

## Revolusi Terapi Genetik: Kemajuan Terkini Dan Teknik Laboratorium Biomedik Modern

Marcel Antoni<sup>1\*</sup>,  
Rina Priastini Susilowati<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta, Indonesia.

<sup>2</sup>Departemen Biologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta, Indonesia.

### Abstrak

Terapi genetik merupakan inovasi revolusioner dalam dunia kedokteran yang bertujuan untuk mengobati atau mencegah penyakit melalui modifikasi materi genetik pasien. Tinjauan pustaka adalah mengulas kemajuan terbaru dalam terapi genetik, termasuk teknik laboratorium biomedik yang digunakan. Teknik-teknik seperti *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, *sequencing DNA*, *CRISPR-Cas9*, dan *Prime Editing* telah memberikan kemampuan untuk memodifikasi gen dengan presisi tinggi. Terapi genetik menunjukkan keberhasilan pada berbagai penyakit, termasuk penyakit genetik monogenik seperti hemofilia dan *Duchenne Muscular Dystrophy*, serta kanker melalui terapi (*Chimeric Antigen Receptor T-cell*) CAR-T. Selain itu, hasil penelitian menunjukkan potensi terapi genetik dalam mengatasi penyakit kompleks seperti kardiovaskular dan diabetes, serta dalam pengobatan regeneratif untuk penyakit degeneratif seperti Parkinson. Meskipun menjanjikan, namun tantangan terkait etika, keamanan, dan aksesibilitas masih harus diatasi. Studi kasus menunjukkan bahwa meskipun terdapat banyak keberhasilan, namun masih ada kendala yang harus dipecahkan untuk meningkatkan efektivitas dan keamanan terapi ini. Ulasan materi menyimpulkan bahwa terapi genetik berpotensi besar menjadi pilar penting pengobatan modern di masa depan, dengan catatan bahwa penelitian dan pengembangan lebih lanjut diperlukan untuk mengatasi berbagai hambatan yang ada.

**Kata Kunci:** CRISPR-Cas9, *polymerase chain reaction (PCR)*, terapi (*Chimeric Antigen Receptor T-cell*) CAR-T, terapi genetik, *western blot*

## Gene Therapy Revolution: Recent Advances and Modern Biomedical Laboratory Techniques

\*Corresponding Author : Marcel Antoni

Corresponding Email : marcel.antoni@ukrida.ac.id

Submission date : June 25<sup>th</sup>, 2024

Revision date : August 13<sup>th</sup>, 2024

Accepted date : December 12<sup>th</sup>, 2024

Published date : December 20<sup>th</sup>, 2024

Copyright (c) 2024 Marcel Antoni, Rina Priastini Susilowati



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License.

### Abstract

Genetic therapy is a revolutionary innovation in the medical world that aims to treat or prevent diseases through the modification of the patient's genetic material. This literature review examines the latest advances in genetic therapy, including the biomedical laboratory techniques used. Techniques such as *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, *DNA sequencing*, *CRISPR-Cas9*, and *Prime Editing* have provided the ability to modify genes with high precision. Genetic therapy has shown success in various diseases, including monogenic genetic diseases such as hemophilia and *Duchenne Muscular Dystrophy*, as well as cancer through *Chimeric Antigen Receptor T-cell (CAR-T)* therapy. Additionally, research shows the potential of genetic therapy in addressing complex diseases such as cardiovascular disease and diabetes, as well as in regenerative treatment for degenerative diseases like Parkinson's. Despite being promising, challenges related to ethics, safety, and accessibility still need to be addressed. Case studies indicate that although there are many successes, there are still obstacles to be overcome to improve the effectiveness and safety of this therapy. This literature review concludes that genetic therapy has great potential to become an important pillar of modern treatment in the future, provided that further research and development are needed to overcome the various existing barriers.

