

PERKEMBANGAN TEKNOLOGI CRISPR-CAS9 DALAM TERAPI PENYAKIT ANEMIA SEL SABIT PADA MANUSIA – A REVIU

Nenden Latipah¹, Elizabeth Novi Kusumaningrum^{2*}

¹Mahasiswa Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Terbuka

²Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Terbuka

*Korespondensi: novi@ecampus.ut.ac.id

ABSTRAK

Belum adanya terapi yang menjanjikan atas penyembuhan penyakit genetik anemia sel sabit (*Sickle Cell Disease/SCD*) yang disebabkan oleh mutasi gen, dan bila dimungkinkan terdapat teknologi penyembuhannya maka juga akan terkendala oleh akses untuk memanfaatkan teknologi tersebut dan besarnya biaya yang harus ditanggung oleh penderita. Salah satu solusi yang menawarkan harapan baru adalah dengan terapi berbasis teknologi *CRISPR-Cas9*. Tujuan penulisan ini untuk mendeskripsikan hal-hal penting berkaitan dengan terapi penyakit anemia sel sabit mulai dari batasan penyakit anemia, riwayat penelitiannya, mekanisme kerja *CRISPR-Cas9* hingga tantangan implementasi *CRISPR-Cas9* dalam penyembuhan penyakit anemia sel sabit. Selain itu, juga mengukur capaian teknologi *CRISPR-Cas9* dalam terapi penyakit anemia sel sabit. Kajian ini menggunakan metode tinjauan pustaka melalui penelusuran artikel ilmiah bersumber dari PubMed, Scopus, Google Scholar, dan publikasi lainnya yang relevan dengan konteks terapi penyakit sel sabit khususnya artikel publikasi tahun 2015–2023. Hasil penulisan menunjukkan bahwa beberapa hal penting berkaitan dengan terapi penyakit anemia sel sabit telah disajikan secara rinci yang mencakup bahasan tentang: batasan dan ragam penyakit anemia, riwayat penelitiannya, mekanisme kerja *CRISPR-Cas9*, mekanisme perbaikan DNA, perkembangan teknologi *CRISPR-Cas9*, pengembangan varian *Cas9* dan aplikasinya, strategi terapi *CRISPR-Cas9*, dan tantangan implementasi teknologi *CRISPR-Cas9* terhadap penyembuhan penyakit anemia sel sabit (*SCD*). Kesimpulannya dari capaian teknologi *CRISPR-Cas9* dalam terapi penyakit anemia sel sabit telah mampu melakukan pengeditan genom dengan menggunakan sel punca darah, yang perbaikan DNA nya dilakukan melalui jalur NHEJ. Kondisi ini ditunjukkan oleh hasil uji klinis seperti *OTQ923* yang mampu meningkatkan kadar hemoglobin janin (*HbF*)

Kata kunci: fetal hemoglobin, gen *HBG*, imunogenisitas, *OTQ923*, *sickle cell disease*

ABSTRACT

There is currently no promising treatment for the genetic disease sickle cell anemia (*Sickle Cell Disease/SCD*) caused by gene mutations, and even if a cure were possible, it would be constrained by access to the technology and the high costs that would have to be borne by patients. One solution that offers new hope is therapy based on *CRISPR-Cas9* technology. The purpose of this paper is to describe important matters related to sickle cell disease therapy, starting from the limitations of anemia, its research history, the mechanism of action of *CRISPR-Cas9*, to the challenges of implementing *CRISPR-Cas9* in curing sickle cell disease. In addition, it also measures the achievements of *CRISPR-Cas9* technology in the treatment of sickle cell anemia. This study uses a literature review method by searching for scientific articles sourced from PubMed, Scopus, Google Scholar, and other publications relevant to the context of sickle cell therapy, particularly articles published between 2015 and 2023. The results of this study show that several important aspects related to sickle cell disease therapy have been presented in detail, including discussions on: the limitations and types of anemia, research history, the mechanism of action of *CRISPR-Cas9*, DNA repair mechanisms, the development of *CRISPR-Cas9* technology, the development of *Cas9* variants and their applications, *CRISPR-Cas9* therapy strategies, and the challenges of implementing *CRISPR-Cas9* technology for the treatment of sickle cell disease (*SCD*). In conclusion, the achievements of *CRISPR-Cas9* technology in sickle cell disease therapy have enabled genome editing using blood stem cells, with DNA repair carried out through the NHEJ pathway. This condition is demonstrated by clinical trial results such as *OTQ923*, which can increase fetal hemoglobin (*HbF*) levels.

Keywords: fetal hemoglobin, *HBG* gene, immunogenicity, *OTQ923*, , sickle cell disease

PENDAHULUAN

Anemia sel sabit merupakan penyakit genetik yang cukup umum di dunia, memengaruhi lebih dari 20 juta orang terutama di Afrika Sub-Sahara, India, dan negara-negara Mediterania [22]. Di Amerika Serikat, sekitar 100.000 orang hidup dengan penyakit ini dan membutuhkan biaya perawatan kesehatan yang sangat besar setiap tahunnya [5]. Penyakit ini menjadi penyebab utama kematian dan kecacatan pada anak-anak serta dewasa muda di wilayah-wilayah tersebut [22].

Di Indonesia, kasus pembawa sifat sel sabit tergolong *sporadis* dan diprediksi terkait dengan rekrutmen tentara Afrika oleh Tentara Kolonial Belanda pada tahun 1835-1890 yang membawa gen sickling dan hemoglobin S [14]. Secara umum, kondisi ini tidak menjadi masalah kesehatan yang signifikan di Indonesia.

Penyakit anemia sel sabit disebabkan oleh mutasi gen pengatur pembentukan hemoglobin, protein pembawa oksigen dalam sel darah merah [22]. Mutasi ini menyebabkan perubahan satu asam amino pada rantai protein hemoglobin, menghasilkan hemoglobin abnormal (hemoglobin S/Hb S) [5]. Ketika kadar oksigen rendah, Hb S menggumpal dan membuat sel darah merah berubah bentuk dari bulat menjadi bulan sabit yang kaku [22]. Sel berbentuk sabit ini mudah tersangkut di pembuluh darah kecil, menyebabkan penyumbatan aliran darah dan nyeri hebat [5]. Penyakit ini diwariskan dari orang tua ke anak secara resesif autosomal [22].

