

TINJAUAN PUSTAKA

Potensi Kombinasi *Induced-Pluripotent Stem Cells* (iPSC) dan Metode Pengeditan Gen *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats–Associated Nuclease 9* (CRISPR-Cas9) Sebagai Terapi pada Pasien Hemofilia

Irfan Hasbullah Putra¹, Khairunnisa¹, M. Yusan Pratama¹

1. Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang

Korespondensi: Irfan Hasbullah Putra, email: Irfanhasbullahputra261096@gmail.com, Hp: 082173099252

Abstrak

Hemofilia merupakan penyakit genetik berupa gangguan dalam pembekuan darah yang terjadi akibat mutasi pada gen yang mengkode faktor koagulasi. Anak yang mengalami hemofilia apabila tidak ditangani dengan baik akan mengakibatkan berbagai macam komplikasi yang dapat berujung kepada kematian. Pada saat sekarang ini, anak yang mengalami hemofilia memerlukan terapi pengganti atau pengobatan dengan desmopresin yang dilakukan seumur hidup dengan risiko infeksi yang tinggi. Oleh karena itu dibutuhkan suatu terapi yang dapat mengatasi penyebab dari hemofilia tersebut, satu-satunya terapi yang dapat menyembuhkan hemofilia yaitu terapi gen. Terapi gen meliputi terapi dengan menggunakan metode pengeditan gen yang fleksibel dan mudah digunakan, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats–associated nuclease 9* (CRISPR- Cas9). Metode ini mampu dengan baik memotong molekul DNA pada titik tertentu melalui aktivitas endonuklease dengan bantuan *single guide RNA* (sgRNA). Penggunaan metode ini dapat dikembangkan untuk dilakukan pada *induced pluripotent stem cell* (iPSC). Pengkombinasian teknik iPSC dan gen editing CRISPR-Cas9 pada sel pasien hemofilia dapat dihasilkan stem sel yang mampu menghasilkan faktor koagulasi yang diperlukan. Sehingga dapat mengatasi permasalahan yang mejadi penyebab dari hemofilia tersebut.

Kata kunci: Hemofilia, iPSC, CRISPR-Cas9

Abstract

Hemophilia is a genetic disease in the form of a disorder in blood clotting that occurs due to mutations in the genes that code for coagulation factors. Children with hemophilia, if not handled properly, will experience various complications that can lead to death. At this time, children with hemophilia require replacement therapy or treatment with desmopressin, which is carried out for life with a high risk of infection. Therefore, we need a therapy that can overcome the causes of hemophilia. The only therapy that can cure hemophilia is gene therapy. Gene therapy includes therapy using a flexible and easy-to-use gene editing method, clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated nuclease 9 (CRISPR-Cas9). This method is able to properly cut DNA molecules at a certain point through endonuclease activity with the help of a single guide RNA (sgRNA). The use of this method can be developed for induced pluripotent stem cells (iPSC). Combining the iPSC technique with CRISPR-Cas9 gene editing in hemophilia patient cells can produce stem cells capable of producing the necessary coagulation factors. So that it can overcome the problems that are the cause of hemophilia.

Keywords: Hemofilia, iPSC, CRISPR-Cas9

PENDAHULUAN

Hemofilia merupakan penyakit genetik berupa gangguan dalam pembekuan darah yang terjadi akibat mutasi pada gen yang mengkode faktor koagulasi. Terdapat tiga jenis hemofilia berdasarkan faktor koagulasi yang mengalami defisiensi. Hemofilia A merupakan kelainan terkait kromosom X yang paling sering di dunia yang diakibatkan oleh kekurangan atau bahkan tidak ada sama sekali faktor koagulasi VIII (F8).^[1,2] Insidensi hemofilia A di dunia mencapai 1/5000 anak laki-laki dan 1/3 dari individu yang tidak memiliki keluarga dengan riwayat penyakit tersebut (80-85% kasus hemofilia).^[2] Pada hemofilia B yang mengalami defisiensi adalah faktor koagulasi IX (F9).^[1] Prevalensi hemofilia B lebih sedikit dibanding dengan hemofilia A, angkanya sekitar 1/25.000-30.000 laki-laki (14% kasus hemofilia).³ Berbeda dengan hemofilia A dan B yang merupakan penyakit genetik terkait X, pada hemofilia C defek genetik diturunkan melalui autosomal resesif yang menyebabkan defisiensi faktor koagulasi XI (F11). Karena diturunkan melalui kromosom autosom maka peluang terjadinya hemofilia pada laki-laki maupun perempuan sama, prevalensi masing-masing jenis kelamin sekitar 1/100.000 pada laki-laki dan 0,2- 1/1.000.000 pada perempuan.^[2]