**Keywords:** CAR-T therapy, CRISPR-Cas9, gene therapy, *polymerase chain reaction (PCR)*, *western blot*

### How to Cite

Antoni M, Susilowati RP. Gene Therapy Revolution: Recent Advances and Modern Biomedical Laboratory Techniques. JMedScientiae. 2024;3(3): . Available from: <https://ejournal.ukrida.ac.id/index.php/ms/article/view/3258> DOI: <https://doi.org/10.36452/JMedScientiae.v3i3.3258>

## Pendahuluan

Terapi genetik merupakan inovasi di dunia kedokteran dimana dilakukan modifikasi terhadap materi genetik dalam rangka mengobati atau mencegah penyakit. Kemajuan terapi genetik tidak terlepas dari kemajuan teknologi biomedik. Terdapat sekitar 20.000–25.000 gen dalam tubuh manusia. Berbagai penyakit genetik dapat disebabkan oleh mutasi atau perubahan pada gen-gen tersebut. Mutasi adalah perubahan urutan genetik, dan merupakan penyebab utama keanekaragaman organisme. Perubahan ini terjadi pada berbagai tingkatan dan dapat memiliki konsekuensi yang sangat berbeda. Perubahan ini terjadi karena faktor genetik atau epigenetik. Perubahan ini dapat menyebabkan perubahan fenotipik pada manusia yang dapat menyebabkan kelainan atau evolusi.<sup>1</sup>

Penyakit monogenik disebabkan oleh mutasi pada satu gen, sedangkan penyakit kompleks melibatkan beberapa gen dan atau faktor lingkungan. Penyakit monogenik terutama disebabkan oleh mutasi pada satu gen, oleh karena itu, penyakit ini umumnya dikenali sebagai kelainan genetik dengan mekanisme yang paling sederhana. Namun, penelitian terbaru menunjukkan bahwa mekanisme molekuler penyakit monogenik bisa jadi sangat rumit, dan pemahamannya memerlukan studi yang kompleks pada tingkat molekuler.<sup>2</sup>

Prinsip dasar terapi genetik adalah dengan mengubah/memanipulasi materi genetik; gen yang hilang atau rusak, digantikan, ditambahkan, atau diperbaiki. Terapi genetik memiliki tiga metode antara lain: metode fisik, metode kimiawi, dan metode biologis. Metode fisik meliputi elektroporasi, biolistik, injeksi mikro, laser, suhu tinggi, ultrasound, dan transfer gen hidrodinamik. Metode kimiawi menggunakan kalsium-fosfat, DAE-dekstran, liposom, dan partikel nano untuk transfeksi. Metode biologis semakin banyak menggunakan virus untuk transfer gen, virus-virus ini dapat berintegrasi di dalam genom sel inang yang memberikan ekspresi gen yang stabil, sedangkan beberapa virus lain yang tidak berintegrasi bersifat episomal dan ekspresinya diencerkan.<sup>3</sup>

Perkembangan terapi genetik, memberikan harapan pada pengobatan berbagai penyakit yang

di masa sebelumnya dianggap sulit bahkan tidak mungkin disembuhkan.

## Metodologi

*Literature review* dilakukan pada tiga *electronic database*, yaitu *Google Scholar*, *Pumed*, dan *MDPI*. Kata kunci yang digunakan adalah “*CAR-T therapy*”, “*CRISPR-Cas9*”, “*Gene therapy*”, “*Polymerase Chain Reaction*”, and “*Western blot*”. Penapisan literatur dilakukan dengan menggunakan bentuk yang tersedia pada ketiga *database* tersebut, yaitu menggunakan jurnal penelitian sesuai dengan relevansinya. Selanjutnya, memilih kata-kata yang sesuai dengan kriteria yang dibutuhkan, yaitu jurnal atau artikel yang telah diterbitkan antara tahun 2014 sampai dengan tahun 2024, dapat diakses secara keseluruhan teksnya (*full paper*), yang tersedia dalam Bahasa Inggris dan Bahasa Indonesia.

## Hasil dan Pembahasan

Kemajuan pesat terapi genetik didukung oleh kemajuan pesat dibidang teknologi biomedik/teknik laboratorium, diantaranya penemuan beberapa teknik laboratorium berikut; *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode PCR merupakan sebuah metode/teknik untuk memperbanyak segmen DNA tertentu. Metode PCR melibatkan langkah-langkah, yaitu denaturasi (memanaskan DNA untuk memisahkan untaiannya), *annealing* (mendinginkan DNA untuk memungkinkan primer menempel pada segmen target), dan ekstensi/elongasi (penambahan nukleotida oleh DNA polimerase untuk memperpanjang DNA dari primer). Metode PCT dapat digunakan untuk menganalisis dan mendeteksi gen target dengan sensitivitas tinggi; untuk menemukan mutasi genetik penyebab penyakit.<sup>4,5</sup>