Terapi anemia sel sabit sangat sulit mencapai target sembuh [5]. Karena pengobatan yang tersedia hanya bersifat mengurangi gejala, seperti pemberian obat hidoksiurea, transfusi darah rutin, dan antibiotik [5][22]. Pengobatan ini memiliki banyak kekurangan—hidoksiurea hanya efektif pada sekitar setengah pasien [22], transfusi darah berulang menyebabkan penumpukan zat besi berbahaya [22], dan belum ada cara yang memperbaiki akar permasalahan genetik [22]. Transplantasi sumsum tulang dapat menyembuhkan namun memiliki kelemahan: biaya sangat mahal, sulit menemukan donor cocok, berisiko komplikasi serius hingga kematian [5], dan akses sangat terbatas terutama di negara berkembang [9].

CRISPR-Cas9 menawarkan harapan baru sebagai terapi yang dapat memperbaiki kesalahan genetik secara permanen dengan memotong dan memperbaiki DNA pada sel

punca darah pasien [5]. Keuntungan utamanya adalah menggunakan sel pasien sendiri sehingga tidak ada risiko penolakan, dan hasil uji klinis awal menunjukkan pasien terbebas dari episode nyeri dan transfusi darah [5][22]. Namun teknologi ini masih memiliki kekurangan: pemotongan DNA belum presisi sehingga berisiko menimbulkan kesalahan baru [22], biaya sangat mahal [5], dan dampak jangka panjang belum diketahui pasti [22]. Tantangan terbesar adalah aksesibilitas terapi di negara-negara seperti Afrika Sub-Sahara, India Selatan, dan Mediterania yang memiliki keterbatasan fasilitas kesehatan dan dana [9] [22].

Tujuan penulisan ini untuk mendeskripsikan hal-hal penting berkaitan dengan terapi penyakit anemia sel sabit mulai dari batasan penyakit anemia, riwayat penelitiannya, mekanisme kerja *CRISPR-Cas9* hingga tantangan implementasinya, serta mengukur capaian teknologi *CRISPR-Cas9* dalam terapi penyakit anemia sel sabit.

METODE PENULISAN

Penulisan artikel tentang penggunaan teknologi *CRISPR-Cas9* sebagai alternatif pengobatan penyakit anemia sel sabit (*Sickle Cell Disease/SCD*) disusun dengan menggunakan metode kajian literatur (*literature review*). Penelusuran literatur dilakukan melalui basis data elektronik seperti PubMed, Scopus, dan Google Scholar dengan menggunakan kata kunci "*CRISPR-Cas9*", "*gene editing*", "*sickle cell disease*", "*fetal hemoglobin*", dan "*OTQ923*". Kriteria inklusi yang digunakan adalah: (1) artikel ilmiah yang dipublikasikan dalam kurun waktu 2015–2023, (2) membahas mekanisme kerja, potensi klinis, maupun tantangan implementasi *CRISPR-Cas9*, serta (3) publikasi yang relevan dengan konteks terapi penyakit sel sabit. Artikel berbahasa Inggris maupun Indonesia dengan akses penuh dipertimbangkan dalam analisis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyakit Anemia

Anemia adalah kondisi ketika kadar hemoglobin atau jumlah sel darah merah lebih rendah dari normal sehingga jaringan tubuh kekurangan oksigen dengan gejala lemas, pucat, pusing, dan sesak napas ringan [27], secara global sekitar 30,7% wanita usia 15–49 tahun dan 39,8% anak usia 6–59 bulan mengalami anemia. Penyebab utama anemia

meliputi kekurangan zat besi, vitamin B12, asam folat, kehilangan darah kronis, serta penyakit genetik seperti talasemia dan anemia sel sabit [26]. Jenis anemia yang umum di Indonesia adalah anemia defisiensi besi dan talasemia, sementara anemia sel sabit tergolong langka [27]. Secara global, anemia sel sabit (*Sickle Cell Disease*) memengaruhi sekitar 7,7 juta orang dan menyebabkan lebih dari 375.000 kematian per tahun, terutama di Afrika Sub-Sahara [25]. Penyakit ini bersifat resesif autosomal, disebabkan oleh mutasi gen HBB pada kromosom 11 yang menghasilkan hemoglobin abnormal HbS. Penyebarannya tinggi di Afrika dan India Selatan karena sifat pembawa gen HbS memberikan perlindungan terhadap malaria [14][22].

Riwayat Penelitian

Penelitian sebelumnya tentang *CRISPR-Cas9* untuk anemia sel sabit sebagian besar berfokus pada mekanisme molekuler dan uji klinis tahap awal, namun belum mengintegrasikan analisis komprehensif mengenai tantangan implementasi dan aksesibilitas. [17]. mengembangkan sistem *CRISPR/Cas9* untuk koreksi mutasi sickle dengan tingkat HDR ~30%. Demirci *et al.* (2021) meneliti strategi induksi HbF melalui editing BCL11A enhancer [22]. melaporkan uji klinis fase 1-2 dengan *OTQ923* yang menunjukkan induksi HbF stabil (19,0-26,8%) [17]. mereview berbagai pendekatan genome editing. Namun, penelitian tersebut belum membahas secara mendalam aspek efektivitas biaya, aksesibilitas di negara berkembang, dan follow-up jangka panjang [5][9] [22]. Artikel ini menyajikan sintesis sistematis yang mengevaluasi perkembangan teknologi seperti reaktivasi hemoglobin janin melalui *OTQ923*, sekaligus menganalisis faktor yang memengaruhi implementabilitas terapi, termasuk biaya, infrastruktur, dan ekuitas akses kesehatan [22].

