakit genetik, seperti hemofilia, kanker, dan berbagai kelainan genetik lainnya. Artikel ini mengulas mekanisme kerja CRISPR/Cas9, dari pengenalan dan pemotongan DNA target oleh enzim Cas9 yang dipandu oleh RNA guide (gRNA), hingga proses perbaikan DNA yang dapat diarahkan untuk terapi. Salah satu tantangan utama dalam penerapannya adalah metode penghantaran (delivery) CRISPR/Cas9 yang aman dan efisien. Penggunaan vektor virus seperti adenovirus, lentivirus, dan adeno-associated virus (AAV) telah banyak diteliti, meskipun terdapat potensi masalah imunogenik. Alternatif lain menggunakan teknologi nanoteknologi berbasis polimer, lipid, dan nanopartikel juga menunjukkan potensi besar dalam meningkatkan efisiensi pengiriman CRISPR/Cas9. Meskipun CRISPR/Cas9 memiliki potensi besar, penggunaannya, terutama untuk editing genom manusia, menghadapi tantangan etik yang perlu dipertimbangkan dengan hati-hati. Teknologi ini diharapkan menjadi terapi masa depan yang efektif untuk berbagai penyakit genetik dan kanker, namun penggunaan untuk perubahan garis keturunan manusia harus diatur secara ketat*

Abstract

CRISPR/Cas9 technology, originally discovered as a bacterial defense system against viruses, has rapidly developed as a tool for genome editing in eukaryotic organisms, including humans. CRISPR/Cas9 allows precise cutting and modification of DNA at targeted sites, making it a very promising tool for the therapy

---

of genetic diseases, such as hemophilia, cancer, and various other genetic disorders. This article reviews the mechanism of action of CRISPR/Cas9, from the recognition and cutting of target DNA by the Cas9 enzyme guided by guide RNA (gRNA), to the process of DNA repair that can be directed for therapy. One of the main challenges in its application is the safe and efficient delivery method of CRISPR/Cas9. The use of viral vectors such as adenovirus, lentivirus, and adeno-associated virus (AAV) has been widely studied, despite potential immunogenic problems. Alternatives using polymer, lipid, and nanoparticle-based nanotechnology have also shown great potential in improving the efficiency of CRISPR/Cas9 delivery. Although CRISPR/Cas9 has great potential, its use, especially for human genome editing, faces ethical challenges that need to be carefully considered. This technology is expected to be an effective future therapy for various genetic diseases and cancers, but its use for human lineage modification must be strictly regulated.

---

## 1. PENDAHULUAN

Semenjak ditemukannya mesin *polimerase chain reaction* (PCR) penelitian kesehatan biomedis berkembang sangat pesat dan pada saat ini telah sampai pada level *gene editing*. Di dalam *life science*, teknologi *gene editing* meliputi tindakan untuk menghapus, menyisipkan, dan memodifikasi sekuens DNA dari sel sehingga menimbulkan efek baru pada individu yang direkayasa (Hsu et al., 2014). Teknik ini diharapkan dapat menjadi terapi suatu penyakit seperti kelainan genetik bawaan seperti hemofilia, kanker, dan perbaikan tanaman (Timin et al., 2018)(Deng et al., 2019).

Ada berbagai macam teknik *gene editing* namun yang saat ini sedang masif berkembang adalah *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/*CRISPR-associated 9* (Cas9) (Ran et al., 2013). CRISPR/Cas9 pada awalnya merupakan sistem pertahanan (imun) pada bakteri (prokariotik) terhadap DNA virus (*bacteriophage*), tetapi peneliti telah melakukan rekayasa sehingga sistem ini dapat digunakan juga pada genom editing mamalia (Wan et al., 2019)(Schuh et al., 2018)(Deng et al., 2019). Walau sistem ini

menjanjikan, terdapat beberapa tantangan dalam penggunaannya. Salah satu tantangan tersebut adalah sistem delivery (Timin et al., 2018). Setiap protein asing yang masuk ke dalam sel akan didegradasi oleh sistem pertahanan sel sehingga kompleks seperti CRISPR/Cas9 memerlukan *carrier* agar tidak terdegradasi sehingga dapat memodifikasi DNA/genom target. Untuk itu di dalam makalah ini akan dijelaskan mengenai pengertian CRISPR/Cas9 dan mekanisme kerjanya, kemudian berbagai teknik delivery CRISPR/Cas9, dan juga peluang dan tantangan masa depan CRISPR/Cas9 sebagai alat terapi.

Dalam review ini, akan dijelaskan mengenai pengertian CRISPR/Cas9 dan cara kerjanya, berbagai teknik delivery CRISPR/Cas9 dalam terapi, dan peluang serta tantangan masa depan CRISPR/Cas9.

## **2. TERAPI GEN**

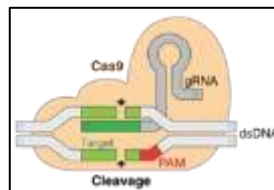
Terapi gen merupakan salah metode yang digunakan untuk mentreatment suatu penyakit. Metode ini memiliki potensi yang baik pada penyakit keturunan, defisiensi imun seperti hemofilia dan  $\beta$ -thalasemia, kanker, neurodegeneratif maupun gangguan kardiovaskuler. Metode ini merupakan harapan terbaik ketika tidak terdapat terapi obat maupun alternatif lain. Sampai saat ini belum ada produk dari gen terapi karena masih dalam tahapan penelitian translasional.

Penelitian mengenai terapi gen dimulai ketika pemenang hadiah Nobel Winner Joshua Lederberg (1963) menjadi pioneer pada genetika bakteri dan biologi plasmid. Dari gen transfer dilakukan pada gen bakteri kemudian gen transfer dapat dilakukan pada sel manusia dengan teknologi DNA rekombinan. Banyak teknologi yang digunakan dalam editing dari gen yaitu dengan RNAi (interference), *stem cell* iPS, dan juga yang saat ini menjadi *hit* besar adalah CRISPR. Teknologi CRISPR pertama kali dipublikasikan oleh Prof Zhang dari MIT Amerika Serikat dan saat ini menjadi hits karena potensinya yang baik dalam *gene editing* (Cong et al., 2013).