Selanjutnya metode *sequencing* DNA dengan metode Sanger dan *Next-Generation Sequencing* (NGS). Pada metode Sanger digunakan dideoksinukleotida, yang merupakan nukleotida terminator rantai yang menghentikan sintesis DNA. Dengan mengukur panjang fragmen yang dihasilkan, urutan basa dapat ditentukan. Pada metode NGS proses dipercepat, dan dimungkinkan analisis genom secara menyeluruh dengan melakukan *sequencing*

paralel ribuan hingga jutaan fragmen DNA secara bersamaan. Metode *sequencing* DNA ini dapat digunakan untuk membantu mengidentifikasi mutasi genetik yang menyebabkan penyakit.<sup>6,7</sup>

Metode selanjutnya dalam terapi genetik adalah vektor viral. Sesuai namanya, metode ini menggunakan *Lentivirus* dan *Adenovirus* sebagai vektor, untuk mengirimkan gen terapeutik ke dalam sel target. Adenovirus memiliki efisiensi infeksi yang tinggi tetapi tidak dapat mengintegrasikan gen terapeutik ke dalam genom inang, sementara lentivirus dapat menginfeksi sel yang sedang membelah dan tidak membelah. Namun, untuk alasan faktor keamanan, dikembangkan pula metode yang dinamakan metode vektor non-viral. Pada metode ini sebagai vektor digunakan plasmid dan nanopartikel. Plasmid sendiri merupakan molekul DNA sirkuler yang dapat dimasukkan ke dalam sel target melalui prosedur lipofeksi atau elektroporasi sehingga dapat membawa gen terapeutik; sedangkan pada metode nanopartikel, DNA atau RNA terapeutik dikirimkan ke dalam sel dengan lebih mudah dan aman, dengan dibungkus dalam nanopartikel. Dibandingkan dengan metode vektor non-viral, metode viral secara efisiensi lebih baik, namun dalam hal keamanan, metode vektor non-viral dianggap lebih aman dalam mengurangi risiko reaksi imun.<sup>8</sup>

Metode berikutnya adalah *CRISPR-Cas9*. Pada metode ini, digunakan enzim *Cas9* yang dipandu oleh RNA untuk memotong DNA pada bagian tertentu. Sistem perbaikan DNA seluler selanjutnya memperbaiki mutasi atau menambahkan gen baru setelah pemotongan. Metode *CRISPR-Cas9* memungkinkan pengeditan gen secara akurat; memungkinkan pemotongan DNA pada lokasi tertentu, dan memperbaiki mutasi genetik, *CRISPR-Cas9* dianggap sebagai kemajuan revolusioner pada penemuan dan perkembangan teknologi biomedik.<sup>9</sup>

Metode berikutnya adalah transfeksi sel dengan menggunakan elektroporasi. Metode ini menggunakan medan listrik untuk membuat pori-pori sementara pada membran sel, memungkinkan masuknya DNA terapeutik ke dalam sel. Sedangkan pada metode lipofeksi, DNA terapeutik dibungkus dalam lipid, sehingga membantu fusi dengan membran sel, masuk ke

dalam sel. Metode transfeksi sel ini digunakan pada terapi gen *ex-vivo* (misalnya, memodifikasi sel T dalam terapi *CAR-T*). Metode ini memfasilitasi pengenalan gen baru ke dalam sel target.<sup>10,11</sup>

Metode *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs) dan *Zinc Finger Nucleases* (ZFNs) Pada prosesnya, kedua metode ini menggunakan pengenalan protein spesifik untuk mengidentifikasi dan memotong urutan DNA tertentu, dalam memfasilitasi perbaikan atau penyisipan gen. Jika dibandingkan dengan metode CRISPR, metode ini kurang efisien dan kompleks; namun metode ini masih digunakan untuk tujuan yang memerlukan pengeditan gen secara akurat.<sup>12,13</sup>

Metode *prime editing*; pada metode ini digunakan *RNA-guided reverse transcriptase*; *prime editing* mengubah urutan DNA spesifik tanpa memotong kedua untai DNA. Teknologi ini dianggap cukup menjanjikan untuk terapi genetik karena membuat pengeditan gen kurang rentan terhadap kesalahan dan meminimalkan kemungkinan efek samping.<sup>14,15</sup>