Teknologi CRISPR-Cas9

Teknologi *CRISPR-Cas9* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* – *CRISPR associated protein 9*) merupakan metode pengeditan gen yang memungkinkan ilmuwan memotong dan mengubah DNA secara tepat seperti “gunting molekuler”. Sistem ini terdiri dari dua komponen utama: enzim *Cas9*, yang berfungsi memotong DNA, dan RNA pemandu (*guide RNA*), yang mengarahkan *Cas9* ke lokasi gen

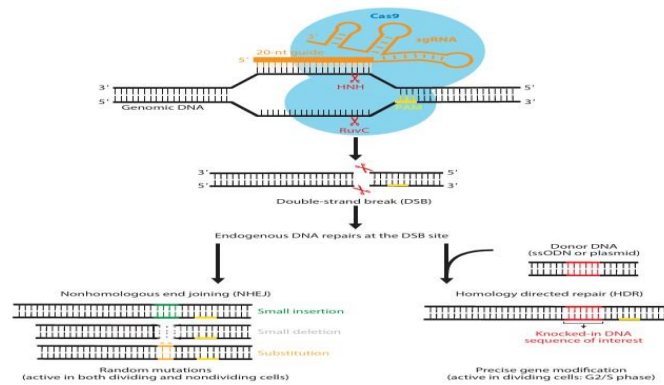
target yang hendak diperbaiki[2][13]. Sejarah teknologi ini berawal dari penelitian bakteri pada tahun 1987 ketika ilmuwan Jepang menemukan urutan DNA berulang di genom *E. coli*. Baru pada tahun 2012, Jennifer Doudna dan Emmanuelle Charpentier menemukan bahwa sistem pertahanan alami bakteri ini dapat dimodifikasi menjadi alat pengeditan gen pada sel manusia [1][10]. Penemuan ini kemudian mendapat Hadiah Nobel Kimia 2020.

Peralatan dasar *CRISPR-Cas9* meliputi plasmid DNA pembawa gen *Cas9*, RNA pemandu, sel target (misalnya sel punca), serta sistem kultur dan deteksi molekuler [3]. Teknologi ini tidak hanya digunakan untuk anemia sel sabit, tetapi juga untuk terapi HIV, kanker, talasemia, distrofia otot, dan penyakit genetik mata [4] [6]. Secara global, Amerika Serikat, Inggris, Prancis, dan Cina telah melakukan uji klinis *CRISPR* pada manusia sejak 2016 [22]. Tingkat keberhasilan terapi anemia sel sabit dengan *CRISPR* mencapai >90% pasien bebas gejala nyeri dan transfusi setelah 1 tahun terapi [22]. Dalam penyakit lain seperti thalassemia β , keberhasilan mencapai 88% pasien tidak lagi membutuhkan transfusi darah rutin [3]. Temuan ini menunjukkan potensi besar *CRISPR-Cas9* sebagai terapi genetik masa depan yang aman dan efektif.

Mekanisme Kerja CRISPR-Cas9

Sistem *CRISPR-Cas9* merupakan teknologi pengeditan gen yang diadaptasi dari sistem kekebalan alami bakteri untuk melawan virus [25]. Sistem ini terdiri dari beberapa komponen utama: *CRISPR* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) yang merupakan bagian DNA bakteri berisi catatan informasi genetik penyerang asing dan diubah menjadi *crRNA* sebagai penanda untuk mengenali DNA [13]; enzim *Cas9* (*CRISPR-associated protein 9*) yang berfungsi sebagai gunting pemotong DNA dengan dua domain: *HNH* untuk memotong untai DNA target dan *RuvC* untuk memotong untai pasangannya, menghasilkan *DSB* (*double-strand break*[13][20]; *sgRNA* (*single guide RNA*) yang mengarahkan *Cas9* ke lokasi DNA yang tepat; dan *PAM* (*Protospacer Adjacent Motif*) berupa urutan pendek 5'-NGG-3' pada *SpCas9* yang harus ada pada DNA target agar *Cas9* dapat mengenali dan memotongnya [13]. Dengan kombinasi komponen-komponen ini, sistem *CRISPR-Cas9* dapat memotong DNA secara presisi pada

lokasi yang diinginkan untuk keperluan pengeditan gen.



Gambar 1. Komponen Utama Sistem CRISPR-Cas9 [13].

Proses pengeditan gen dimulai ketika sgRNA (RNA pemandu) bergabung dengan enzim Cas9 membentuk satu kesatuan kompleks [29]. Kompleks ini kemudian mencari tanda khusus yang disebut PAM pada DNA di dalam sel. Ketika tanda PAM ditemukan, DNA akan mulai terbuka sedikit. RNA pemandu kemudian masuk ke dalam untaian DNA yang terbuka ini

dan membentuk struktur yang disebut R-loop. Di dalam struktur ini, RNA pemandu akan mencocokkan dirinya dengan bagian DNA yang menjadi target. Jika RNA pemandu dan DNA target cocok seperti *puzzle* yang pas, maka enzim Cas9 akan aktif dan memotong DNA tersebut menjadi dua bagian (DSB atau pemotongan untai ganda) [13].

Tabel 1. Komponen dan Peran [22].

Komponen	Peran
Cas9 (<i>Endonuklease</i>)	Protein pemotong DNA, bagian dari kompleks Ribonucleoprotein (RNP)
sgRNA-68 (RNA Pemandu Tunggal)	sgRNA spesifik yang dipilih melalui skrining untuk menargetkan elemen repressor pada promotor HBG1 dan HBG2
Target DNA	Promotor gen HBG1 dan HBG2 (γ -globin). Gangguan pada promotor ini dirancang untuk meningkatkan ekspresi HbF pada turunan sel darah merah

Mekanisme Perbaikan DNA

Setelah Cas9 memotong DNA, sel akan memperbaiki potongan tersebut melalui dua cara utama [13]. Cara pertama disebut HDR (*Homology-Directed Repair* atau perbaikan terarah melalui kesamaan) yang merupakan metode perbaikan akurat menggunakan *template* DNA donor sebagai cetakan, sehingga peneliti dapat memasukkan perubahan genetik yang diinginkan seperti memperbaiki mutasi penyakit atau menambahkan gen baru [13][29]. Cara kedua adalah NHEJ (*Non-homologous End Joining* atau penyambungan ujung tanpa kesamaan) yang bekerja tanpa *template* donor dan cenderung membuat kesalahan kecil berupa penambahan atau pengurangan beberapa huruf DNA (indels) saat

menyambung kembali potongan DNA, sehingga sering digunakan untuk mematikan fungsi gen tertentu [13][29]. NHEJ lebih aktif pada semua tahap pembelahan sel dan lebih disukai oleh sel punca pembentuk darah [7][17]. Namun, penelitian terbaru menunjukkan bahwa mekanisme NHEJ yang rawan kesalahan ini juga dapat memicu munculnya mutasi yang tidak diinginkan, seperti pada virus HIV-1 yang dapat bertahan hidup meskipun sudah diedit dengan CRISPR, sehingga diperlukan strategi multi-target untuk mencegah resistensi [25]. Secara ringkas tercermin pada Tabel 2.

