

# REVOLUSI TERAPI GENETIK : ERA BARU DALAM MENGATASI PENYAKIT PERNAPASAN DENGAN CRISPR-CAS9

Luthfiya Nur Fadhila<sup>1</sup>, I Kadek Ari Sanjaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Mataram, Mataram

## Korespondensi:

Luthfiya Nur Fadhila

## Email Korespondensi:

fiyadila8@gmail.com

## Riwayat Artikel

Diterima 15-07-2024

Selesai revisi: 02-09-2024

## DOI :

10.53366/jimki.v10i3.762

**Pendahuluan:** Penyakit pernapasan merupakan beban kesehatan global yang signifikan, mempengaruhi kualitas hidup jutaan orang di seluruh dunia. Terapi genetik dengan menggunakan teknologi CRISPR-Cas9 telah menjadi perubahan paradigma dalam pengobatan penyakit pernapasan. Artikel ini menyajikan tinjauan literatur yang komprehensif tentang penggunaan CRISPR- Cas9 dalam mengatasi penyakit pernapasan, termasuk fibrosis kistik, penyakit paru obstruktif kronik (PPOK), dan SARS-CoV. **Metode:** Metode penelusuran literatur dilakukan melalui database ilmiah seperti PubMed, Google Scholar, dan Scopus. Hasilnya mengungkapkan bahwa CRISPR-Cas9 dapat digunakan untuk mengedit gen terkait penyakit pernapasan, mengurangi peradangan, produksi lendir berlebihan, dan kerusakan jaringan paru serta mendeteksi adanya keberadaan penyakit tersebut. **Pembahasan:** Pembahasan menyoroti efektivitas CRISPR-Cas9 berdasarkan studi eksperimental pada hewan model dan percobaan *in vitro*. Tantangan yang perlu diatasi meliputi efisiensi dan presisi teknologi, keamanan jangka panjang, dan pengiriman yang efektif. **Simpulan:** Potensi CRISPR-Cas9 sebagai terapi penyakit pernapasan dan menekankan perlunya penelitian lebih lanjut dan pengembangan teknologi untuk mengoptimalkan efektivitas dan keamanan terapi ini.

**Kata kunci:** CRISPR-Cas9, *editing* gen, penyakit pernapasan dan terapi genetik

e-ISSN : 2721-1924

ISSN : 2302-6391

# GENETIC THERAPY REVOLUTION: A NEW ERA IN TREATING RESPIRATORY DISEASES WITH CRISPR-CAS9

## ABSTRAK

**Introduction:** Respiratory diseases are a significant global health burden, affecting the quality of life of millions of people worldwide. Gene therapy using CRISPR-Cas9 technology has become a paradigm shift in the treatment of respiratory diseases. This article presents a comprehensive literature review on the use of CRISPR-Cas9 in treating respiratory diseases, including cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and SARS-CoV. **Methods:** Literature search methods were performed through scientific databases such as PubMed, Google Scholar, and Scopus. The results revealed that CRISPR-Cas9 can be used to edit genes associated with respiratory diseases, reduce inflammation, excessive mucus production, and lung tissue damage, and detect the presence of these diseases. **Discussion:** The discussion highlights the effectiveness of CRISPR-Cas9 based on experimental studies in animal models and in vitro experiments. Challenges that need to be overcome include the efficiency and precision of the technology, long-term safety, and effective delivery. **Conclusion:** The potential of CRISPR-Cas9 as a therapy for respiratory diseases and emphasizes the need for further research and technology development to optimize the effectiveness and safety of this therapy.

**Keywords:** CRISPR-Cas9, gene editing, respiratory diseases and gene therapy

## 1. PENDAHULUAN

Penyakit pernapasan merupakan masalah kesehatan global yang mempengaruhi kualitas hidup dan kesejahteraan populasi<sup>1</sup>. Penyakit seperti penyakit paru obstruktif kronik (PPOK), asma, fibrosis kistik, dan sars-cov merupakan beberapa contoh penyakit pernapasan yang memiliki dampak serius pada fungsi pernapasan dan kualitas hidup pasien<sup>1</sup>. Pengobatan konvensional yang ada saat ini, seperti obat-obatan dan terapi rehabilitasi, telah memberikan manfaat signifikan bagi pasien penyakit pernapasan. Namun, metode pengobatan yang ada masih memiliki keterbatasan dalam hal efektivitas dan dampak jangka panjang<sup>1</sup>. Dalam beberapa tahun terakhir, inovasi terbaru dalam bidang terapi genetik telah membuka peluang baru dalam pengobatan penyakit pernapasan<sup>1</sup>. Teknologi terapi gen seperti CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated protein 9*) menawarkan potensi yang luar biasa dalam mengubah secara spesifik gen yang terlibat dalam patogenesis penyakit pernapasan<sup>2</sup>. CRISPR-Cas9 adalah sistem penyuntingan gen yang revolusioner yang memungkinkan para ilmuwan untuk mengedit genom secara spesifik dengan menghilangkan, menambahkan, atau mengubah sekuensi DNA<sup>2</sup>.

Tulisan ini akan menjadi wadah kami mengeksplorasi dan menganalisis penelitian terbaru yang bertujuan untuk memaparkan potensi menjanjikan yang dimiliki oleh teknologi CRISPR-Cas9 yang dalam penggunaannya mengatasi beberapa penyakit pernafasan paru,

mulai dari umum terjadi pada masyarakat seperti penyakit paru obstruktif kronik (PPOK) dan fibrosis kistik hingga yang akhir-akhir ini menjadi pusat perhatian seluruh dunia, yakni SARS-CoV<sup>1,3</sup>.