Untuk saat ini yang menjadi pengobatan standar adalah terapi pengganti atau pengobatan dengan desmopresin. Terapi ini cukup efektif namun terdapat beberapa kelemahan seperti adanya risiko infeksi virus dan juga terapi ini harus dilakukan seumur hidup. Oleh karena itu dibutuhkan suatu terapi yang dapat mengatasi penyebab dari hemofilia tersebut, satu-satunya terapi

yang dapat menyembuhkan hemofilia yaitu terapi gen.^[4] Salah satu metode yang sudah diterapkan terutama pada hemofilia B (gen F9 lebih kecil sehingga lebih mudah untuk dilakukan penelitian genetik) adalah vektor AAV (*Adeno-associated Viral*). Pada penelitian klinis sebelumnya menunjukkan bahwa pada pasien hemofilia B yang mendapat injeksi AAV8, mampu mempertahankan 1- 6% dari nilai normal faktor IX selama tiga tahun.^[5] Namun terdapat keterbatasan dalam penerapannya secara lebih luas akibat respon imun terhadap kapsid AAV.^[1] Sehingga dibutuhkan metode terapi gen yang tidak akan mempengaruhi sistem imun.

Pada tahun 2007, Takahashi dan Yamanaka melakukan suatu terobosan pada teknik stem sel dengan menemukan suatu teknik yang disebut *induced pluripotent stem cell* (iPSC). Teknik ini memungkinkan untuk terjadinya suatu pemrograman ulang sel somatik yang telah matur menjadi sel yang keadaannya mirip sel punca embrional.^[6] Keuntungan utama iPSC terutama untuk terapi selular yang dipersonalisasi adalah tidak imunogenik. Hal ini karena iPSC berasal dari satu individu, dan digunakan kembali oleh individu yang sama setelah dilakukan rekayasa genetika atau diferensiasi *in-vitro* sehingga menghindari masalah dalam penolakan imunologis.^[1] Namun pada iPSC, stem sel yang dihasilkan tetap memiliki kelainan genetik/mutasi gen yang terlibat dalam patogenesis hemofilia. Oleh karena itu dibutuhkan suatu teknik/alat untuk melakukan koreksi pada gen yang mengalami mutasi ini.

Kemudian pada tahun 2013, ditemukan suatu metode pengeditan gen yang fleksibel dan mudah digunakan, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated nuclease*

9 (CRISPR-Cas9).^[1] Metode ini mampu dengan baik memotong molekul DNA pada titik tertentu melalui aktivitas endonuklease dengan bantuan *single guide* RNA (sgRNA). Dibanding dengan metode gen editing lain seperti *zinc finger nucleases* (ZFNs) dan *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs), CRISPR-Cas9 lebih efisien, lebih mudah dioperasikan, biayanya lebih murah, dapat mencapai mutan homozigot, dan dapat memperbaiki banyak mutasi dalam berbagai situs secara bersamaan.^[7]

Pengkombinasian teknik iPSC dan gen editing CRISPR-Cas9 pada sel pasien hemofilia dapat dihasilkan stem sel yang mampu menghasilkan faktor koagulasi yang diperlukan. Sehingga diharapkan dapat mengatasi permasalahan yang menjadi penyebab dari hemofilia tersebut. Tinjauan pustaka ini mencoba untuk mendalami cara kerja dari kombinasi teknik iPSC dan gen editing CRISPR-Cas9 dalam mengatasi kelainan genetik pasien hemofilia.

METODE

Tinjauan pustaka ini dibuat dengan mengumpulkan berbagai artikel dari situs pemerintah, pubmed, dan *google scholar* dengan kata kunci *induced pluripotent stem cell* (iPSC), *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated nuclease 9* (CRISPR-Cas9), dan *CRISPR-Cas9 and iPSC for hemophilia*. Penulis menemukan 50 jurnal dan memilih 25 jurnal yang sesuai dengan ruang lingkup tinjauan pustaka ini.

Dalam tinjauan pustaka ini, penulis akan memberikan sekilas informasi mengenai patogenesis hemofilia pada bagian awal tinjauan pustaka ini. Kemudian, penulis membahas mengenai teknik iPSC dan CRISPR-Cas9 serta

potensinya dalam mengatasi etiologi hemofilia.