Tabel 2. Mekanisme Perbaikan DNA [13][17][21][29].

Tahap	Komponen/Proses	Deskripsi	Hasil
Perakitan dan Pengenalan	Cas9 + sgRNA + PAM	Cas9 berikatan dengan sgRNA, mengenali PAM, lalu membentuk R-loop dengan DNA target	Kompleks siap untuk pemotongan
Pemotongan DNA	Domain RuvC & Domain HNH	HNH memotong untai target, RuvC memotong untai nontarget	Double-Strand Break (DSB)
Perbaikan DNA(NHEJ)	NHEJ	NHEJ: cepat, rawan kesalahan, tanpa <i>template</i> donor	Indels → knockout gen (NHEJ)
Perbaikan DNA (HDR)	HDR + <i>template</i> donor	HDR: presisi tinggi, cetakan baru untuk Double-Strand Break (DSB) menggunakan <i>template</i> donor	Koreksi mutasi/ <i>knock-in</i> gen baru (HDR)
Modifikasi Cas9 (dCas9)	dCas9 (mutan Cas9 tanpa aktivitas nuklease) + aktivator/represor	Cas9 dimutasi sehingga tidak memotong DNA, tetapi dapat diarahkan ke gen tertentu untuk mengatur ekspresi.	Regulasi ekspresi gen (CRISPRa/CRISPRi).

Perkembangan Teknologi *CRISPR-Cas9*

Perkembangan teknologi pengeditan gen telah mengarah pada *sistem Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)–Cas9* sebagai platform dominan saat ini. Awalnya, upaya rekayasa genom dipelopori oleh nuklease generasi pertama, yaitu Zinc-finger nucleases (ZFNs), kemudian diikuti oleh generasi kedua, yaitu *Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)*. Meskipun ZFNs dan TALENs terbukti efektif, namun sistem pemrogramannya dirasa sangat rumit, memerlukan waktu yang cukup lama, biaya yang relatif mahal, dan memerlukan keahlian signifikan karena domain pengenalan DNA harus direkayasa ulang untuk setiap target DNA [7]. Puncak dari perkembangan teknologi ini adalah dengan hadirnya *CRISPR-Cas9* (generasi ketiga), sebuah sistem yang direkayasa dari mekanisme imunitas adaptif bakteri. *CRISPR-Cas9* dengan cepat menjadi alat yang paling disukai karena mudah dirancang, sederhana, sangat efisien, dan hemat biaya, karena penargetan ditentukan hanya dengan memanipulasi urutan single guide RNA (sgRNA) [25][29]. Perkembangan teknologi *CRISPR-Cas9* dimulai tahun 1987 dengan

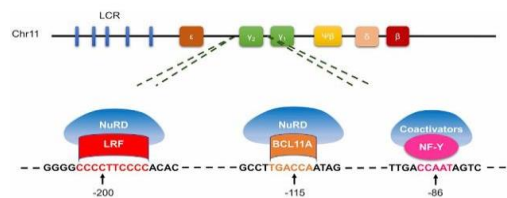
penemuan urutan pengulangan pendek pada bakteri sebagai cikal bakal *CRISPR*, kemudian ditemukan pada lebih dari 20 mikroorganisme pada tahun 2000 dan secara resmi dinamai *CRISPR* pada tahun 2002 [10][13][25]. Pemahaman fungsi biologis berkembang sejak tahun 2005 ketika spacer terbukti berasal dari DNA asing, diikuti konfirmasi resistensi virus pada prokariota (2007), penemuan peran crRNA dalam pertahanan antivirus (2008), hingga pematangan crRNA bersama tracrRNA dan RNase III (2011) [10][13][25].

Terobosan besar terjadi tahun 2012 dengan penemuan Cas9 sebagai endonuklease DNA berpandu RNA yang menjadi dasar aplikasi rekayasa genom [5][10]. Sistem disederhanakan tahun 2013 dengan kombinasi Cas9 dan sgRNA yang diaplikasikan pada HIV-1 dan CCR5, dinobatkan sebagai Top 10 Breakthroughs oleh Science [5][10]. Struktur kristal Cas9 berhasil dipetakan tahun 2014 untuk mengungkap mekanisme aktivasinya [13]. Perkembangan berlanjut dengan identifikasi SaCas9 dan Cpf1 (Cas12a) pada tahun 2015, serta penemuan CasX dan CasY tahun 2017 yang memperluas aplikasi *CRISPR* ke bidang epigenetik, imaging, dan terapi [5][10][11].