## **3. CRISPR/CAS9 DAN MEKANISME KERJANYA**

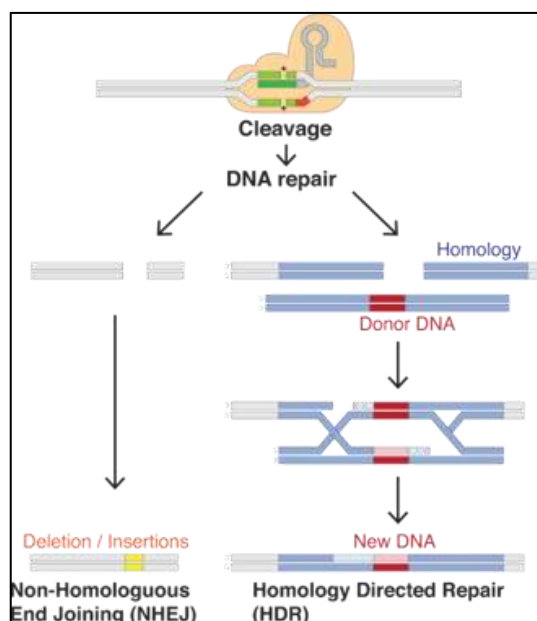
Sistem CRISPR/Cas9 atau bisa disingkat Cas9 merupakan enzim nuklease yang berfungsi memotong DNA. Cas9 merupakan sistem pertahanan alami yang dimiliki bakteri (prokariot, tidak memiliki membran inti) terhadap virus. Ketika RNA guide (gRNA) yang ada pada Cas9 menemukan targetnya dan urutannya cocok, Cas9 akan memotong DNA tersebut

sehingga menonaktifkan virus. Virus tidak dapat melakukan replikasi dan DNA virus kemudian terdegradasi di dalam sitoplasma (Wan et al., 2019)(Schuh et al., 2018) (Gambar 1).



**Gambar 1.** Cas9 melakukan pemotongan pada DNA target. (Eissenberg, 2021)

Setelah beberapa tahun peneliti mempelajari sistem ini, sistem ini ternyata tidak hanya memotong DNA virus tapi juga dapat direkayasa untuk memotong DNA lain secara tepat pada lokasi yang dipilih dengan merekayasa urutan gRNA yang ada Cas9 agar sesuai dengan DNA target yang ingin dipotong (Deng et al., 2019). Begitu masuk ke dalam nukleus, kompleks yang dihasilkan akan mengunci ke urutan singkat yang dikenal sebagai *protospacer adjacent motif* (PAM). Cas9 akan meng-unzip DNA dan mencocokkannya dengan RNA targetnya. Jika perpaduannya cocok, Cas9 akan memotong DNA secara *double strand break*. Jika yang ditarget merupakan sel abnormal seperti sel kanker, kerusakan pada DNA dibiarkan sehingga menyebabkan kematian sel secara terprogram. Namun jika yang ingin diterapi adalah suatu jenis penyakit tertentu, maka kita perlu menyiapkan strategi tertentu (Deng et al., 2019).



**Gambar 2.** Perbaikan DNA setelah pemotongan double-stranded. (Eissenberg, 2021)

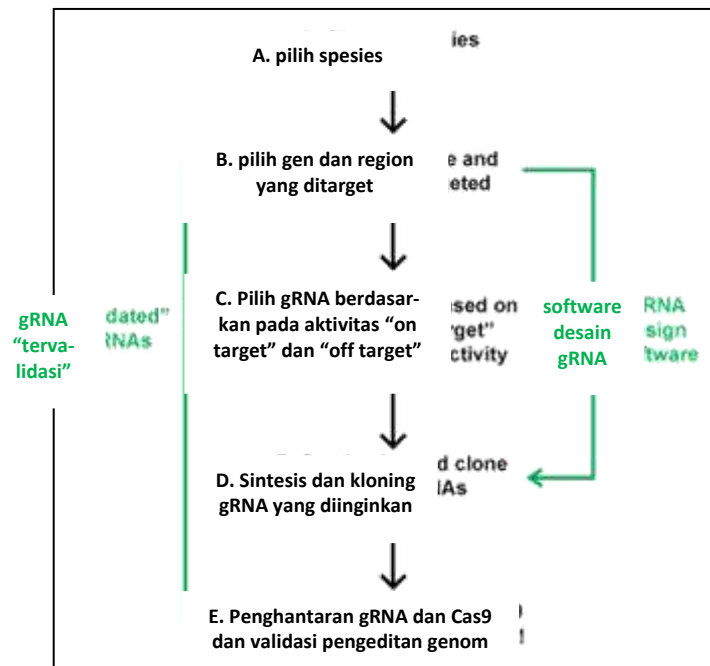
Secara alami di dalam nukleus, DNA diperbaiki secara otomatis dan mandiri, namun perbaikan DNA ini rawan terjadi mutasi karena tidak memiliki template untuk melakukan perbaikan. Dikhawatirkan perbaikan dari DNA *double-strand* terjadi secara random dan menimbulkan hasil yang tidak diinginkan. Sehingga strateginya, bersamaan dengan delivery sistem Cas9, template DNA donor baru yang membawa urutan gen yang diinginkan masuk ke dalam nukleus sehingga DNA dapat melakukan repair (perbaikan) secara homologus (Gambar 2). Sistem Cas9 dapat digunakan untuk menarget banyak gen sekaligus sehingga dapat digunakan untuk terapi gen. Tidak hanya satu titik mutasi tetapi pada banyak titik mutasi DNA secara bersamaan.

Meskipun CRISPR/Cas9 menjanjikan dalam pengeditan genom, masih terdapat permasalahan yaitu pada teknik pengiriman yang aman dan efisien. Vektor yang paling sering digunakan dalam delivery Cas9 dibedakan menjadi viral dan non viral. Vektor virus seperti adenovirus (AV) dan lentivirus (LV) tidak aman digunakan, dikarenakan menimbulkan reaksi immunogenik *in vivo*. Untuk itu dikembangkan teknik lain yaitu *non viral delivery* menggunakan polimer, *lipid-base* dan jenis nanopartikel lain dan menunjukkan keunggulan dalam terapi gen (Deng et al., 2019).