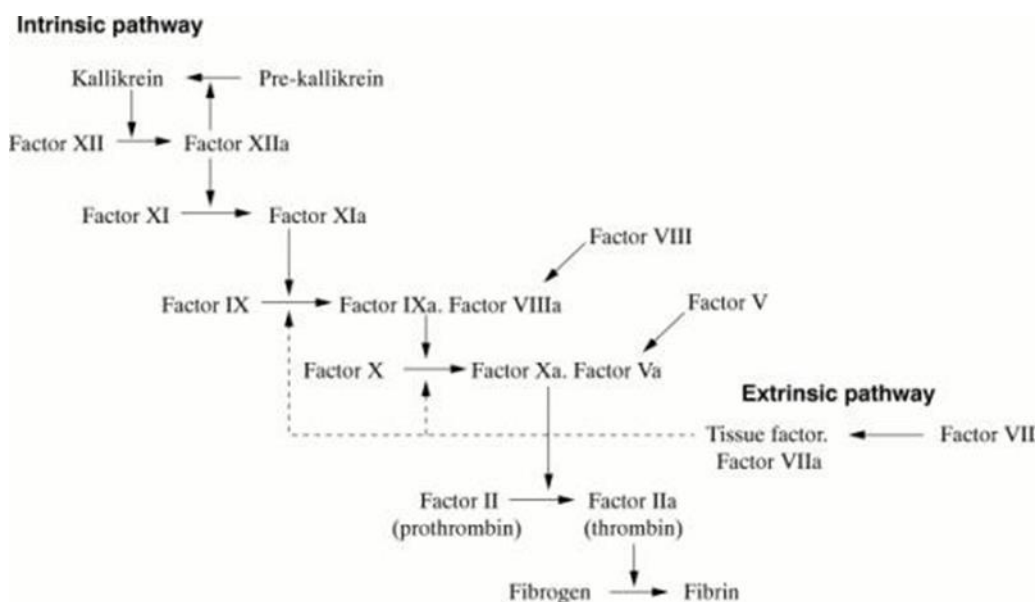
HASIL DAN PEMBAHASAN

Patogenesis molekular dan genetik hemofilia

Hemofilia merupakan penyakit gangguan pembekuan darah yang bersifat hereditas^[8] Hemofilia merupakan salah satu *Inherited bleeding disorders* (IBDs) tersering.^[9] Penderita hemofilia mengalami pemanjangan waktu perdarahan dan komplikasi yang berat dapat menyebabkan perdarahan pada sendi, otot, otak dan organ internal lainnya. Bentuk gejala yang ringan sering tidak menimbulkan perdarahan yang spontan sampai adanya perdarahan yang abnormal akibat operasi atau luka yang berat.^[10] Penyakit ini diturunkan secara *X-linked* resesif, sehingga hemofilia sering terjadi pada pria.^{[8],[10]} Pasien hemofilia sering didiagnosis pada usia dibawah 2 tahun.^[9]

Faktor VIII dan faktor IX merupakan protein yang bersirkulasi sebagai prekursor inaktif yang teraktivasi saat proses hemostatik, melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik pada kaskade koagulasi. Faktor VIII adalah protein kofaktor dan faktor IX adalah serin protease dengan syarat mutlak untuk faktor VIII sebagai kofaktor. Selanjutnya terjadi aktivasi dan kehadiran dari ion kalsium, permukaan fosfolipid, faktor VIII dan faktor IX yang membentuk kompleks aktif dan kompleks tenase yang mengaktivasi faktor X. Tahap selanjutnya pada kaskade terjadi, dengan puncak saat deposisi fibrin dan struktur polimer dari darah membeku.^[11]

Defisiensi atau disfungsi dari faktor VIII atau faktor IX dapat menghambat aktivasi dari faktor X, sehingga tahap kaskade koagulasi juga terganggu.



Gambar 1. Skema jalur intrinsik dan ekstrinsik dari kaskade koagulasi.^[11]

Faktor VIII dan faktor IX terdapat pada gen di kromosom X: gen faktor VIII terletak pada ujung lengan panjang Xq28; gen faktor IX juga terletak pada lengan panjang mendekati sentromer pada Xq27.^[11]

Penggunaan analisis tautan diikuti deteksi *Long Polymerase Chain Reaction* (LPCR) dari dua mutasi tersering pada gen F8 didapatkan inversi dari intron 1 atau intron 22 disebabkan oleh rekombinasi homolog dengan satu dari kedua salinan ekstragenik. Inversi ini berperan pada dasar molekular pada 45-50% penderita hemofilia A berat. Pada kasus inversi negatif dan pasien dengan hemofilia ringan atau sedang, beberapa polimorfisme pada gen F8 mungkin terdeteksi.^[12]

Induced pluripotent stem cells (iPSC)

Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) merupakan sekumpulan sel yang memiliki kemampuan untuk menjadi sel yang baru dan dapat berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel dewasa. Kemampuan iPSCs diperkirakan akan menjadi harapan untuk perkembangan

ilmu kedokteran di masa yang akan datang. iPSCs dapat berasal dari sel somatik manusia yang kemudian di program kembali untuk menjadi sel yang berbeda.^[13]

Pengembangan pemrograman sel somatik menjadi iPSCs dilakukan melalui pendekatan empat komponen utama yaitu sumber sel yang digunakan, teknik pemberian faktor transkripsi, faktor untuk melakukan reprogram, dan karakteristik dari iPSCs yang terbentuk.