Pengembangan Varian Cas9 dan Aplikasinya pada Anemia Sel Sabit

Cas9 merupakan enzim yang berfungsi sebagai pemotong molekular dalam sistem pengeditan gen CRISPR-Cas9. Pada terapi anemia sel sabit, Cas9 digunakan bersama RNA pemandu untuk menggunting dan mengoreksi mutasi genetik pada sel punca darah pasien, sehingga setelah dimasukkan kembali ke dalam tubuh, dimungkinkan sel-sel tersebut dapat memproduksi hemoglobin fungsional artinya tidak lagi berbentuk sabit [17]. Salah satu upaya untuk meningkatkan ketepatan dan memperluas fungsi Cas9 yang pada awalnya hanya bisa memotong DNA, maka para ilmuwan telah mengembangkan beberapa versi modifikasi Cas9. *Pertama*, enzim dCas9 (*dead Cas9* atau Cas9 mati) yang dibuat dengan menonaktifkan kemampuan memotongnya tetapi masih bisa menempel pada DNA target, sehingga dapat digunakan untuk mengatur aktif atau non-aktifnya suatu gen tanpa memotong DNA [21][28] *Kedua*, *Base Editors* (penyunting huruf DNA) yang dapat mengubah satu basa DNA menjadi huruf lain (misalnya C menjadi A) tanpa perlu memotong DNA, sehingga lebih aman dan menghindari kesalahan yang tidak diinginkan [6][17] *Ketiga*, ada Prime Editors dan Cas13a yang merupakan versi lebih

canggih dengan kemampuan lebih presisi dan bahkan bisa memotong RNA, bukan hanya DNA [6][8][28] Teknologi ini membuka peluang besar untuk pengobatan penyakit genetik, khususnya anemia sel sabit (SCD) yang merupakan kelainan darah keturunan paling umum yang disebabkan oleh cacat pada gen beta-globin, menyebabkan sel darah merah berbentuk sabit dan menimbulkan kerusakan organ [28]. Penelitian menunjukkan bahwa peningkatan kadar Hemoglobin Janin (HbF) dapat melindungi pasien SCD dari komplikasi penyakit, sebagaimana terlihat pada bayi baru lahir yang terlindungi selama 6 bulan pertama kehidupannya karena kadar HbF yang tinggi secara alami, dan pada pasien dengan mutasi HPFH (*hereditary persistence of fetal hemoglobin* atau persistensi hemoglobin janin turunan) yang menunjukkan gejala lebih ringan [7]. Pendekatan serupa juga efektif pada penyakit kelainan darah beta-talasemia, yaitu dengan peranan gamma-globin dapat menggantikan kekurangan beta-globin, sehingga mengurangi penumpukan alpha-globin yang beracun di dalam sel [7]. Mekanismenya secara rinci dijelaskan pada Gambar 2.



Gambar 2. Peta lokasi gen-gen pembentuk hemoglobin (protein pembawa oksigen dalam darah merah) yang terletak pada kromosom 11 di dalam sel manusia [7].

Pada lokasi ini terdapat empat gen penting yang tersusun berurutan: gen HBG1 dan HBG2 yang menghasilkan gamma-globin (komponen Hemoglobin Janin/HbF), gen HBD yang menghasilkan delta-globin, dan gen HBB yang menghasilkan beta-globin (komponen Hemoglobin Dewasa/HbA). Gambar ini juga menampilkan lokasi penempelan tiga protein pengatur gen (faktor transkripsi) yaitu BCL11A, ZBTB7A/LRF, dan NF-Y yang menempel pada promotor HBG. Secara normal ketiga protein pengatur ini mematikan gen HBG1 dan HBG2 saat seseorang bertumbuh dewasa sehingga produksi HbF berhenti dan digantikan oleh HbA. Pemahaman tentang mekanisme kerja gen-gen serta protein

pengatur ini sangat penting dalam pengembangan terapi CRISPR-Cas9 untuk anemia sel sabit, karena dengan menonaktifkan protein pengatur seperti BCL11A menggunakan CRISPR, gen HBG dapat dinyalakan kembali pada pasien dewasa sehingga tubuh kembali memproduksi HbF yang melindungi dari gejala penyakit [5]. Strategi ini dilakukan karena HbF tidak membentuk pola sabit seperti HbA yang cacat, sehingga dapat menggantikan fungsi hemoglobin yang rusak dan mengurangi komplikasi penyakit.

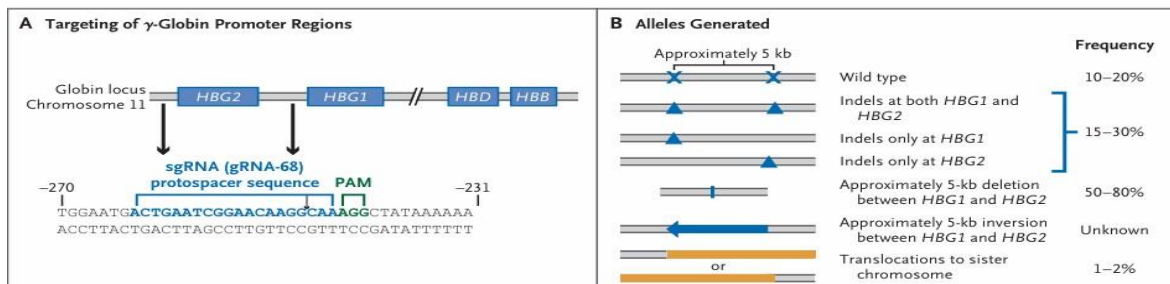
Strategi Terapi *CRISPR-Cas9* untuk Penyembuhan Penyakit Anemia Sel Sabit (SCD)

Terdapat tiga strategi yang dapat digunakan dalam terapi penyembuhan penyakit anemia sel sabit menggunakan teknologi *CRISPR-Cas9*. Prinsip dasar pengeditan gen *CRISPR-Cas9* pada terapi SCD mengadopsi mekanisme molekuler yang telah dijelaskan dalam beberapa studi pengembangan gene editing [12][18] sebagai berikut:

1. *OTQ923*: Produk Klinis Utama

OTQ923 adalah terapi pengobatan anemia sel sabit yang menggunakan teknologi *CRISPR-Cas9* untuk mengedit sel punca darah pasien sendiri di laboratorium sebelum dikembalikan ke tubuh pasien. Cara kerjanya adalah dengan menggunakan kombinasi gunting molekuler *Cas9* dan pemandu RNA khusus (gRNA-68) untuk menargetkan dan merusak bagian pengatur (promotor) dari gen

gamma-globin (HBG1 dan HBG2), yaitu gen yang menghasilkan Hemoglobin Janin[22]. Proses pengeditan ini menyasar wilayah DNA sepanjang 246 pasang basa yang terletak tepat sebelum titik mulai gen gamma-globin, dan menghasilkan berbagai perubahan termasuk penghapusan bagian DNA sepanjang 5 ribu pasang basa yang menggabungkan kedua gen gamma-globin menjadi satu gen gabungan [22]. Pengembangan mekanisme aktivasi HbF pada *OTQ923* sejalan dengan penelitian lain yang menunjukkan bahwa pengeditan genetik pada area regulasi globin efektif meningkatkan produksi HbF[19]. Dengan cara ini, sel-sel darah yang telah diedit dapat kembali memproduksi Hemoglobin Janin yang melindungi pasien dari gejala anemia sel sabit, karena Hemoglobin Janin tidak akan membentuk pola sabit seperti Hemoglobin Dewasa yang cacat pada pasien penyakit ini



Gambar 3. A. Situs penargetan gRNA-68 pada promotor γ -globin dengan sekuens protospacer dan PAM, B. Alel yang dihasilkan dari proses editing termasuk delesi ~5 kb [22].