#### **4. PENGHANTARAN CRISPR/CAS9**

##### **a. Pre Delivery CRISPR/Cas9**

Sebelum melakukan *delivery*, dilakukan rekayasa pembentukan Cas9. Penjelasan secara lengkap dapat dilihat pada CRISPR Guide AddGene (AddGene, n.d.). Poin-poin penting tahapannya adalah sebagai berikut (Gambar 3) :



**Gambar 3.** Alur penghantaran CRISPR/Cas9.

Garis besar dalam membuat *engineered Cas9* adalah menentukan dan memilih urutan target DNA dan merancang gRNA (Addgene, n.d.). Adapun langkah-langkahnya :

1. Mengetahui urutan genom dari *cell line/organisme*

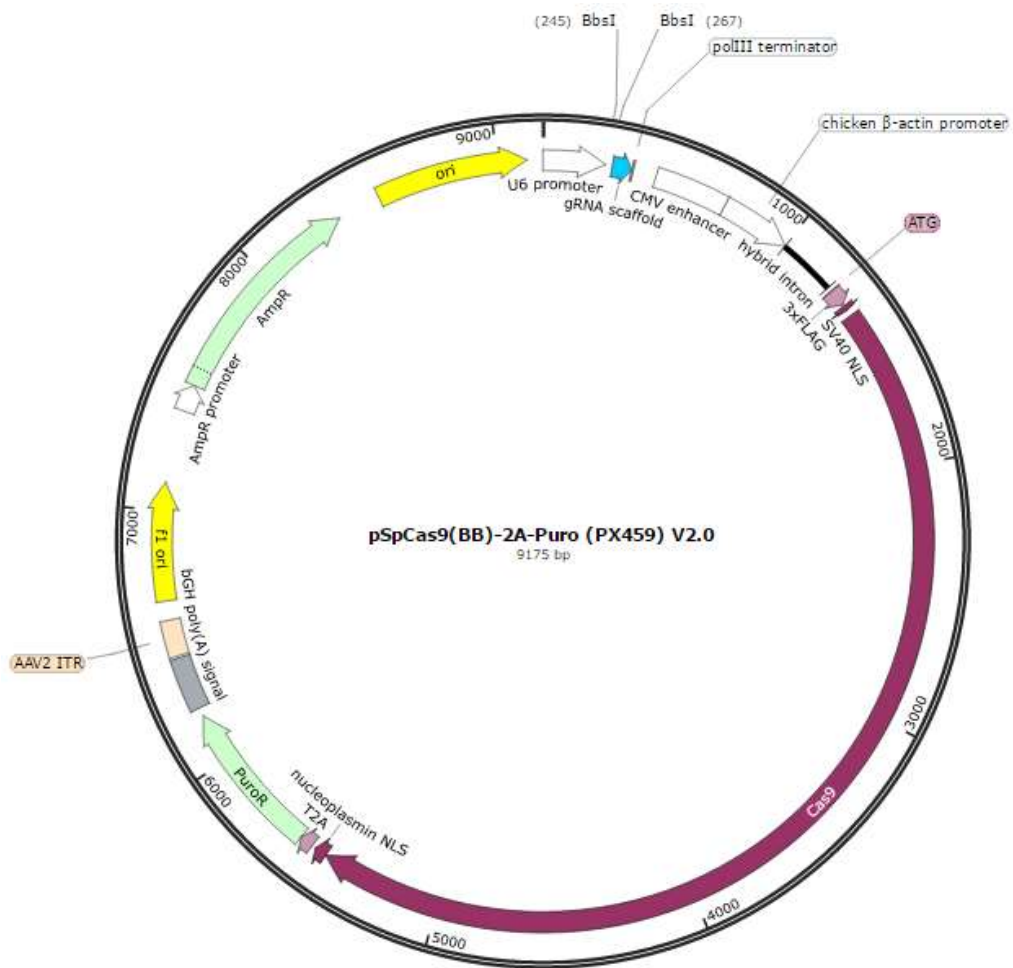
Jika memungkinkan, terlebih dahulu kita harus mengetahui sekuens genom target dan menentukan area yang ingin diubah. *Human Genome Project* (HGP) telah memetakan DNA manusia dan menyimpannya *Gene Bank* sehingga data ini bisa dipakai dan dimanfaatkan, membantu kita dalam memahami penyakit berdasarkan perbedaan susunan DNA.

2. Memilih gen dan elemen genetik yang akan dimanipulasi

Jika sudah memiliki peta susunan DNA, tahapan selanjutnya adalah menentukan area yang ingin dimanipulasi dengan CRISPR. Wilayah tersebut spesifik sehingga kita perlu membuat gRNA yang sesuai dengan lokasi target. Tidak mudah untuk membentuk rekombinan kompleks Cas9 dan gRNA secara manual. Saat ini telah tersedia plasmid yang mengkode sistem Cas9 (Gambar 4) secara komersial dan tinggal digunakan.

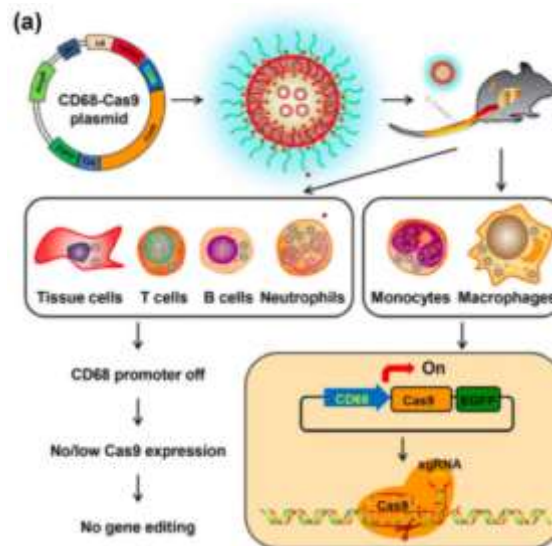
3. Mensintesis dan mengkloning gRNA yang diinginkan

Setelah memilih urutan DNA target, tahapan selanjutnya adalah mensintesis dan mengkloning gRNA. Setelah kita mendapatkan urutan gRNA, gen tersebut disisipkan pada plasmid Cas9 (Gambar 4) agar dapat dikloning di dalam organisme vektor.