Sel somatik yang diambil untuk dijadikan iPSCs awalnya menggunakan sel fibroblast kemudian berlanjut ke penggunaan *Peripheral Blood* (PB) dan *Cord Blood* (CB).^[14] Perkembangan ilmu penelitian telah menemukan bahwa sel epitel yang ada pada urin merupakan sumber terbaik untuk dijadikan sebagai iPSCs. Selain itu sel urin juga memiliki keunggulan dalam *accessibility* and *availability* sel.^[15]

Metode pemberian factor transkripsi memainkan peran yang penting dalam iPSCs. Sistem pemberian secara retroviral merupakan yang pertama kali dilakukan, tetapi cara ini

memiliki kekurangan dalam hal pengenalan terhadap regio lokus yang spesifik, sehingga dapat menyebabkan mutasi *insertional* atau membentuk suatu teratoma. Sistem pemberian secara lentiviral dapat menangani pembentukan tumor dan baik digunakan dalam melakukan reprograman, disertai dengan metode *non-integrating* untuk mengurangi penyimpangan pada kromosom dari sel host. Penelitian telah dilakukan pada Adenovirus, Sendai virus, *polycistronic mini circle vectors*, dan *autonomous episome*, tetapi hasilnya kurang efisien. Sistem dox lentiviral dan single poly cistronic vectors diketahui dapat mengurangi peluang untuk pembentukan tumor.^[16] Metode pemberiannya dilakukan secara langsung supaya dapat mengurangi risiko perubahan genetik melalui penggunaan *poly arginine protein tagged transduction domain*. Tetapi cara ini membutuhkan banyak waktu dalam prosesnya.^[17]

Proses reprogram yang dilakukan dengan menggunakan beberapa faktor reprogram seperti Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc, (OSKM), disebut juga dengan Yamanaka's cocktail. Setiap faktor Yamanaka memiliki fungsi khusus. Oct3/4 atau POU5F1 akan merangsang dediferensiasi ke arah endoderm dan mesoderm primitif. Sementara Sox2 akan membentuk ektoderm primitif (epiblast). Sedangkan c-Myc akan memunculkan sifat pluripoten sel punca embrional. Faktor-faktor transkripsi tersebut berperan pada pertumbuhan, diferensiasi, dan proliferasi sel. Over-ekspresi faktor-faktor tersebut akan diimbangi Klf4 yang lebih dihubungkan dengan sifat supresor.^[18]

Mengetahui sel yang terbentuk merupakan hal yang penting dalam menentukan apakah iPSCs berhasil

dibentuk atau tidak. Beberapa marker telah digunakan untuk dijadikan memiliki dan mengkarakteristikan dari kolon iPSCs. Penggunaan dari marker positif (alkaline phosphatase, SSEA- 4, Tra1-81, Oct4, dan lain-lain) yang dikombinasikan dengan marker negatif CD44 dan digunakan untuk memilih koloni iPSCs yang spesifik.^[19]

Mekanisme kerja *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated nuclease 9 (CRISPR-Cas9)*

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) adalah nukleotida pendek yang umumnya ditemukan pada genom dari bakteri dan archea yang berfungsi untuk menghapus elemen genetik eksogen (EGEs) yang bergabung dengan protein Cas9.^[20] CRISPR dapat juga disebut CRISPR/Cas9 *genome-editing system* yang memiliki komponen inti *guide RNA (gRNA)* dan Cas9. gRNA terdiri dari dua bagian yaitu region variabel dan dasar scaffold. Pembentukan CRISPR terdiri dari 18-20 nukleotida yang dapat berikatan dengan DNA target.^[21]

CRISPR/Cas9 memiliki kemampuan untuk melakukan manipulasi gen seperti *gene knockout*, *gene knockin*, *gene interference* atau *activation*.^[22] *Gene knockout* merupakan teknik manipulasi gen yang menyebabkan suatu organisme membawa gen yang telah dinonaktifkan. Organisme ini disebut juga *knock-out organism*. Gen yang sudah dinonaktifkan ini kemudian fungsinya digantikan oleh gen lain yang sudah disusun yang disebut juga metode *gene knockin*.^[23] Selain gen knockout, CRISPR/Cas9 juga mampu memberikan semacam gangguan terhadap gen target kemudian memberikan suatu faktor transkripsi kepada gen tersebut sehingga aktif menjadi suatu gen yang lain, kemampuan ini disebut juga sebagai *gene interference*.