Keterangan:

- (A) : skema menunjukkan lokasi gen HBG2 dan HBG1 pada kromosom 11, bagian dari kompleks gen globin. Sistem *CRISPR-Cas9* menggunakan *single guide RNA* (sgRNA) untuk mengenali urutan DNA spesifik di daerah promotor kedua gen tersebut. Setelah pengenalan, *Cas9* memotong DNA di dekat urutan PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) untuk memicu mekanisme perbaikan DNA yang akan mengaktifkan kembali ekspresi gen hemoglobin janin (HbF).
- (B) : panel kanan menunjukkan berbagai jenis perubahan DNA (*indels*, delesi, inversi, dan translokasi) yang dihasilkan. Sekitar 50–80% hasil pengeditan menghasilkan delesi sepanjang 5 kilobase antara gen HBG1 dan HBG2, yang terbukti meningkatkan kadar HbF secara signifikan dan mengurangi gejala anemia sel sabit.

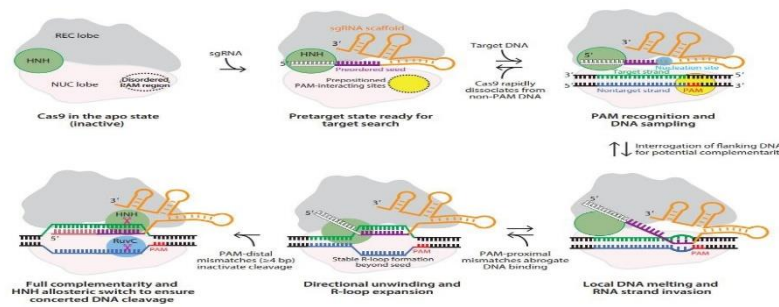
2. Pemotongan DNA

Proses pengeditan dimulai ketika RNA pemandu bergabung dengan enzim *Cas9* membentuk satu kesatuan, kemudian mencari tanda khusus PAM pada DNA. Setelah menemukan PAM, DNA akan terbuka dan RNA pemandu masuk untuk mencocokkan diri dengan DNA target, membentuk struktur R-loop. Jika cocok sempurna, *Cas9* akan aktif dan memotong DNA menggunakan dua pisaunya

(domain HNH dan RuvC) [13]. Tahapan molekuler ini merupakan dasar dari sebagian besar terapi *CRISPR-Cas9*, termasuk yang dikembangkan untuk penyakit neurodegeneratif maupun kelainan darah [12][18]. Hasil uji klinis menunjukkan bahwa pasien yang menjalani terapi gen berbasis *CRISPR-Cas9* mengalami peningkatan kadar hemoglobin janin (HbF) hingga 40%, bebas dari episode nyeri selama lebih dari satu tahun,

dan tidak lagi memerlukan transfusi darah rutin. Efek terapi ini bertahan stabil pada jangka

panjang karena koreksi genetik terjadi langsung pada sel punca hematopoietik pasien [3][7][22].

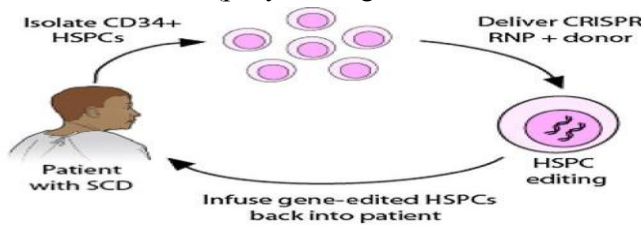


Gambar 4. Diagram mekanisme pengenalan target dan pembentukan DSB oleh Cas9, menunjukkan: Pengikatan kompleks Cas9-sgRNA pada DNA, Pengenalan PAM, Pembentukan R-loop, Aktivasi domain nuklease HNH dan RuvC, Pemotongan DNA menghasilkan DSB [13][17].

3. Jalur Perbaikan DNA pada Anemia Sel Sabit (*Sickle Cell Anemia/SCD*)

Prosesnya dimulai dengan mengambil sel punca darah (CD34+HSPC) dari pasien, kemudian memasukkan alat pengedit gen berupa kompleks Cas9 dan RNA pemandu beserta *template* DNA perbaikan ke dalam sel menggunakan metode elektroporasi (kejutan listrik ringan). Setelah DNA dipotong oleh Cas9, sel akan memperbaikinya melalui dua cara: HDR (perbaikan terarah) yang menggunakan *template* DNA donor sebagai cetakan sehingga menghasilkan perbaikan yang tepat dan akurat, atau NHEJ (penyambungan

langsung) yang menyambung potongan DNA tanpa *template* sehingga sering menghasilkan kesalahan kecil berupa penambahan atau pengurangan beberapa huruf DNA yang justru berguna untuk mematikan gen tertentu [6][13][17]. Sel punca darah cenderung lebih sering menggunakan jalur NHEJ karena mekanisme ini sangat aktif di semua tahap pembelahan sel, dan setelah proses pengeditan selesai, sel-sel yang sudah diperbaiki dikembalikan ke tubuh pasien melalui infus untuk menghasilkan sel darah baru yang sehat. Secara singkat mekanismenya tersaji dalam Gambar 5 dan Tabel 3.