**Gambar 4.** Salah satu struktur plasmid yang mengkode CRISPR/Cas9 (Ran et al., 2013).

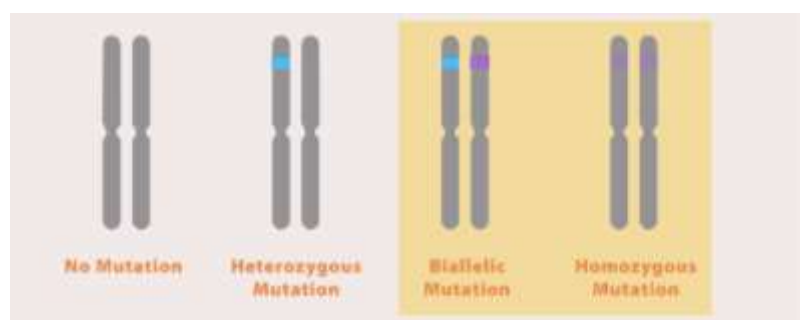
Contoh plasmid pM458 yang mengkode ekspresi Cas9 dipromotori oleh CD68 dan dienkapsulasi oleh CLAN mampu mengekspresikan Cas9 pada sel makrofag dan monosit (Gambar 5).



**Gambar 5.** Plasmid pM458 yang mengkode Cas9 didelivery masuk ke dalam tikus (Deng et al., 2019).

Setelah didapatkan kompleks Cas9 dan gRNA yang diinginkan, selanjutnya dilakukan *delivery* ke DNA target. Efisiensi CRISPR bergantung pada metode delivery dan jenis sel (AddGene, n.d.). Jadi sebelum dilakukan delivery, kita harus memastikan betul prosedur delivery sesuai dengan target sel.

Ketika kita menarget satu gen sel diploid, terdapat 4 hasil keluaran yang memungkinkan terjadi (Gambar 6). Sehingga untuk memastikan apakah berhasil terbentuk modifikasi gen editing, dilakukan pengecekan/validasi. Terdapat berbagai teknik validasi, yaitu: 1) *The mismatch cleavage assay*, 2) *Sanger amplicon sequencing*, 3) *Next generation amplicon sequencing* (ABM, 2018).



**Gambar 6.** Kondisi yang memungkinkan setelah terjadi modifikasi gen (ABM, 2018).

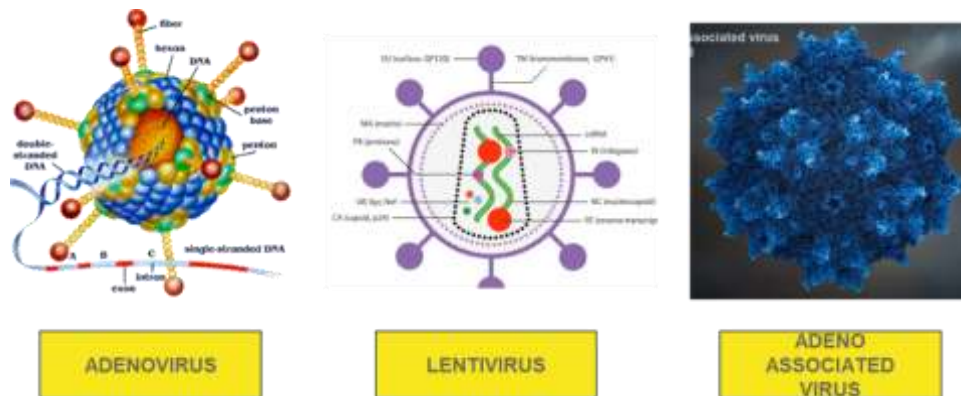
### b. Penghantaran CRISPR/Cas9

Terdapat berbagai teknik delivery CRISPR/Cas9 dan tekniknya disesuaikan dengan jenis sel yang ingin ditarget. Adapun sistem deliverynya adalah *viral* dan *non viral* delivery.

#### 1.) Penghantaran CRISPR/Cas9 berbasis Virus



Terdapat berbagai sistem delivery menggunakan virus untuk pengiriman CRISPR/Cas9. Agen virus yang dimaksud antara lain Adenovirus (AV), Lentivirus (LV), dan Adeno Associated Virus (AAV) yang sudah dinonaktifkan sifat patogenesisnya (virus rekombinan). Ringkasannya ditunjukkan pada Tabel 1.



#### a) Adenovirus (AdV)

Merupakan virus DNA *double-stranded* (dsDNA) non-envelope dengan nukleokapsid ikosahedral. Mampu menampung sekitar 34-43 kb. Untai DNANYa diapit oleh dua sekuens *inverted terminal repeat* (ITR). Virus ini dalam kondisi *wild type* merupakan penyebab 5% dari penyakit respiratori akut. Jika sudah dalam kondisi rekombinan, virus ini banyak digunakan dalam *delivery* untuk vektor pengiriman gen karena memiliki kelebihan: dapat menginfeksi sel mamalia dengan rentang besar, tingkat efisiensi transduksi yang tinggi dan memberikan gejala minimal tubuh (Xu et al., 2019). Namun AV memiliki keterbatasan yaitu: dapat menginfeksi sel *in vivo* dan menyebabkan kelebihan jumlah transgene sehingga menyebabkan reaksi imun yang berlebihan.

#### b) Lentivirus (LV)

Merupakan virus RNA *single-stranded* (ssRNA) berbentuk bola. Contoh virus ini dalam kondisi *wild type* adalah HIV. Lentivirus dapat menjadi vektor baik dalam sel yang aktif membelah maupun tidak. Virus ini merupakan RNA virus. Kapasitas delivery oleh LV sekitar 8kb. Kelebihan LV adalah tidak menimbulkan reaksi imunogenik (Xu et al., 2019). Salah satu metode yang terkenal menggunakan LV adalah *induced Pluripotent Stem Cell* (iPS).

**c) Adeno Associated Virus (AAV)**

AAV merupakan vektor yang paling populer digunakan karena memiliki respon imunogenik yang jauh lebih rendah dibandingkan jenis virus lain. Virus ini merupakan virus *human parvovirus* non-patogenik dan memiliki bentuk ikosahedral. AAV berbeda dengan AV karena virus ini adalah virus helper. Penggunaan virus ini telah disetujui dalam studi klinis (Tabel 2) pada manusia karena profil keamanannya karena tidak menimbulkan mutagenesis dan kemampuan terapeutik yang baik.