CRISPR/Cas9 memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan *genome-editing system* yang lain seperti *zinc-finger nucleases (ZFNs)* dan *transcription activator like effector nuclease (TALEN)* yang terdapat pada pluripoten stem sel dan somatik stem sel. Keuntungan pertama adalah CRISPR/Cas 9 lebih mudah digunakan daripada ZNF dan TALEN karena spesifitasnya hanya berhubungan dengan kompleks nukleotida.^[8] Keuntungan kedua hanya dibutuhkan biaya yang sedikit untuk memediasi plasmid dari CRISPR/Cas9. Ketiga adalah proses pengeditan genom lebih cepat dilakukan (dapat dilakukan dalam dua minggu).^[24]

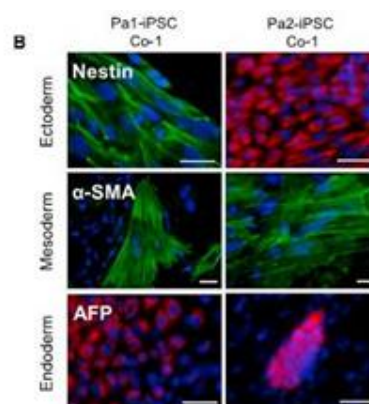
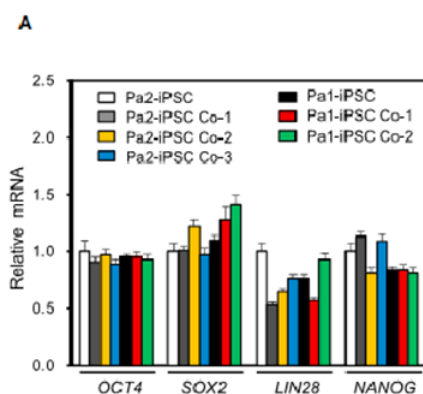
Potensi kombinasi iPSC dengan gen editing CRISPR-Cas9 pada pengobatan hemofilia

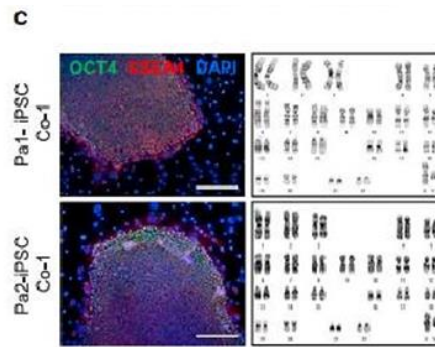
Penggunaan iPSC dari pasien hemofilia yang telah dilakukan rekayasa genetik dengan menggunakan CRISPR-Cas9 telah terbukti memiliki potensi dalam pengobatan hemofilia. Hal ini dapat dilihat pada penelitian yang dilakukan oleh Park CY, *et al.* Pada penelitian tersebut dilakukan pengambilan sel somatik dari pasien hemofilia A yang tidak memiliki hubungan keluarga. Dari 11 orang pasien, dilakukan pembacaan

genotip terhadap kromosomnya dan dipilih 1 orang dengan genotip inversi pada intron 1 gen F8 di kromosom X dan 2 orang dengan inversi pada intron 22. Dua mutasi ini dipilih karena hampir separuh dari seluruh penderita hemofilia A yang parah memiliki salah satu dari dua jenis mutasi ini.^[25]

Pasien yang dipilih diambil sel somatis yang berasal dari traktus urinarius didalam urin. Hal ini dipilih karena metode invasif pada pasien hemofilia harus dihindari. Sel somatis pasien ini kemudian diinduksi dengan 4 faktor Yamanaka melalui metode vektor episomal dan virus Sendai. iPSC yang dihasilkan kemudian diinduksi dengan CRISPR-Cas9 atau disebut juga dengan nama *RNA-guided engineered nucleases (RGENs)*. Terdapat dua macam RGEN yang dirancang sesuai dengan situs mutasi gen nya. Pada pasien dengan mutasi inversi pada intron 1 digunakan RGEN 01 dan pada pasien dengan inversi di intron 22 digunakan RGEN 02 dan RGEN 03.^[25]