Gambar 5 Langkah-langkah terapi gen untuk anemia sel sabit [17].

Tabel 3. Tahap CRISPR-Cas9 dalam Pengobatan Anemia Sel Sabit (SCD) [17][22].

Tahap	Proses Utama	Hasil
Isolasi dan Persiapan Sel	1. Isolasi HSPC/CD34+ dari pasien sel 2. diproses <i>ex vivo</i>	Sel siap diedit
Desain dan Penargetan CRISPR-Cas9	1. Target: promotor HBG1 & HBG2 2. Strategi: gangguan repressor 3. Pemilihan sgRNA terbaik (mis. gRNA-68) 4. Kompleks Cas9-gRNA dikirim via elektroporasi	Sel HSPC siap mengalami pengeditan
Proses Pengeditan	1. Cas9-gRNA memotong DNA Perbaikan 2. melalui NHEJ (rawan kesalahan) Terjadi delesi ±5 kb → fusi HBG2-	Produk <i>OTQ923</i> (HSPC yang diedit CRISPR-Cas9)

3. HBG1

Terapi dan Hasil Klinis	1. Infusi kembali sel <i>OTQ923</i> autolog ke pasien 2. Induksi HbF berkelanjutan	Peningkatan HbF dan perbaikan klinis gejala SCD
-------------------------	---	---

Tantangan Implementasi CRISPR-Cas9 dalam Penyembuhan Anemia Sel Sabit

Teknologi *CRISPR-Cas9* menawarkan peluang revolusioner untuk terapi anemia sel sabit dengan memperbaiki mutasi gen *HBB* atau mengaktifkan kembali gen *HBG* penghasil hemoglobin janin (HbF). Meskipun hasil awal menjanjikan, penerapannya masih menghadapi tantangan signifikan dalam aspek pengiriman, keamanan imunologis, dan akurasi pengeditan genom.

1. Tantangan Pengiriman (*Delivery Challenge*)

Hambatan utama adalah mengantarkan kompleks Cas9 dan RNA pemandu (gRNA) ke dalam sel punca hematopoietik (HSPC) secara aman dan efisien (Xiao *et al.*, 2019). Metode berbasis virus seperti Adeno-associated virus (AAV) efisien namun memiliki kapasitas muatan terbatas (~4,7 kb), sedangkan enzim SpCas9 berukuran ~4,1 kb. Untuk mengatasinya, digunakan versi SaCas9 dari *Staphylococcus aureus* yang lebih kecil (~3,3 kb), meskipun penggunaan AAV berulang dapat memicu respons imun terhadap kapsid virus yang menurunkan efektivitas terapi [29]. Alternatif non-virus seperti elektroporasi kompleks RNP (Cas9 + gRNA) tidak menyisipkan DNA asing dan efeknya sementara, namun kejutan listrik dapat menyebabkan toksisitas sel, kerusakan membran, atau kematian sebagian HSPC, terutama pada pasien SCD yang memiliki sumsum tulang lemah akibat peradangan kronis [7][17].

2. Tantangan Imunogenisitas

Protein Cas9 dapat dianggap sebagai antigen asing oleh sistem kekebalan tubuh. Banyak individu telah memiliki antibodi terhadap Cas9 karena paparan alami terhadap *S. pyogenes* atau *S. aureus*. Ketika Cas9 dimasukkan ke dalam tubuh, antibodi ini dapat memicu penolakan imun, peradangan sistemik, bahkan reaksi alergi berat, yang dapat menyebabkan kegagalan terapi [6]. Selain itu, penggunaan vektor lentivirus yang mengekspresikan Cas9 secara permanen berpotensi meningkatkan risiko mutasi off-target jangka panjang [29].

3. Efektivitas dan Akurasi Pengeditan Genom

Kendala utama lainnya adalah efek off-target ketika Cas9 memotong lokasi DNA yang mirip dengan target sebenarnya, menimbulkan mutasi gen penting atau kelainan kromosom [15]. Selain itu, mekanisme perbaikan DNA pada HSPC cenderung melalui jalur NHEJ (*Non-Homologous End Joining*) yang sering menghasilkan kesalahan dibanding HDR (*Homology-Directed Repair*), sehingga menimbulkan mozaikisme atau hasil pengeditan tidak seragam [17]. Meski demikian, uji klinis *OTQ923* menunjukkan pendekatan ini mampu mengganggu promotor *HBG1/HBG2* untuk meningkatkan produksi HbF dan memperbaiki kondisi pasien SCD [22]. Keberhasilan implementasi *CRISPR-Cas9* pada terapi SCD masih bergantung pada peningkatan efisiensi pengiriman, pengurangan respons imun, dan peningkatan presisi genetik guna menjamin keamanan dan keberlanjutan terapi.

SIMPULAN

Dalam tulisan berjudul “Perkembangan teknologi *CRISPR-Cas9* dalam terapi penyakit anemia sel sabit pada manusia” secara rinci telah disajikan hal-hal berkaitan dengan judul tersebut mulai dari batasan dan ragam penyakit anemia, riwayat penelitiannya hingga tantangan implementasi *Crispr-Cas9* dalam penyembuhan penyakit anemia sel sabit.

Pada saat ini, capaian teknologi *CRISPR-Cas9* dalam terapi penyakit anemia sel sabit telah mampu melakukan pengeditan genom dengan menggunakan sel punca darah, yang perbaikan DNA nya dilakukan melalui jalur NHEJ (*Non-Homologous End Joining*) karena dengan mekanisme ini relatif aktif di semua tahap pembelahan sel. Hasilnya dari uji klinis seperti *OTQ923* mampu meningkatkan kadar hemoglobin janin HbF.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Adikusuma, F., Piltz, S., Corbett, M. A., Turvey, M., McColl, S. R., Helbig, K. J., Beard, M. R., Hughes, J., Pomerantz, R. T., & Thomas, P. Q. (2018). Large