Berdasarkan beberapa literatur dan penelitian, teknologi ini mengedit gen terkait penyakit pernapasan dengan mengurangi peradangan dalam saluran pernapasan, menghambat produksi lendir berlebihan, dan memperbaiki kerusakan jaringan paru<sup>1,2</sup>. Studi eksperimental menggunakan hewan model dan percobaan *in vitro* telah memberikan bukti awal tentang efektivitas CRISPR-Cas9 dalam mengatasi penyakit pernapasan<sup>4</sup>.

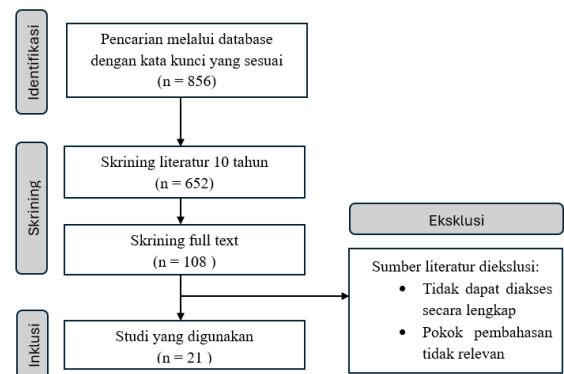
Meskipun begitu, terdapat tantangan dan kendala yang harus diatasi dalam mengimplementasikan CRISPR-Cas9 sebagai terapi penyakit pernapasan<sup>1,2,4</sup>. Beberapa tantangan yang perlu diperhatikan meliputi efisiensi dan presisi teknologi, keamanan jangka panjang, dan pengiriman yang efektif ke target yang tepat<sup>1,2,4</sup>.

Tinjauan ini akan mencakup metode penelusuran literatur yang digunakan dan hasil yang ditemukan, serta mempertimbangkan tantangan dan peluang yang ada dalam pengembangan terapi penyakit pernapasan menggunakan CRISPR-Cas9 sehingga diharapkan penelitian ini dapat memberikan kontribusi penting dalam mengoptimalkan efektivitas dan keamanan terapi ini serta membuka jalan bagi pengembangan solusi inovatif dalam mengatasi penyakit pernapasan yang mempengaruhi populasi global.

## 2. METODE

Untuk melakukan tinjauan literatur ini, beberapa pendekatan sistematis dalam pencarian dan seleksi artikel yang relevan telah dilakukan oleh peneliti. Langkah-langkah yang dilakukan peneliti meliputi identifikasi basis data, pemilihan kata kunci, seleksi artikel, dan publikasi terbaru. Pertama, kami melakukan pencarian dalam beberapa basis data ilmiah terpercaya, seperti PubMed, Google Scholar, dan Scopus. Basis data tersebut dipilih karena mereka menyediakan akses ke berbagai publikasi ilmiah di berbagai bidang. Kedua, kombinasi kata kunci yang relevan dengan topik dilakukan peneliti untuk pencarian yang komprehensif. Kata kunci yang digunakan mencakup "CRISPR-Cas9", "terapi genetik", "editing gen", "penyakit pernapasan", "penyakit paru", "fibrosis kistik", "PPOK" dan "SARS-CoV". Kombinasi kata kunci ini membantu peneliti sehingga didapatkan artikel-artikel yang relevan dengan penggunaan CRISPR-Cas9 dalam terapi penyakit pernapasan. Ketiga, setelah melakukan pencarian dengan kata kunci, dilakukan evaluasi setiap artikel yang ditemukan untuk menentukan kelayakan dan relevansinya dengan topik penelitian. Artikel-artikel penelitian eksperimental, penelitian klinis, ulasan literatur, dan artikel tinjauan yang terkait dengan penggunaan CRISPR-Cas9 dalam terapi penyakit pernapasan kemudian dipertimbangkan. Dengan menggunakan langkah-langkah di atas, diharapkan peneliti dapat memastikan kelengkapan dan akurasi tinjauan literatur tentang

penggunaan CRISPR-Cas9 dalam terapi penyakit pernapasan.



## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### Potensi CRISPR-Cas9 dalam Terapi Penyakit Pernapasan

Cystic fibrosis (CF) atau fibrosis kistik terjadi akibat adanya gangguan monogenik resesif yang disebabkan oleh ratusan mutasi pada *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR) <sup>5</sup>. CRISPR-Cas9 dapat digunakan untuk mengoreksi mutasi pada CFTR tersebut dengan menambahkan promotor asing untuk memproduksi mRNA CFTR fungsional sehingga dapat mengembalikan fungsi CFTR <sup>6</sup>. Beberapa studi eksperimental pada model hewan menunjukkan bahwa CRISPR-Cas9 mendorong perkembangan solusi terapi gen dan mempercepat produksi model sel (sel isogenik) dan hewan percobaan dengan CF sehingga mempermudah uji terapi sebelum dicoba ke manusia <sup>6</sup>.