Dari hasil pengamatan menggunakan PCR didapatkan hasil bahwa terjadinya pembalikan inversi menjadi susunan normal. Kemudian dilakukan pengujian juga terhadap sifat pluripoten stem sel tersebut





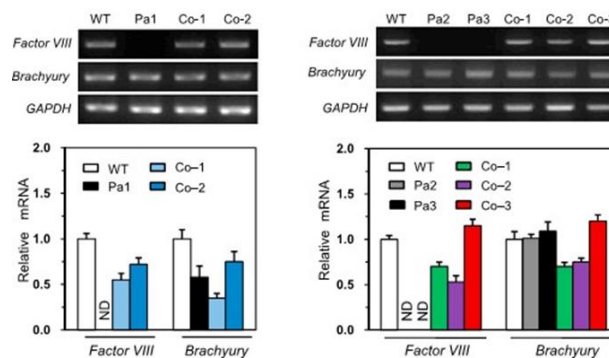
Gambar 2. Pengujian sifat pluripoten pada iPSC yang sudah dikoreksi.^[25]

(A) *Real-time* PCR kuantitatif dilakukan untuk mendeteksi *endogenous* OCT4, SOX2, LIN28, dan NANOG mRNAs. (B) Diferensiasi *in vitro* dari garis yang dikoreksi inversi. Ekspresi marker protein yang mewakili ektoderm (*Nestin*), mesoderm (aktin otot polos [α -SMA]), dan endoderm (α -fetoprotein [AFP]) ditunjukkan dalam garis yang dikoreksi. Diagram batang, 50 mm. (C) Ekspresi dari OCT4 dan SSEA4, *human ESC-specific markers*, terdeteksi oleh imunohistokimia.

Pada pemeriksaan ekspresi gen marker stem sel pada iPSC pasien hemofilia yang sudah dikoreksi, ditemukan adanya transkripsi aktif dari keempat gen marker (OCT4, SOX2, LIN28, dan NANOG) pada sel tersebut. iPSC yang sudah dikoreksi ini mampu berdiferensiasi menjadi tiga lapisan germinal primer. Pada pemeriksaan kariotipe, iPSC yang sudah dikoreksi juga menunjukkan hasil yang normal. Artinya dapat disimpulkan bahwa koreksi mutasi gen pada iPSC pasien hemofilia tidak berpengaruh negatif terhadap sifat pluripotennya.^[25]

Untuk melakukan pengukuran ekspresi gen F8 dilakukan diferensiasi pada iPSC pasien dan iPSC pasien yang

sudah dikoreksi menjadi mesoderm (sumber utama ekspresi gen f8 adalah endotel yang berasal dari mesoderm). Didapatkan hasil seperti pada gambar 3. Tidak ada pita PCR yang mengarah ke F8 terdeteksi pada sel yang didiferensiasi dari iPSC pasien yang menunjukkan bahwa F8 tidak diekspresikan dalam sel yang diturunkan dari pasien. Sebaliknya, pada iPSC yang sudah dikoreksi dapat dideteksi pita PCR F8. Hal ini membuktikan bahwa iPSC pasien yang sudah dilakukan koreksi mampu menyimpan kede genetik yang benar dan mampu mengekspresikan gen F8.^[25]



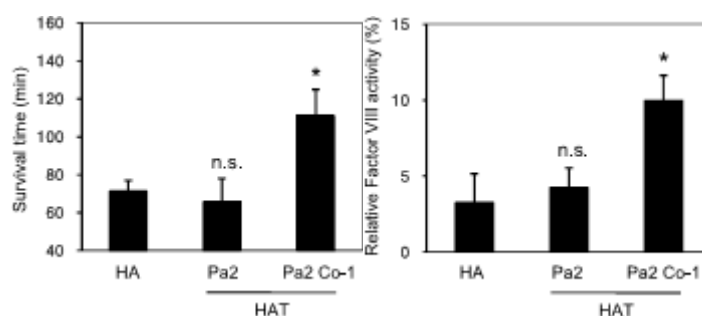
Gambar.3. Hasil ekspresi gen F8 pada iPSC pasien dan iPSC yang sudah dikoreksi.^[25]

Ekspresi gen F8 dalam sel dibedakan dari intron 1 dan 22 garis iPSC yang dikoreksi inversi. RT-PCR (sebelah atas) dan qPCR (sebelah bawah) digunakan untuk mendeteksi ekspresi F8 dan gen penanda mesoderm

(Brachyury) dalam sel yang berasal dari WT iPSCs, iPSCs pasien (Pa1, Pa2 dan Pa3), dan Pa1-(Co 1 dan Co2) yang sudah dikoreksi, atau Pa2-iPSCs (Co-1, Co-2 dan Co-3). Ekspresi GADPH digunakan sebagai *loading control*. Nd, tidak terdeteksi.