Tabel 1. Rangkuman jenis virus sebagai delivery agent CRISPR/Cas9 (Xu et al., 2019).

	Packaging Capacity	Genetic Material	Vector Genome Form	Key Features
AAV	4.7 kb	ssDNA	Mainly episomal	Gene augmentation therapy of small genes in human clinical trials. Gene editing in cells and animal models. Oftentimes, more than one vector is needed due to limited packaging capacity.
AdV	35 kb	dsDNA	Episomal	Cancer treatment in human clinical trials. Proof-of-principle in gene editing in cells and animal models
LV	8 kb	ssRNA	Integrated	Infect dividing cells without transgene dilution. Unwanted off-target effect when combined with CRISPR-Cas9. Mainly used to develop screening tools.

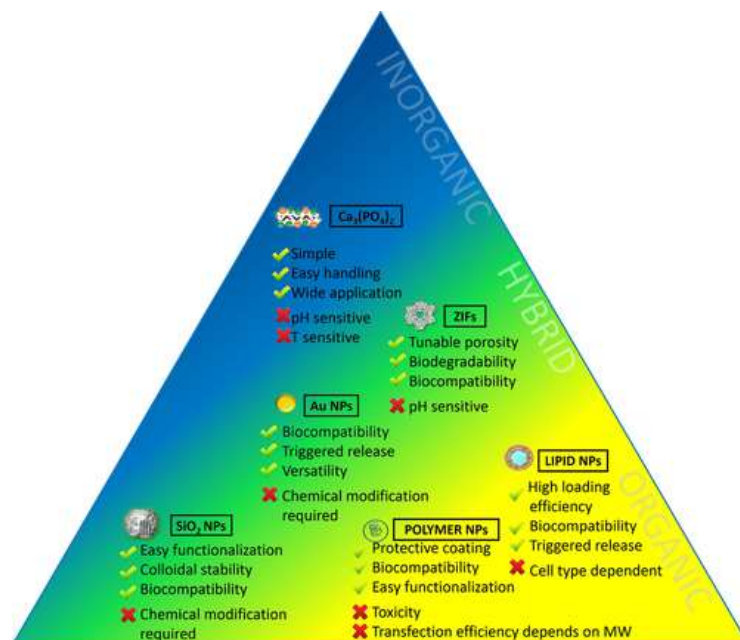
Tabel 2. Penggunaan virus yang telah disetujui dalam studi klinis (Xu et al., 2019).

Condition	Gene product(s)	Phase
CF	CFTR	I/II
Canavan's disease	Aspartoacylase	I
Parkinson's disease	GAD65, GAD65, AADC, neurturin	I
Alzheimer's disease	Beta nerve growth factor	I
Alpha-1-antitrypsin deficiency	AAT	I
Arthritis	TNFR:Fc	I
Leber congenital amaurosis	RPE65	I
Hemophilia B	Factor IX	I
Late infantile neuronal lipofuscinosis	CLN2	I
Muscular dystrophy	Minidystrophin, sarcoglycan	I
Heart failure	SERCA-2a	I
Prostate cancer	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factory	I/II/III
Epilepsy	Neuropeptide Y	I

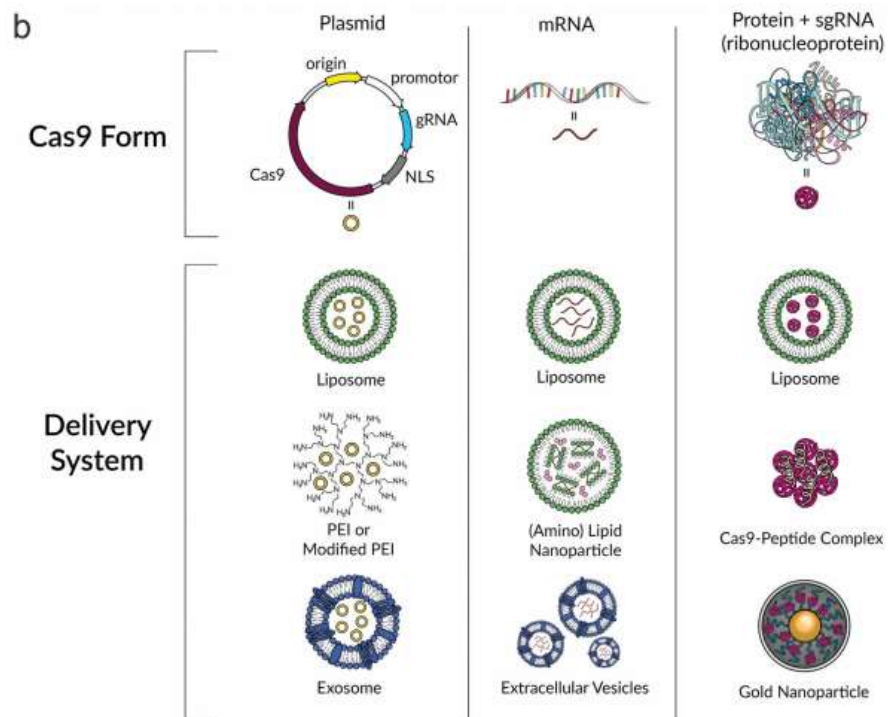
Pada penelitian yang dilakukan oleh Kang *et al*, *delivery sistem* CRISPR/Cas9 menggunakan AAV pada murine cochleae berhasil dilakukan dan mampu mencegah penurunan kemampuan dengar genetik murine (Kang et al., 2020). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Prasad *et al*. sistem delivery Cas9 dengan AAV juga mampu mengubah sel normal epitel lidah mice menjadi lini sel kepala murine dan kanker leher. Hasil penelitian ini digunakan untuk mempelajari tumorigenesis pada mice (Prasad et al., 2019).

## 2.) Penghantaran CRISPR/Cas9 berbasis Nanoteknologi

Penggunaan vektor virus banyak digunakan dalam delivery CRISPR/Cas9 namun memiliki kelemahan yaitu pada biaya yang lebih mahal dan tingkat kerumitan dalam proses pembuatannya dibandingkan dengan carrier lain. Untuk itu dikembangkan agen non viral lain berbasis nanoteknologi. Bahan yang digunakan berbasis biomaterial seperti polimer, lipid, dan peptide. Masing-masing memiliki fitur yang berbeda-beda bergantung pada target yang ingin dituju. Biomaterial dapat dipilih sesuai dengan kebutuhan aplikasi *delivery* (Gambar 7 dan 8) (Eoh & Gu, 2019).