Disamping itu, pada PPOK, CRISPR-Cas9 dapat digunakan untuk perbaikan awal epitel saluran napas dengan mengamati efek gen HOXA1 yang berperan dalam migrasi dan proliferasi sel epitel saluran napas <sup>7</sup>. Pada studi hewan

model, CRISPR digunakan sebagai alat bantu pembuatan tikus dengan knockout langerin untuk menguji potensi L4 sebagai terapi antiinflamasi baru yang lebih efektif pada PPOK dibandingkan kortikosteroid yang lebih dulu digunakan<sup>8</sup>.

Penerapan Teknologi CRISPR/Cas dalam SARS-CoV-2 memiliki keunggulan terutama di bidang diagnostiknya dibandingkan dengan *tools* lainnya<sup>3,9,10</sup>. CRISPR-Cas9 dinilai lebih efisien dalam mendeteksi SARS-CoV karena tidak memerlukan instrumen yang berukuran besar atau proses yang berbelit-belit, serta memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik, mudah digunakan, dan biaya yang diperlukan lebih murah dibandingkan PCR<sup>3,9,10</sup>.

#### **Tantangan dalam Mengimplementasikan Terapi CRISPR-Cas9 untuk Penyakit Pernapasan**

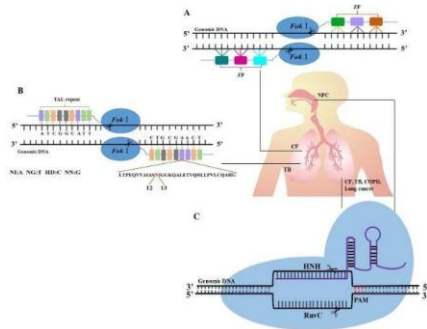
Dilihat dari segi efisiensi dan spesifisitas, penggunaan CRISPR-Cas9 masih menjadi perhatian utama. Hal ini perlu dilakukan untuk mencegah efek di luar target seperti mutasi yang tidak diinginkan pada target utama yang dapat menyebabkan modifikasi yang tidak diinginkan baik di dalam maupun di luar target<sup>2,4,11</sup>. Pada aspek keamanan, diperlukan penelitian lebih lanjut dan upaya untuk meminimalkan efek off-target dan memastikan keamanan jangka panjang dalam setiap desain pengeditan gen sehingga dapat meminimalisir efek samping yang tidak diinginkan dari CRISPR-Cas9 pada manusia<sup>4,12,13</sup>. Selain itu, metode pengiriman lokal untuk terapi gen menghadapi tantangan dalam

mencapai target, terutama pada penyakit pernapasan, disebabkan oleh kompleksitas struktural dan fungsional paru-paru serta keberadaan sel-sel imun yang unik<sup>4,14,15</sup>. Sehingga untuk implementasi terapi CRISPR-Cas9 dalam penyakit pernapasan. Pengembangan sistem pengiriman yang efektif dan aman, baik dalam bentuk penambahan gen maupun elemen pengeditan gen, dengan tujuan utama mengatasi berbagai hambatan fisik dan biologis yang disebabkan oleh struktur paru-paru dan mekanisme pertahanan imun untuk mengimplementasikan terapi CRISPR-Cas9 dalam penyakit pernapasan<sup>4</sup>.

#### **Mekanisme CRISPR-Cas9 pada fibrosis kistik**

Fibrosis kistik adalah gangguan resesif autosom akibat mutasi pada gen *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) yang mengkodekan protein saluran klorida untuk mengatur transportasi klorida pada epitel yang menghasilkan lendir kental yang menyebabkan gagal napas serta penyumbatan dan gangguan sistemik sehingga terjadi ketidaknormalan lapisan cairan permukaan saluran napas yang mengganggu mekanisme pembersihan mukosiliar dan menyebabkan infeksi bakteri<sup>1,4,5</sup>. Bahkan hingga kini, belum ada obat yang menyembuhkan CF, dan transplantasi paru-paru sering menjadi satu-satunya pilihan

ketika penyakit memburuk <sup>4</sup>.



**Gambar 1.** Menggambarkan tiga alat pengeditan gen utama yakni ZFN (A), TALEN (B), dan CRISPR/Cas9 (C) yang masing-masing menggunakan domain pengikat DNA dan domain pemotong untuk mengenali serta memotong urutan DNA spesifik melalui mekanisme yang berbeda sehingga dapat diubah sesuai kebutuhan <sup>1</sup>.

Para peneliti sebelumnya telah mencoba menyuntikkan plasmid atau vektor virus yang mengandung cDNA yang mengodekan CFTR ke paru-paru, tetapi hanya terekspresi secara sementara serta integrasi menggunakan virus memunyai resiko integrasi non-spesifik ke lokus genomik lainnya <sup>1</sup>. Disamping itu, terapi gen yang menggantikan salinan gen CFTR yang rusak dengan gen yang berfungsi telah dikembangkan <sup>4</sup>. CRISPR/Cas9 berhasil memperbaiki mutasi F508 pada sel punca saluran napas pasien CF dengan penggunaan metode HR (*homologous recombination*) dengan fragmen pendek yang mengintroduksikannya ke paru-paru tikus normal sehingga dinilai dapat mengembalikan fungsi CFTR <sup>1,4</sup>. Pengiriman Cas9 mRNA, sgRNA, dan template ssDNA donor secara efisien tersebut dipengaruhi oleh peningkatan Lipid Nanoparticles (SORT LNPs) yang secara selektif