Terakhir dilakukan pengujian fungsionalitas iPSC yang sudah dikoreksi ini pada hewan percobaan. Pada tes ini dilakukan tes penjepitan ekor pada tikus hemofilia yang belum ditransplantasi ataupun yang sudah ditransplantasi iPSC pasien dan iPSC yang sudah dikoreksi. Pada tikus hemofilia

dengan iPSC yang sudah dikoreksi ada yang mampu selamat sampai dua hari dan sisanya mengalami peningkatan signifikan pada waktu bertahan hidup dibanding dengan tikus hemofilia yang tidak ditransplantasi atau tikus yang ditransplantasi iPSC pasien.^[25]



Gambar. 4. Pembebasan fungsional faktor VIII pada tikus hemofilia menggunakan iPSCs yang sudah dikoreksi.^[25]

Aktivitas F8 relatif pada tikus yang ditransplantasikan dengan iPSC yang sudah dikoreksi adalah 10% dibanding tikus WT, nilai ini secara signifikan lebih tinggi dari pada tikus yang tidak ditransplantasikan (3,3%) dan yang ditransplantasikan dengan sel yang berasal dari iPSC pasien (4,3%). Didapatkan kesimpulan bahwa defisiensi F8 pada tikus yang hemofilia dapat diselamatkan dengan transplantasi iPSC yang sudah dikoreksi.^[25]

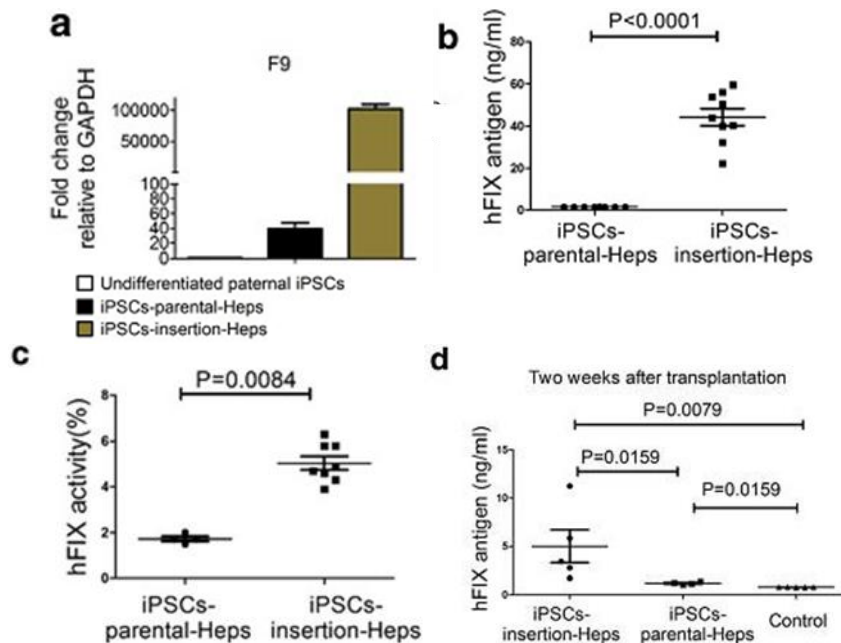
Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Lyu *et al* pada hemofilia B juga menunjukkan hasil yang baik. Pada penelitian tersebut digunakan iPSC yang berasal dari sel PBMNCs (*peripheral blood mononuclear cells*) pasien hemofilia B yang sudah dikonfirmasi adanya mutasi pada gen F9. iPSC yang dihasilkan kemudian dilakukan pengujian kariotipe

dan marker stem sel. Kariotipe normal dan ditemukan ekspresi OCT 4, SOX2, NANOG, TRA-1-60, dan SSEA4 pada iPSC yang dihasilkan dari pasien. iPSC yang dihasilkan kemudian dilakukan penyisipan cDNA F9 pada lokus AAVS1 menggunakan CRISPR- Cas9 dengan metode elektroporasi. Lokus AAVS1 merupakan suatu tempat di intron gen PPP1R12C di kromosom 19 yang aman untuk menyisipkan gen dari luar.^[1]

Setelah dipastikan bahwa kariotipe dan sifat pluripoten iPSC pasien hemofilia B yang sudah dikoreksi tersebut normal, selanjutnya dilakukan diferensiasi iPSC menjadi sel hepatosit. Dari pemeriksaan didapatkan bahwa ekspresi gen F9, kadar dan aktivitas antigen hFIX pada iPSC pasien yang sudah diinsersi jauh lebih tinggi dibanding dengan iPSC pasien yang tidak diinsersi. Dapat disimpulkan bahwa

hepatosit yang didiferensiasi dari iPSC pasien hemofilia B yang sudah diinsersi gen F9 mampu menghasilkan hFIX secara stabil.^[1] Hal ini menunjukkan adanya

potensi dimasa depan dari kombinasi iPSC dan CRISPR-Cas9 terhadap terapi hemofilia.