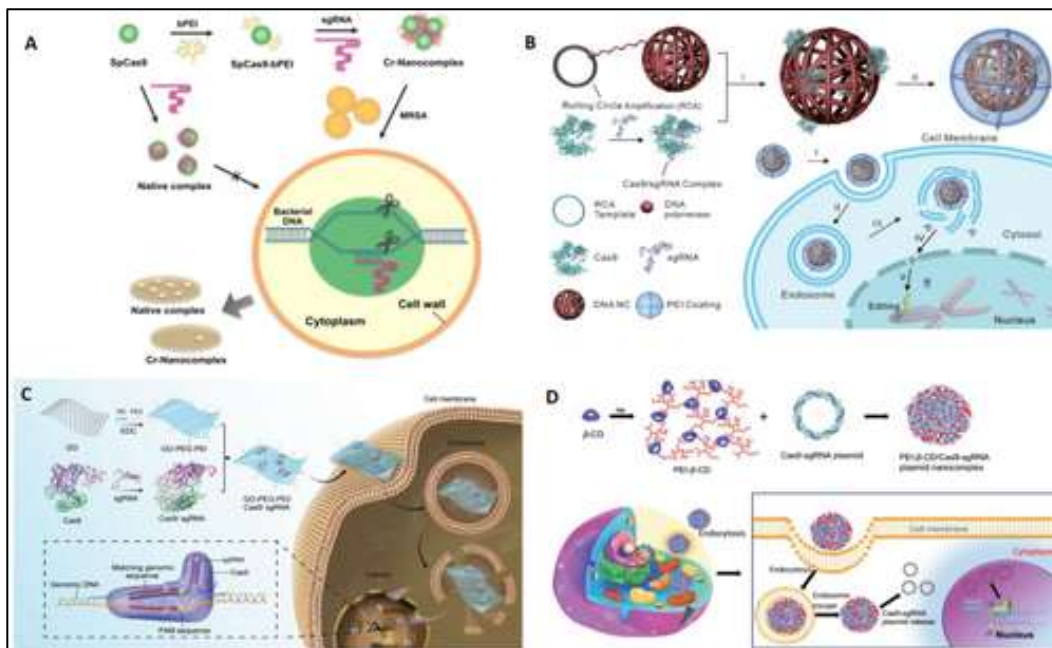


**Gambar 7.** Platform pengiriman CRISPR/Cas9 nonviral dan fitur utamanya (Carboni et al., 2019).



**Gambar 8.** Biomaterial delivery sistem yang digunakan dalam penghantaran sistem CRISPR/Cas9 (Eoh & Gu, 2019).

Cas9 dapat diberikan dalam bentuk plasmid, mRNA, atau protein. Untuk pengiriman plasmid, liposom, PEI, dan eksosom adalah vektor yang paling umum digunakan. Untuk delivery Cas9 mRNA, digunakan liposom sebagai agen yang paling utama tetapi biomaterial lainnya seperti nanopartikel lipid-amino dan vesikel ekstraseluler juga dapat digunakan. Untuk Cas9 dalam bentuk protein dan sgRNA delivery dilakukan oleh liposom, kompleks Cas9-Peptide dan nanopartikel emas. Berikut yang disebutkan adalah delivery system yang paling umum dan paling aman digunakan (Deng et al., 2019) (Eoh & Gu, 2019).



Gambar 9.

Platform polimer. a) nanocomplex CRIS-derivatisasi polimer untuk menargetkan patogen bakteri dan resistensi antibiotik. b) Desain sistem delivery CRISPR-Cas9 berbasis nanoclew DNA. c) Ilustrasi pengiriman Cas9/sgRNA yang dimediasi dengan graphene oxide. d) Ilustrasi plasmid CRISPR/Cas9 yang dimediasi polimer kationik. (Carboni et al., 2019)

### 3.) Nanopartikel sebagai *carrier* Cas9

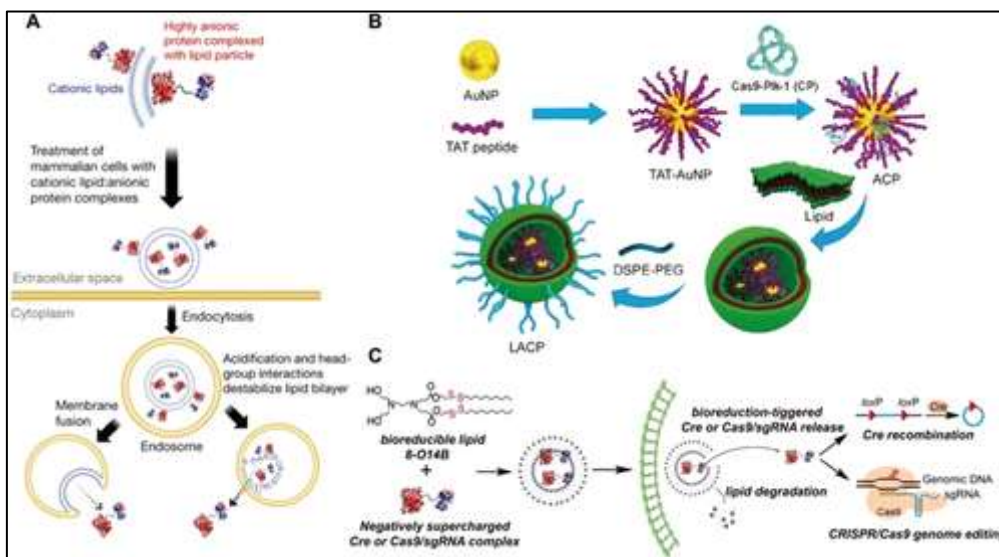
#### a) *Polymer based*

Keuntungan enkapsulasi polimer (PE) adalah perlindungan entitas selama jalur degradasi in vivo. Selain itu, permukaan pembawa polimer dapat memiliki fungsi entitas aktif yang secara khusus dapat berinteraksi dengan reseptor permukaan dari tipe sel yang ditargetkan. sistem pengeditan genom CRISPR / Cas9 protein / sgRNA dan CRISPR/Cas9 platform plasmid keduanya dapat dikirimkan oleh PE (Carboni et al., 2019). Berbagai teknik delivery menggunakan polimer dapat dilihat pada Gambar 9.