menargetkan paru-paru sehingga memungkinkan perbaikan gen secara presisi <sup>16</sup>. Namun, pengembangan metode HR dalam memperbaiki CFTR berjalan lambat hingga ditemukannya teknik nuklease buatan <sup>1</sup>. Setelah dilakukan beberapa penghapusan gen pada eksperimen sebelumnya, teknologi CRISPR-Cas9 digunakan untuk mengeliminasi ekson 2 dari gen CFTR pada sel Calu-3 serta sel epitel saluran napas primer manusia (HAEC) (**Gambar 1**) <sup>1</sup>. Penghapusan ini menyebabkan penurunan sekresi transepitelial, dan sel-sel yang kehilangan gen CFTR menunjukkan respons yang kuat terhadap inhibitor CFTR. Teknik CRISPR-Cas9 juga berhasil memperbaiki mutasi F508del pada gen CFTR yang terdapat dalam sel punca pluripoten terinduksi (iPSC) milik pasien fibrosis kistik dengan kondisi homozigot F508del (**Gambar 1**)<sup>1</sup>. Setelah diperbaiki, iPSC tersebut mampu berdiferensiasi menjadi sel epitel saluran napas dewasa (AEC), yang kemudian berhasil mengembalikan ekspresi dan fungsi normal dari protein CFTR <sup>1</sup>.

Selain terapi penggantian gen, teknik pengeditan gen menggunakan CRISPR juga telah digunakan untuk memperbaiki mutasi W1282X yang merupakan Salah satu mutasi paling umum adalah W1282X, yang menyebabkan penghentian penerjemahan protein lebih awal <sup>4,17</sup>. Sistem Cas9 kemudian membuat "double-strand break" (DSB) di dekat situs mutasi. DSB tersebut kemudian memicu mekanisme perbaikan DNA sel dengan memanfaatkan template donor ssODN (single-stranded oligodeoxynucleotide) yang membawa versi sehat dari sekuens DNA CFTR untuk memperbaiki mutasi melalui mekanisme HDR

(*homology-directed repair*), sehingga mengembalikan ekspresi gen CFTR mendekati atau setara dengan kondisi normal<sup>17</sup>. Dalam penelitian terbaru, pengeditan genom yang presisi dan serbaguna tanpa memerlukan pemutusan untai ganda DNA (*double-stranded breaks*) telah dilakukan dengan menggunakan Prime editing (PE)<sup>18</sup>. Sistem PE secara efisien memperbaiki mutasi F508del pada gen CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) manusia dengan menghasilkan editing off-target yang minimal dan meminimalisir resiko mutasi yang tidak diinginkan karena sistem ini tidak menggunakan DSB yang membiarkan perbaikan sel secara mandiri<sup>18</sup>.

### Mekanisme CRISPR-Cas9 pada PPOK

Penyakit paru obstruktif kronis atau PPOK merupakan salah satu penyakit paru yang utamanya terdiri dari bronkiolitis obstruktif kronis dan emfisema<sup>1,4</sup>. PPOK umumnya ditandai dengan adanya penyumbatan aliran udara progresif seperti obstruksi saluran napas yang progresif dan ireversibel, fibrosis, penyempitan dan perombakan saluran napas kecil, serta kerusakan dinding alveoli dan diikuti peningkatan respon inflamasi pada paru-paru<sup>4</sup>. Meskipun merokok umumnya diakui sebagai faktor risiko utama dalam perkembangan COPD, paparan iritan lingkungan dan kecenderungan genetik dalam keluarga juga berperan dalam perkembangannya<sup>1</sup>. *Growth differentiation factor 15* (GDF15), merupakan super faktor pertumbuhan transforming growth factor- $\beta$  terlihat mengalami peningkatan pada lapisan epitel

saluran napas pada individu perokok aktif dan perokok pasif<sup>1</sup>.

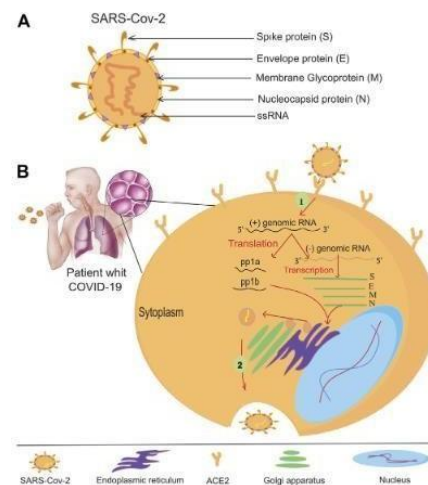
CRISPR-Cas9 dalam hal ini mengemas dan mengincar ekson 1 sel epitel trakeobronkial manusia yang terinfeksi oleh lentivirus dari gen GDF15 sehingga menyebabkan terjadinya penghapusan dan penambahan kecil dalam ekson. Satu dari gen GDF15, yang berdampak pada penurunan yang signifikan dalam jumlah mRNA, protein, dan penuaan selular GDF15<sup>1</sup>. Pada penelitian terbaru, dilakukan uji sel basal saluran napas terutama pada HOXA1<sup>7</sup>. Gen tersebut memiliki peran dalam perkembangan dan diketahui terlibat dalam proliferasi dan diferensiasi sel punca hematopoietik, tetapi perannya dalam migrasi dan proliferasi sel epitel saluran napas belum diketahui<sup>7</sup>. Selain itu, pada pasien PPOK, terlihat penurunan ekspresi mRNA HOXA1 sebanyak 2–3 log dibandingkan sel normal pada sel basalnya<sup>7</sup>. Melalui CRISPR Cas9 fungsi HOXA1 dalam sel epitel bronkial mulai dieksplorasi fungsinya dengan membuat lini sel epitel bronkial knockout HOXA1<sup>7</sup>. Hasil temuan mendapati bahwa HOXA1 berkontribusi terhadap proliferasi sel epitel bronkial, sebagaimana diamati juga pada berbagai lini sel kanker sehingga, besar kemungkinan HOXA1 juga memengaruhi proliferasi sel basal pada PPOK<sup>7</sup>. Hal ini membuat CRISPR-Cas9 diharapkan dapat digunakan untuk perbaikan awal epitel saluran napas pada pasien PPOK<sup>7</sup>. Selain dapat berpotensi menjadi alternatif langsung, CRISPR Cas9 digunakan sebagai alat bantu pembuatan model tikus knockout langerin<sup>8</sup>. Langerin sendiri adalah reseptor C-type lectin