- deletions induced by Cas9 cleavage. *Nature*, 560(7717), E8–E9.
- [2] Anders, C., Bargsten, K., & Jinek, M. (2016). Structural plasticity of PAM recognition by engineered variants of the RNA-guided endonuclease Cas9. *Molecular Cell*, 61(6), 895–902.
- [3] Antoniani, C., Meneghini, V., Lattanzi, A., Felix, T., Romano, O., Magrin, E., Weber, L., Pavani, G., El Hoss, S., & Kurita, R. (2018). Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus. *Blood*, 131(17), 1960–1973.
- [4] Baddeley, H. J. E., & Isalan, M. (2021). The application of CRISPR/Cas systems for antiviral therapy. *Frontiers in Genome Editing*, 3, 745559.
- [5] Burstein, D., Harrington, L. B., Strutt, S. C., Probst, A. J., Anantharaman, K., Thomas, B. C., Doudna, J. A., & Banfield, J. F. (2017). New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature*, 542(7640), 237–241.
- [6] Demirci, S., Leonard, A., Haro-Mora, J. J., Uchida, N., & Tisdale, J. F. (2019). CRISPR/Cas9 for sickle cell disease: Applications, future possibilities, and challenges. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1144, 37–52.
- [7] Demirci, S., Leonard, A., Essawi, K., & Tisdale, J. F. (2021). CRISPR-Cas9 to induce fetal hemoglobin for the treatment of sickle cell disease. *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*, 23, 276–285.
- [8] Deng, Q., Chen, Z., Shi, L., & Lin, H. (2018). Developmental progress of CRISPR/Cas9 and its therapeutic applications for HIV-1 infection. *Reviews in Medical Virology*, 28(5), e1998.
- [9] Diki, D., Dwisatyadini, M., Widowati, W., Afifah, E., Wahyuni, C. D., & Aviani, J. K. (2021). Development of CRISPR/Cas9 plasmid for gene editing of EGFRvIII gene of glioblastoma multiforme. *Ist International Seminar on Science and Technology*, Universitas Terbuka.
- [10] Ebrahimi, S., Khosravi, M. A., Raz, A., Karimipoor, M., & Parvizi, P. (2023). CRISPR-Cas technology as a revolutionary genome editing tool: Mechanisms and biomedical applications. *Iranian Biomedical Journal*, 27(5), 219–246.
- [11] Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N. M., Freije, C. A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Livny, J., Regev, A., Koonin, E. V., Hung, D. T., Sabeti, P. C., Collins, J. J., & Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), 438–442.
- [12] Iqbal, M., Saya, D. S., & Budhiyanto, Y. (2024). *Studi Literatur: Inovasi Sains Gene Editing CRISPR-Cas9 di Tengah Dilema Etis*. Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro.
- [13] Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). *CRISPR–Cas9 structures and mechanisms*. *Annual Review of Biophysics*, 46, 505–529.
- [14] Jonxis, J. H. P. (1957). Sickle-cell trait in Indonesia: A report of sporadic cases and their anthropological significance. *The Lancet*, 269(6976), 1103–1106.
- [15] Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., & Huang, J. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein and Cell*, 6(5), 363–372.
- [16] Meliana, S., & Kasasiah, A. (2024). Pemanfaatan Teknologi CRISPR-Cas9 untuk Pengobatan Penyakit Huntington's (A Systematic Literature Review). *Media Farmasi*, 20(2), 151–160. Poltekkes Makassar.
- [17] Park, S. H., & Bao, G. (2021). CRISPR/Cas9 gene editing for curing

- sickle cell disease. *Transfusion and Apheresis Science*, 60(1), 103060.
- [18] Prayogo, F. A., Royhanaty, I. R., & Kirana Sari, M. O. S. (2025). *Biologi Sel: Dari Dasar ke Aplikasi Terapeutik*. Bekasi: Yayasan Putra Adi Dharma.
- [19] Romero, Z., Lomova, A., Said, S., Miggelbrink, A., Kuo, C. Y., & Campo-Fernandez, B. (2019). Editing the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem cells: Comparison of endonucleases and homologous donor templates. *Molecular Therapy*, 27, 1389–1406.
- [20] Rothemejer, F. H., Lauritsen, N. P., Juhl, A. K., Schleimann, M. H., König, S., Søgaard, O. S., Bak, R. O., & Tolstrup, M. (2023). Development of HIV-resistant CAR T cells by CRISPR/Cas-mediated CAR integration into the CCR5 locus. *Viruses*, 15(1), 202.
- [21] Saayman, S., Ali, S. A., Morris, K. V., & Weinberg, M. S. (2015). The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(6), 819–830.
- [22] Sharma, A., Boelens, J.-J., Cancio, M., Hankins, J. S., Bhad, P., Azizy, M., Lewandowski, A., Zhao, X., Chitnis, S., Peddinti, R., Zheng, Y., Kapoor, N., Ciceri, F., Maclachlan, T., Yang, Y., Liu, Y., Yuan, J., Naumann, U., Yu, V. W. C., ... LaBelle, J. L. (2023). CRISPR-Cas9 editing of the HBG1 and HBG2 promoters to treat sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 389(9), 820–832.
- [23] Walters, M., Patience, M., Leisenring, W., Rogers, Z., Aquino, V., Buchanan, G., Roberts, I., Yeager, A., Hsu, L., & Adamkiewicz, T. (2001). Stable mixed hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation for sickle-cell anemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 7(12), 665–673.
- [24] Wang, W. C., Ware, R. E., Miller, S. T., Iyer, R. V., Casella, J. F., Minniti, C. P., Rana, S., Thornburg, C. D., Rogers, Z. R., & Kalpatthi, R. V. (2011). Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: A multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). *The Lancet*, 377, 1663–1672.
- [25] Wang, Z., Pan, Q., Gendron, P., Zhu, W., Guo, F., Cen, S., Wainberg, M. A., & Liang, C. (2016). CRISPR/Cas9-derived mutations both inhibit HIV-1 replication and accelerate viral escape. *Cell Reports*, 15(3), 481–489.
- [26] World Health Organization. (2023). *Anaemia in women and children*. WHO.
- [27] World Health Organization. (2025). *Sickle cell disease: Global burden and mortality*. WHO.
- [28] Xiao, Q., Guo, D., & Chen, S. (2019). Application of CRISPR/Cas9-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 69.