#### b) *Lipid based*

Membran sel mewakili penghalang fisik yang melindungi organel intraseluler dan informasi genetik dari kerusakan eksternal. Membran sel terutama terdiri dari glikoprotein

intramembran, kolesterol, dan lipid dan telah diketahui dengan baik bahwa komunikasi ekstraseluler dan transportasi ekstra / intraseluler dari bahan-bahan penting untuk bertahan hidup sel dimediasi oleh pembawa berbasis lipid. Ini mendorong munculnya nanocarrier buatan berbasis lipid untuk internalisasi obat dan gen sel yang efisien berdasarkan liposom dan nanomaterial lipidoid. Dalam dekade terakhir, perbaikan pada desain molekuler lipid kationik dan pembangunan perpustakaan kombinatorial nanopartikel seperti lipid memungkinkan pengembangan platform baru untuk transfeksi DNA dan RNA yang efisien. Teknik yang sama digunakan untuk pengiriman gen kemudian dieksplorasi untuk pengiriman CRISPR/Cas9 (Gambar 10)



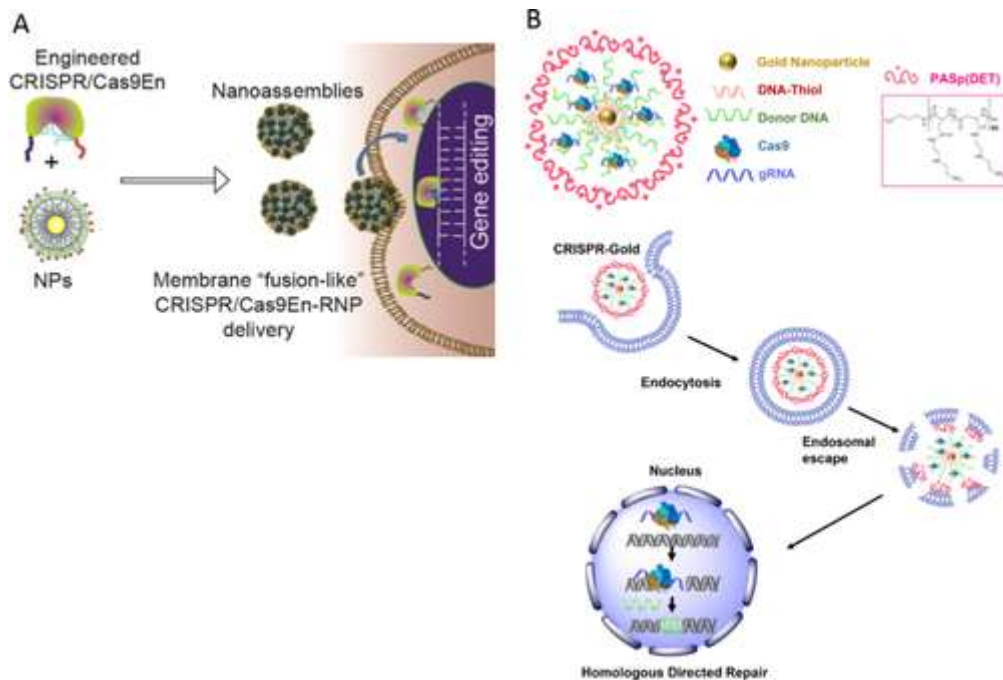
**Gambar 10.** Platform berbasis lipid. a) Mekanisme pengiriman CRISPR / Cas9 yang dimediasi oleh liposom kationik. b) Nanoassembly dari sistem nanopartikel encapsulated gold-lipid CRISPR / Cas9. c) Desain molekuler lipid bioreducible, self-assembly dengan CRISPR / Cas9 dan mekanisme pengirimannya. (Carboni et al., 2019)

### c) Gold based

Nanomaterial berbasis emas banyak digunakan dalam pengobatan nano, karena kemungkinan mensintesis berbagai besar struktur nano yang berbeda dan sifat optik yang beragam, termasuk photoluminescence, resonansi plasmon permukaan yang terlokalisasi, dan hamburan raman permukaan yang ditingkatkan (SERS) (Carboni et al., 2019). Aplikasi utama mereka dalam pengobatan nano bergantung terutama pada penginderaan optik, pencitraan optik, obat, pengiriman protein dan gen. Selain itu, bahan nano emas itu sendiri



dapat digunakan sebagai agen terapi kanker, khususnya, aplikasi mereka bergantung pada terapi fototermal dan fotodinamik (Carboni et al., 2019).



**Gambar 11.** Platform berbasis emas. a) Nanoassembly dari ArgNPs dan CRISPR/Cas9-E-tag (En) dan mekanisme delivery. b) *Nanoassembly* dari sistem lipid-encapsulated gold nanoparticles-CRISPR/Cas9 (Carboni et al., 2019)

Nanopartikel emas telah banyak digunakan sebagai kendaraan transfeksi dan pengiriman protein, karena kemampuan mereka untuk mengkonjugasi berbagai jenis protein dan DNA secara bersamaan oleh interaksi elektrostatis non-spesifik dan fleksibilitasnya diinternalisasi dalam tipe sel yang berbeda. Fleksibilitas ini menjadikan mereka kandidat yang menarik untuk pengembangan platform pengiriman CRISPR/Cas9 (Gambar 11).

Ketika kita menarget satu gen sel diploid, terdapat 4 hasil keluaran yang memungkinkan terjadi (Gambar 6). Sehingga untuk memastikan apakah berhasil terbentuk modifikasi gen editing, dilakukan pengecekan/validasi. Terdapat berbagai teknik validasi, yaitu: 1) *The mismatch cleavage assay*, 2) *Sanger amplicon sequencing*, 3) *Next generation amplicon sequencing* (ABM, 2018).