yang terlibat dalam respons imun dan inflamasi, yang berperan penting dalam patogenesis PPOK<sup>8</sup>. Melalui model hewan tersebut, peran L4, disakarida berbasis keratan sulfat, dapat diketahui berfungsi dalam mengurangi gejala emphysema dan inflamasi paru-paru melalui jalur langerin<sup>8</sup>. Hal ini menegaskan bahwa CRISPR-Cas9 sebagai alat untuk mengeksplorasi peran molekuler langerin dalam PPOK dapat membuktikan pentingnya langerin dalam mekanisme terapeutik L4 terhadap PPOK<sup>8</sup>.

### Mekanisme CRISPR-Cas9 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 menyebabkan sindrom pernapasan akut berat yang dimulai di Wuhan, dan telah menjadi wabah yang menyebar dengan cepat yang kita kenal sebagai COVID-19<sup>11</sup>. Famili coronavirus (CoVs) mengandung berbagai jenis virus yang dapat menyebabkan penyakit pada burung, hewan ternak, dan manusia<sup>11</sup>. Terdapat empat protein struktural utama dalam coronavirus, yaitu Membran (M), spike (S), selubung (E), dan protein nukleokapsid (N) (**Gambar 2**)<sup>11</sup>. Spike berikatan dengan reseptor sel inang untuk memasukkan virus ke dalam sel. Peneliti telah menemukan reseptor coronavirus pada manusia, seperti enzim konversi angiotensin 2 (ACE2) untuk SARS-CoV dan HCoV-NL63, atau aminopeptidase N (APN) untuk HCoV-229E<sup>11</sup>. ACE2, APN, dan DDP4 adalah enzim ektopeptidase dengan fungsi yang berbeda yang diekspresikan pada permukaan berbagai jenis sel, termasuk sel-sel di saluran pernapasan manusia<sup>11</sup>. SARS-CoV-2 umumnya menginfeksi sel epitel di

paru-paru, tetapi juga dapat menyerang makrofag dan sel dendritik<sup>11</sup>. Metode diagnostik yang menggunakan CRISPR-Cas9 memiliki tingkat kepekaan dan spesifisitas yang setara dengan PCR konvensional<sup>11</sup>. Namun, biayanya lebih terjangkau karena tidak memerlukan teknologi yang rumit atau mahal<sup>11</sup>. Berkat sensitivitas, spesifisitas, dan keandalannya yang tinggi, metode deteksi asam nukleat yang diarahkan oleh RNA menggunakan nuklease CRISPR-Cas9 baru-baru ini telah menunjukkan potensi besar dalam pengembangan teknologi diagnostik molekuler generasi mendatang, baik dari segi keefisienan karena tidak memerlukan peralatan besar maupun prosedur yang rumit, akurasi yang lebih baik, kemudahan penggunaan, hingga biaya yang lebih terjangkau<sup>3,9,10,19</sup>



**Gambar 2.** Virus corona dan siklus hidupnya

Untuk meningkatkan tingkat sensitivitas dan spesifisitas, para peneliti telah mulai memanfaatkan teknologi yang baru dikembangkan, yaitu Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) dan protein

terkaitnya (CRISPR/Cas), salah satunya Cas9 sebagai alat untuk deteksi cepat terhadap COVID-19<sup>19</sup>. Penggunaan dua crRNA pada CRISPR Cas9 telah meningkatkan tingkat sensitivitas dan juga meningkatkan ketahanan terhadap perubahan RNA virus<sup>11</sup>. Sejumlah perbaikan telah dilakukan untuk meningkatkan sensitivitas dalam eksperimen deteksi SARS-CoV-2 berbasis CRISPR<sup>11</sup>. Perbaikan tersebut termasuk melakukan modifikasi pada crRNA, menggunakan partikel-partikel kecil untuk meningkatkan kecepatan reaksi, menyesuaikan rasio reagen, meningkatkan konsentrasi reagen melalui fokus yang cermat, serta meningkatkan input RNA selain hanya jumlah RNA yang digunakan<sup>11</sup>.

Beberapa peneliti telah melakukan penelitian tentang kemungkinan penggunaan pengujian berbasis CRISPR dengan metode ekstraksi RNA virus yang cepat karena telah berhasil mendeteksi SARS-CoV-2 dengan efisiensi tinggi dalam waktu 30–60 menit<sup>11,19</sup>. Beberapa metode lain membutuhkan waktu antara 40, 45, hingga 50-60 menit tanpa perlu ekstraksi RNA<sup>11</sup>. Metode deteksi SARS-CoV-2 berbasis CRISPR memiliki waktu pengujian yang setara dengan RT-qPCR<sup>11,19</sup>. Namun, dalam analisis RT-qPCR, sampel harus dikirim ke laboratorium pusat yang membuat diagnosis berbasis CRISPR memungkinkan deteksi dilakukan di tempat, yang secara signifikan mengurangi waktu pelaporan<sup>11,19</sup>.