Metode *Western Blotting*. Metode ini digunakan untuk mendeteksi protein yang diekspresikan oleh gen terapeutik. Protein dipisahkan berdasarkan ukurannya menggunakan gel elektroforesis dan kemudian ditransfer ke membran yang dideteksi dengan antibodi spesifik.<sup>16,17</sup>

Metode *quantitative PCR* (q-PCR) atau dikenal juga dengan nama *real-time PCR*, adalah teknik yang memungkinkan amplifikasi dan kuantifikasi DNA secara simultan. Metode ini digunakan untuk mengukur tingkat ekspresi gen target dengan akurasi tinggi dan bermanfaat untuk memantau efektivitas terapi genetik. Hasil *qPCR* dianalisis secara *real-time*, dengan data kuantitatif yang dihasilkan pada setiap siklus PCR. Kurva amplifikasi menunjukkan jumlah DNA yang diperbanyak pada setiap siklus, memungkinkan perhitungan jumlah awal DNA target.<sup>18,19</sup>

Metode mikroskopi fluoresen. Pada metode ini gen atau protein dalam sel dilabeli dengan zat warna fluoresen untuk memvisualisasikan efek transfer dan pengeditan gen. Metode ini berguna untuk melacak distribusi dan lokasi gen dalam sel, yang penting untuk mengonfirmasi keberhasilan terapi genetik.<sup>20,21</sup>

Contoh penerapan terapi genetik pada kasus klinis adalah pada penyakit hemofilia dan *Duchenne Muscular Dystrophy* (DMD). Pada penyakit hemofilia terjadi mutasi pada gen faktor pembekuan darah. Terapi genetik berusaha mengatasi masalah ini dengan mentransfer gen faktor pembekuan yang normal menggunakan vektor viral.<sup>22</sup> Sedangkan pada penyakit *Duchenne Muscular Dystrophy* (DMD), terapi genetik menggunakan *CRISPR-Cas9* untuk memperbaiki mutasi pada gen *dystrophin* yang menjadi penyebab penyakit ini.<sup>23,24</sup> Potensi terapeutik terapi genetik juga memberikan harapan baru pada penyakit gangguan metabolik seperti diabetes maupun penyakit kardiovaskular. Pada penyakit diabetes, terapi genetik berfokus pada pengeditan gen yang mengatur produksi insulin dan respons seluler terhadap glukosa. Sedangkan pada bidang kardiovaskular, teknik *CRISPR-Cas9* digunakan untuk pengeditan gen yang pada kasus hipertrofi jantung.<sup>25,26</sup>

Meskipun banyak kemajuan pengobatan yang dicapai melalui terapi genetik; kemajuan dan perkembangan tersebut bukanlah tanpa tantangan. Isu keamanan, efektivitas, dan etika adalah tiga tantangan utama. Pedoman ketat diperlukan untuk memastikan terapi genetik aman dan efektif. Biaya yang tinggi dan sulitnya aksesibilitas menjadi hambatan dalam penerapan terapi genetik secara luas. Masalah etis meliputi pertanyaan tentang modifikasi genetik pada embrio dan dampak jangka panjang pada pasien belum sepenuhnya dipahami. Dalam hal keamanan, lebih banyak penelitian diperlukan untuk mengatasi kemungkinan reaksi imun terhadap vektor viral dan potensi efek samping dari teknik pengeditan gen.<sup>8,27-29</sup>

Pasien hemofilia yang berhasil menjalani terapi genetik menunjukkan hasil yang baik setelah terapi.<sup>30,31</sup> Namun, terapi genetik belum selalu berhasil. Beberapa uji klinis terapi sel *CAR-T* menunjukkan efek samping yang serius, seperti sindrom pelepasan sitokin dan neurotoksisitas.<sup>32,33</sup> Pembelajaran dari contoh-contoh ini dapat membantu meningkatkan perencanaan dan pelaksanaan terapi genetik di masa depan.

## Simpulan

Perkembangan terbaru dalam terapi genetik memberikan harapan besar untuk

pengobatan penyakit yang sebelumnya sulit diatasi. Terapi genetik memiliki potensi besar untuk kemajuan kedokteran di masa depan berkat perkembangan teknologi dan penelitian yang berkelanjutan. Keberhasilan terapi genetik dalam mengobati penyakit monogenik, kanker, dan penyakit kompleks menunjukkan bahwa terapi genetik dapat memainkan peran penting dalam pengobatan modern. Untuk memastikan bahwa semua pasien yang membutuhkan dapat menikmati manfaat terapi genetik, masalah terkait etika, keamanan, dan aksesibilitas harus diselesaikan.