## 5. TANTANGAN DAN PELUANG MASA DEPAN

Berdasarkan pemaparan yang telah dilakukan, *gene editing* menggunakan teknologi CRISPR/Cas9 memiliki masa depan yang menjanjikan untuk menjadi alat terapi penyakit genetik maupun akibat mutasi. Tetapi timbul perdebatan etik di kalangan peneliti dan akademisi tentang apakah alat ini akan mengubah keseimbangan ekosistem jika diaplikasikan untuk memusnahkan sesuatu. Misalnya kita memodifikasi DNA nyamuk penyebab malaria (*Anopheles sp*) atau demam berdarah (*Aedes aegypti*) sehingga menyebabkan nyamuk tersebut punah. Tentu tindakan ini akan menimbulkan dampak pada individu pemakan nyamuk seperti cicak, katak, ikan kecil menjadi ikut punah karena tidak memiliki nyamuk sebagai sumber makanan (Ledford & Callaway, 2015).

Kekhawatiran lain juga datang dari pengeditan genom manusia. Peneliti saat ini sudah sampai dalam tahapan pengeditan genom manusia pada level embrio. Pengeditan manusia akan juga berdampak kepada generasi selanjutnya (Krishan et al., 2016). Pengeditan ini menimbulkan permasalahan etik apakah pembentukan manusia dengan teknik ini akan menentang alam maupun takdir Tuhan. Manusia yang tadinya dilahirkan dengan keanekaragaman seperti warna kulit, struktur dan warna rambut, warna mata akan mengarah pada satu jalan saja karena mengacu pada gen-gen terbaik saja yang diinsersikan pada tubuh individu tersebut. Penyuntingan embrio hanya dapat dibenarkan secara etis dalam kasus yang menghasilkan manfaat jelas lebih besar daripada risikonya. Perubahan gen pada hampir semua jenis spesies haruslah membawa kebaikan bagi manusia dan seluruh makhluk hidup di bumi.

## SIMPULAN

Berdasarkan penjelasan yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa CRISPR/Cas9 merupakan teknik *gene editing* yang diadaptasi dari sistem imun prokariotik. CRISPR/Cas9 yang telah dimodifikasi akan mampu memotong gen target tertentu yang diinginkan sesuai gDNA yang kita berikan. Begitu masuk ke dalam nukleus, kompleks yang dihasilkan akan mengunci ke urutan singkat yang dikenal sebagai *protospacer adjacent motif* (PAM). Cas9 akan meng-unzip DNA dan mencocokkannya dengan RNA targetnya. Jika perpaduannya cocok, Cas9 akan memotong DNA secara *double strand break*. Sistem delivery CRISPR/Cas9 dapat dilakukan menggunakan agen viral dan non viral yang dimodifikasi sedemikian hingga sehingga Cas9 dapat masuk ke dalam sel dan melakukan gen editing. Prospek CRISPR/Cas9 sangat menjanjikan di masa depan sebagai upaya terapi penyakit kelainan genetik dan terapi



kanker. Namun teknik ini tidak dapat secara bebas kemudian digunakan untuk mengedit DNA manusia dan karena bertentangan dengan etik

## DAFTAR PUSTAKA

- ABM. (2018). *CRISPR Course*. Applied Biological Material. <https://info.abmgood.com/crispr>
- Addgene. (n.d.). *Panduan CRISPR*. Addgene.
- AddGene. (n.d.). *CRISPR Guide*. <https://www.addgene.org/guides/crispr/>
- Carboni, V., Maaliki, C., Alyami, M., Alsaiani, S., & Khashab, N. (2019). Synthetic Vehicles for Encapsulation and Delivery of CRISPR/Cas9 Gene Editing Machinery. *Advanced Therapeutics*, 2(4), 1800085. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800085>
- Cong, L., Ran, F. A., David, C., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *SCIENCE*, 339(February), 819–824.
- Deng, H., Huang, W., & Zhang, Z. (2019). Nanotechnology based CRISPR/Cas9 system delivery for genome editing: Progress and prospect. *Nano Research*, 12(10), 2437–2450. <https://doi.org/10.1007/s12274-019-2465-x>
- Eissenberg, J. C. (2021). *In Our Image : The Ethics of CRISPR Genome Editing*. 1–7.
- Eoh, J., & Gu, L. (2019). Biomaterials as vectors for the delivery of CRISPR-Cas9. *Biomaterials Science*, 7(4), 1240–1261. <https://doi.org/10.1039/c8bm01310a>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Kang, W., Zhao, X., Sun, Z., Dong, T., Jin, C., Tong, L., Zhu, W., Tao, Y., & Wu, H. (2020). Adeno-associated virus vector enables safe and efficient Cas9 activation in neonatal and adult Cas9 knockin murine cochleae. *Gene Therapy*. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-0124-1>
- Krishan, K., Kanchan, T., & Singh, B. (2016). Human Genome Editing and Ethical Considerations. *Science and Engineering Ethics*, 22(2), 597–599. <https://doi.org/10.1007/s11948-015-9675-8>
- Ledford, H., & Callaway, E. (2015). “Gene drive” mosquitoes engineered to fight malaria. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature.2015.18858>
- Prasad, M., Jagadeeshan, S., Scaltriti, M., Allon, I., & Elkabets, M. (2019). In vitro establishment of a genetically engineered murine head and neck cancer cell line using an adeno-associated Virus-Cas9 system. *Journal of Visualized Experiments*, 2020(155), 1–11. <https://doi.org/10.3791/60410>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Schuh, R. S., de Carvalho, T. G., Giugliani, R., Matte, U., Baldo, G., & Teixeira, H. F. (2018). Gene editing of MPS I human fibroblasts by co-delivery of a CRISPR/Cas9 plasmid and a donor oligonucleotide using nanoemulsions as nonviral carriers. *European Journal of*

- Timin, A. S., Muslimov, A. R., Lepik, K. V., Epifanovskaya, O. S., Shakirova, A. I., Mock, U., Riecken, K., Okilova, M. V., Sergeev, V. S., Afanasyev, B. V., Fehse, B., & Sukhorukov, G. B. (2018). Efficient gene editing via non-viral delivery of CRISPR–Cas9 system using polymeric and hybrid microcarriers. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.001>
- Wan, T., Niu, D., Wu, C., Xu, F. J., Church, G., & Ping, Y. (2019). Material solutions for delivery of CRISPR/Cas-based genome editing tools: Current status and future outlook. *Materials Today*, 26(June), 40–66. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2018.12.003>
- Xu, C. L., Ruan, M. Z. C., Mahajan, V. B., & Tsang, S. H. (2019). Viral delivery systems for crispr. *Viruses*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/v11010028>