Sebagian besar pengujian deteksi SARS-CoV-2 berbasis CRISPR mengharuskan dua tahap, namun peneliti juga telah menciptakan metode satu langkah yang

membutuhkan waktu dan usaha yang lebih sedikit<sup>11,19</sup>. Namun, pengujian ditempat (point-of-care) membutuhkan aktivitas manual yang lebih sedikit dan tingkat keahlian teknis yang lebih rendah<sup>11</sup>. Saat ini, sedang dikembangkan pengujian berbasis CRISPR yang otomatis dan memberikan hasil langsung dari sampel. Walaupun penggunaan lateral flow strips meningkatkan biaya per pengujian, total biaya bahan untuk pengujian deteksi SARS-CoV-2 berbasis CRISPR dengan metode fluoresensi lebih rendah dibandingkan dengan biaya bahan untuk pengujian deteksi SARS-CoV-2 berbasis RT-qPCR<sup>11,19</sup>. Selain itu, penggunaan metode screening berbasis CRISPR telah berhasil mengurangi biaya peralatan awal sehingga pengujian analisis COVID-19 berbasis CRISPR dengan metode fluoresensi memiliki biaya yang lebih rendah daripada pengujian RT-qPCR<sup>11,19</sup>.

CRISPR/Cas9 memiliki potensi besar dalam terapi terhadap infeksi SARS-CoV-2, dengan mekanisme kerja yang memungkinkan pengeditan atau penghancuran RNA virus secara langsung, sehingga mampu menghambat proses replikasi virus di dalam sel inang<sup>20</sup>. Pendekatan ini umumnya menargetkan gen-gen esensial virus, seperti gen *Nucleocapsid (N)* dan *RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)*, yang berperan penting dalam siklus hidup virus<sup>20</sup>. CRISPR/Cas9 juga berpotensi dapat membantu memprediksi jadwal pengobatan yang optimal bagi pasien secara individual, serta menjadi dasar inovasi dalam penelitian lain seperti replikasi virus corona (termasuk SARS-CoV-2 atau COVID-19) dalam kultur sel<sup>21</sup>.

Meskipun demikian, penerapan CRISPR/Cas9 dalam konteks klinis masih menghadapi tantangan, khususnya terkait potensi efek samping dari pengeditan gen yang bisa memengaruhi genom inang secara tidak diinginkan<sup>20,21</sup>. Sehingga, evaluasi yang cermat terhadap risiko-risiko tersebut sangat diperlukan. Penelitian lebih lanjut masih dibutuhkan untuk memastikan keamanan, spesifisitas, dan efektivitas dari terapi berbasis CRISPR sebelum dapat digunakan secara luas dalam praktik klinis<sup>20,21</sup>.

#### **Tantangan pengaplikasian CRISPR pada efisiensi dan spesifitas**

Meskipun CRISPR telah menjadi sebuah alat yang *powerful* untuk memahami fungsi gen dan interaksi genetik, salah satu perhatian utama dalam penelitian maupun aplikasi terapeutik adalah tingkat spesifisitas pengeditan CRISPR<sup>2,4</sup>. Untuk semua protein Cas, tingkat efek di luar target bervariasi secara signifikan tergantung pada urutan spesifik crRNA atau sgRNA yang sedang diteliti<sup>2</sup>. Terdapat banyak alat bioinformatika yang dapat digunakan untuk memprediksi urutan target CRISPR dengan tingkat efek di luar target rendah dan aktivitas di dalam target tinggi. Namun, tidak selalu mungkin untuk memprediksi dengan akurat properti dari suatu crRNA atau sgRNA tertentu menggunakan pendekatan *in silico*<sup>2</sup>. Di samping kemungkinan efek di luar target, ada keprihatinan penting terkait potensi nuklease Cas untuk memicu mutasi di dalam target yang tidak disengaja dan berdampak negatif<sup>2</sup>. Baru-baru ini ditemukan bahwa Cas9 dapat menyebabkan penghapusan yang

signifikan dan perubahan kromosom yang substansial di situs target sgRNA<sup>2</sup>. Penggunaan pengeditan CRISPR dapat menjadi strategi yang efektif dalam pengobatan penyakit pernapasan tertentu tergantung pada proporsi sel yang perlu diedit secara efektif untuk memperbaiki gejala penyakit<sup>2,4</sup>. Selain itu, penyakit pernapasan yang disebabkan oleh kelainan gen tunggal juga lebih mungkin menjadi kandidat yang menjanjikan untuk terapi pengeditan gen dibandingkan dengan penyakit yang disebabkan oleh faktor genetik yang kompleks<sup>2,4</sup>.