## Daftar Pustaka

1. Banoon S, Sabhan T, Ghasemian A. Genetic mutations and major human disorders: A review. *Egyptian Journal of Chemistry*. 2022;65:571-89.
2. Cyske Z, Gaffke L, Pierzynowska K, Węgrzyn G. Complex changes in the efficiency of the expression of many genes in monogenic diseases, mucopolysaccharidoses, may arise from significant disturbances in the levels of factors involved in the gene expression regulation processes. *Genes (Basel)*. 2022;13(4).
3. Sayed N, Allawadhi P, Khurana A, Singh V, Navik U, Pasumarthi SK, *et al*. Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sci*. 2022;294:120375.
4. Lauerman LH. Advances in PCR technology. *Anim Health Res Rev*. 2004;5(2):247-8.
5. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):1-4.
6. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, *et al*. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017;550(7676):345-53.
7. Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol Genet Metab*. 2013;110(1-2):3-24.
8. Lundstrom K. Viral vectors in gene therapy: Where do we stand in 2023? *Viruses*. 2023;15(3).

9. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*. 2014;23(R1):R40-R6.
10. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *Peer J*. 2021;9:e11165.
11. Miliotou AN, Papadopoulou LC. CAR T-cell therapy: A new era in cancer immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(1):5-18.
12. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):397-405.
13. Zhang HX, Zhang Y, Yin H. Genome editing with mRNA encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol Ther*. 2019;27(4):735-46.
14. Lu C, Kuang J, Shao T, Xie S, Li M, Zhu L, *et al*. Prime editing: An all-rounder for genome editing. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17).
15. Chen PJ, Liu DR. Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation. *Nature Reviews Genetics*. 2023;24(3):161-77.
16. Hnasko TS, Hnasko RM. The Western blot. *Methods Mol Biol*. 2015;1318:87-96.
17. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429-34.
18. Dymond JS. Explanatory chapter: quantitative PCR. *Methods Enzymol*. 2013;529:279-89.
19. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ*. 2021;49(5):800-12.
20. Ghiran IC. Introduction to fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol*. 2011;689:93-136.
21. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014;2014(10):pdb.top071795.
22. Liu X, Liu M, Wu L, Liang D. Gene therapy for hemophilia and Duchenne Muscular Dystrophy in China. *Hum Gene Ther*. 2018;29(2):146-50.
23. Erkut E, Yokota T. CRISPR therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3).
24. Agrawal P, Harish V, Mohd S, Singh SK, Tewari D, Tatiparthi R, *et al*. Role of CRISPR/Cas9 in the treatment of Duchenne muscular dystrophy and its delivery strategies. *Life Sciences*. 2023;330:122003.
25. Strong A. CRISPR gene-editing therapies for hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Med*. 2023;29(2):305-6.
26. Afzal J, Kshitiz. CRISPRing the hypertrophic cardiomyopathy: correcting one pathogenic variant at a time. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023;8(1):254.
27. Maguire-Zeiss KA, Federoff HJ. Safety of viral vectors for neurological gene therapies. *Curr Opin Mol Ther*. 2004;6(5):473-81.
28. Joseph AM, Karas M, Ramadan Y, Joubran E, Jacobs RJ. Ethical perspectives of therapeutic human genome editing from multiple and diverse viewpoints: A scoping review. *Cureus*. 2022;14(11):e31927.
29. Gonçalves GAR, Paiva RMA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*. 2017;15(3):369-75.
30. Swystun LL, Lillicrap D. Gene therapy for coagulation disorders. *Circ Res*. 2016;118(9):1443-52.
31. Nathwani AC. Gene therapy for hemophilia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2022;2022(1):569-78.
32. Velasco R, Mussetti A, Villagrán-García M, Sureda A. CAR T-cell-associated neurotoxicity in central nervous system hematologic disease: Is it still a concern? *Front Neurol*. 2023;14:1144414.
33. Frey N, Porter D. Cytokine release syndrome with chimeric antigen receptor T cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(4):e123-e7.