#### **Tantangan pengaplikasian CRISPR pada keamanannya untuk manusia**

Salah satu perhatian utama terkait dengan sistem CRISPR-Cas9 selain efisiensi dan spesifisitasnya adalah keamanannya<sup>2,12,13</sup>. Adanya kemungkinan aktivitas di luar target dan munculnya virus mutan<sup>2</sup>. Mutasi pelarian virus terjadi akibat penghapusan (indels) pada situs segregasi Cas9<sup>2</sup>. Namun, sebagian kecil dari mutasi ini dapat membuat virus tetap bertahan hidup dan melarikan diri, sehingga tidak lagi terpengaruh oleh gRNA asli<sup>2</sup>. Oleh karena itu, mutasi yang tidak diinginkan dapat terjadi pada setiap virus<sup>2</sup>. Jika sel-sel terinfeksi oleh virus mutan tersebut, kemungkinan mereka akan menjadi resisten terhadap pengobatan CRISPR-Cas9<sup>2</sup>. Sel-sel yang terinfeksi oleh virus non-mutasi dapat menjadi tempat penampungan viral yang berperan dalam penyebaran penyakit pada periode penyakit berikutnya<sup>2</sup>. Hal ini yang membuat sistem CRISPR/Cas memiliki risiko dan tidak menguntungkan dalam konteks pasar antiviral. Metode deteksi asam

nukleat menggunakan CRISPR-Cas9 jugamengharuskan amplifikasi asam nukleat dilakukan secara terpisah <sup>2</sup>. Keterlibatan aktivitas manusia dalam metode ini menjadikan proses deteksi lebih rumit dan meningkatkan risiko penyebaran kontaminasi <sup>2</sup>.

### **Tantangan CRISPR pada pada metode pengiriman genetik**

Mentransfer CRISPR-Cas9 ke sel yang terinfeksi virus juga merupakan salah satu keterbatasan dari metode baru ini. Metode pengiriman sistem CRISPR-Cas9 umumnya mengandalkan tiga format utama <sup>12</sup>. Format pertama melibatkan pengiriman DNA plasmid yang mengandung kode untuk Cas9 dan sgRNA <sup>12</sup>. Format kedua melibatkan pengiriman elemen mRNA dan sgRNA, di mana mRNA diubah menjadi nuklease Cas9 melalui proses translasi di sitoplasma. Sedangkan format terakhir adalah pengiriman RNP, kompleks protein Cas9 dan sgRNA, yang memiliki keuntungan dalam hal keamanan dan efek di luartarget yang rendah <sup>12</sup>. Nuklease Cas9 yang dihasilkan melalui penggunaan DNA plasmid relatif stabil dan biaya produksinya rendah <sup>12</sup>. Namun, DNA plasmid juga berpotensi untuk mengungkapkan bagian-bagian dari CRISPR- Cas9 secara persisten, yang dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya efek di luar target pada situs genom yang tidak diinginkan, bahkan menyebabkan mutasi genetik <sup>2</sup>

Meskipun terdapat berbagai pilihan untuk pengiriman komponen CRISPR-Cas9, baikdalam penelitian pernapasan maupun aplikasi terapeutik. Untuk ekspresi sementara, gRNA CRISPR dan protein Cas dapat diekspresikan dari

DNA plasmid <sup>12</sup>. Vektor non-virus, seperti liposom, dapat digunakan untuk mengirimkan muatan CRISPR, baik berupa DNA plasmid, RNA, maupun protein <sup>12</sup>. Liposom telah diuji dalam uji klinis untuk transfer gen CFTR dari DNA plasmid melalui pengiriman melalui hidung <sup>12</sup>. Pentingnya keberhasilan teknologi ini dalam pengaturan klinis tidak bisa diremehkan untuk mengendalikan penyakit virus yang paling parah, termasuk SARS-CoV-2 <sup>3,12</sup>. Namun, seiring dengan peningkatan efisiensi dan sensitivitas CRISPR, kekhawatiran-kekhawatiran tersebut mungkin akan menjadi tidak sesuai yang dimana teknologi ini sedang mengalami kemajuan dengan laju yang belum pernah terjadi sebelumnya <sup>2</sup>.

### **4. SIMPULAN**

Penggunaan CRISPR-Cas9 dalam terapi dan deteksi penyakit pernapasan dapat menjadi sebuah inovasi yang menjanjikan. Studi eksperimental menunjukkan keberhasilan dalam mengoreksi mutasi genetik dan menghambat proses patologis melalui pengeditan gen yang presisi, termasuk memperbaiki mutasi pada gen CFTR dan menurunkan ekspresi gen inflamasi. Dalam bidang diagnostik, CRISPR juga menawarkan metode deteksi SARS-CoV-2 yang lebih cepat, akurat, dan efisien. Studi pada model hewan menunjukkan efektivitas CRISPR-Cas9 dalam mengedit gen yang terlibat dalam fibrosis kistik, PPOK, dan deteksi SARS-CoV. Meskipun demikian, tantangan seperti potensi efek off-target, keamanan jangka panjang, serta pengiriman yang efisien ke sel target, perlu diatasi sebelum implementasi terapi CRISPR-Cas9

pada manusia.

## 5. SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai keamanan jangka panjang dan potensi efek samping untuk meminimalkan risiko efek *off-target* dan potensi mutasi yang tidak diinginkan. Pengembangan sistem pengiriman yang efektif dan spesifik ke jaringan paru menjadi prioritas penting, mengingat kompleksitas struktur dan fungsi sistem pernapasan. Dengan penelitian lanjutan, pengembangan teknologi, dan kerja sama antara ilmuwan, dokter, dan pihak regulasi, diharapkan bahwa terapi gen menggunakan CRISPR-Cas9 dapat menjadi alat yang efektif dan aman dalam pengobatan dan deteksi penyakit pernapasan di masa depan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bai Y, Liu Y, Su Z, et al. Gene editing as a promising approach for respiratory diseases. *J Med Genet.* 2018;55(3):143-149. doi:10.1136/jmedgenet-2017-104960
- Moses C, Kaur P. Applications of CRISPR systems in respiratory health: Entering a new 'red pen' era in genome editing. *Respirology.* 2019;24(7):628-637. doi:10.1111/resp.13527
- Shademan B, Nourazarian A, Hajazimian S, Isazadeh A, Biray Avci C, Oskouee MA. CRISPR Technology in Gene-Editing-Based Detection and Treatment of SARS-CoV-2. *Front Mol Biosci.* 2022;8. doi:10.3389/fmolb.2021.77278
- Bisserier M, Sun XQ, Fazal S, Turnbull IC, Bonnet S, Hadri L. Novel Insights into the Therapeutic Potential of Lung-Targeted Gene Transfer in the Most Common Respiratory Diseases. *Cells.* 2022;11(6). doi:10.3390/cells11060984
- Porter JJ, Lueck JD. A cystic fibrosis gene editing approach that is on target. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2024;35(2). doi:10.1016/j.omtn.2024.102197
- Maule G, Arosio D, Cereseto A. Gene therapy for cystic fibrosis: Progress and challenges of genome editing. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):1-13. doi:10.3390/ijms21113903
- McCluskey E, Velli SK, Kaminski R, et al. HOXA1 Contributes to Bronchial Epithelial Cell Cycle Progression by Regulating p21/CDKN1A. *Int J Mol Sci.* 2025;26(5). doi:10.3390/ijms26052332
- Ohkawa Y, Kanto N, Nakano M, et al. Involvement of langerin in the protective function of a keratan sulfate-based disaccharide in an emphysema mouse model. *Journal of Biological Chemistry.* 2023;299(8). doi:10.1016/j.jbc.2023.105052
- Verma MK, Roychowdhury S, Sahu BD, Mishra A, Sethi KK. CRISPR-based point-of-care diagnostics incorporating Cas9, Cas12, and Cas13 enzymes advanced for SARS-CoV-2 detection. *J Biochem Mol Toxicol.* 2022;36(8). doi:10.1002/jbt.23113
- Kostyusheva A, Brezgin S, Babin Y, et al. CRISPR-Cas

- systems for diagnosing infectious diseases. *Methods*. 2022;203:431-446. doi:10.1016/j.ymeth.2021.04.007
11. Shademan B, Nourazarian A, Hajazimian S, Isazadeh A, Biray Avci C, Oskouee MA. CRISPR Technology in Gene-Editing-Based Detection and Treatment of SARS-CoV-2. *Front Mol Biosci*. 2022;8. doi:10.3389/fmolb.2021.772788
  12. Xu X, Wan T, Xin H, et al. Delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic genome editing. *Journal of Gene Medicine*. 2019;21(7). doi:10.1002/jgm.3107
  13. Wang G. Genome Editing for Cystic Fibrosis. *Cells*. 2023;12(12). doi:10.3390/cells12121555
  14. Da Silva Sanchez A, Paunovska K, Cristian A, Dahlman JE. Treating Cystic Fibrosis with mRNA and CRISPR. *Hum Gene Ther*. 2020;31(17-18):940-955. doi:10.1089/hum.2020.137
  15. Davies JC, Polineni D, Boyd AC, et al. Lentiviral Gene Therapy for Cystic Fibrosis: A Promising Approach and First-In-Human Trial. *Am J Respir Crit Care Med*. Published online December 15, 2024. doi:10.1164/rccm.202402-0389ci
  16. Wei T, Sun Y, Cheng Q, et al. Lung SORT LNPs enable precise homology-directed repair mediated CRISPR/Cas genome correction in cystic fibrosis models. *Nat Commun*. 2023;14(1). doi:10.1038/s41467-023-42948-2
  17. Santos L, Mention K, Cavusoglu-Doran K, et al. Comparison of Cas9 and Cas12a CRISPR editing methods to correct the W1282X-CFTR mutation. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2022;21(1):181-187. doi:10.1016/j.jcf.2021.05.014
  18. Sousa AA, Hemez C, Lei L, et al. Systematic optimization of prime editing for the efficient functional correction of CFTR F508del in human airway epithelial cells. *Nat Biomed Eng*. Published online January 1, 2024. doi:10.1038/s41551-024-01233-3
  19. Hillary VE, Ignacimuthu S, Ceasar SA. Potential of CRISPR/Cas system in the diagnosis of COVID-19 infection. *Expert Rev Mol Diagn*. 2021;21(11):1179-1189. doi:10.1080/14737159.2021.1970535
  20. Deol P, Madhwal A, Sharma G, Kaushik R, Malik YS. CRISPR use in diagnosis and therapy for COVID-19. In: *Methods in Microbiology*. Vol 50. Academic Press Inc.; 2022:123-150. doi:10.1016/bs.mim.2022.03.002
  21. CHEKANI-AZAR S, GHARIB MOMBENI E, BIRHAN M, YOUSEFI M. CRISPR/Cas9 gene editing technology and its application to the coronavirus disease (COVID-19), a review. *Journal of Life Science and Biomedicine*. 2020;10(1):1-9. doi:10.29252/scil.2020.jlsb1