Gambar.5. Ekspresi gen F9, kada

r dan aktivitas antigen hFIX pada iPSC yang sudah diinsersi dan yang tidak diinsersi.^[1]

(a) qRT-PCR menunjukkan ekspresi F9 dalam iPSCs pasien yang tidak terdiferensiasi, iPSCs pasien yang sudah diinsersi gen F9. (b) Perbandingan tingkat antigen hFIX dalam sel kultur supernatan antara iPSCs pasien dan iPSCs pasien yang sudah diinsersi gen F9. (c) Perbandingan aktifitas hFIX dalam sel kultur supernatan antara antara iPSCs pasien dan iPSCs pasien yang sudah diinsersi gen F9. (d) Dua minggu setelah transplantasi, kadar antigen hFIX pada plasma tikus dari dalam kelompok antara iPSCs pasien dan iPSCs pasien yang sudah diinsersi gen F9, dan kelompok kontrol yang terdeteksi oleh ELISA

SIMPULAN

Berdasarkan pembahasan di atas dapat ditarik kesimpulan bahwa penggunaan iPSC dari pasien hemofilia yang dilakukan pengeditan gen dengan CRISPR- Cas9 memiliki potensi pada tatalaksana pasien hemofilia.

iPSC yang dihasilkan mampu mempertahankan sifat pluripotennya sekaligus berhasil diperbaiki kesalahan genetiknya. Sehingga iPSC yang dihasilkan tersebut mampu menghasilkan faktor koagulasi F8 atau F9.

Dibanding dengan terapi konvensional, terapi ini jauh lebih efektif.

Terapi ini tidak perlu dilakukan seumur hidup karena mampu mengatasi sumber permasalahan pada pasien hemofilia. Penggunaan iPSC juga memiliki keunggulan dibanding terapi gen lain, karena pada iPSC dihasilkan dari sel pasien sendiri sehingga tidak akan menimbulkan reaksi penolakan.

DUKUNGAN FINANSIAL

Penulis tidak mendapat dana bantuan dalam penelitian ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada pihak-pihak yang terlibat dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lyu C, Shen J, Wang R, Gu H, Zhang J, Xue F, *et al.* Targeted genome engineering in human induced pluripotent stem cells from patients with hemophilia B using the CRISPR-Cas9 system. *Stem Cell Res Ther.* (2018) 9:92.
2. Zaiden R, Nagalla S. Hemophilia A [Internet]. 2016 [cited 25 April 2016] Available from:<http://emedicine.medscape.com/article/779322->
3. Zaiden R, Nagalla S. Hemophilia B [Internet]. 2016 [cited 25 April 2016] Available from:<http://emedicine.medscape.com/article/779434->
4. Nienhuis AW, Nathwani AC, Davidoff AM. Gene therapy for hemophilia. *Mol Ther.* 2017;25(5):1163 – 7
5. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, *et al.* Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med.* 2014;371(21):1994 – 2004.
6. Indra K, Nurhadi I. Induksi Sel Somatik Menjadi Sel Punca Pluripoten. *CDK 2011;* 38(5)327-334.
7. Xue HY, Ji LJ, Gao AM, Liu P, He JD, Lu XJ. CRISPR-Cas9 for medical genetic screens: applications and future perspectives. *J Med Genet.* 2016;53(2):91 – 7.
8. Ikatan Dokter Anak Indonesia. Pedoman Pelayanan Medis. 2009
9. Data & Statistics on Hemophilia. [Internet] 2019 [cited 5 February 2019] Available from:<https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/data.html>.
10. Hemophilia. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/hemophilia>. Diakses 5 Februari 2019
11. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. 2002;
12. Jayandharan GR, Srivastava A, Srivastava A. Role of Molecular Genetics in Hemophilia: From Diagnosis to Therapy. 2012;1(212):64–78.
13. Singh, Vimal, Kumar, Neeraj, Kalsan, Manisha, Saini, Abhishek, Chandra, Ramesh. Mechanism of Induction: Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *J Stem Cells.*2015;10(1):43-62
14. Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier LS, Han DW, Glage S, Miller K, Fischer P, Schöler HR, Martin U. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 2009; 5(4): 434-41.
15. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J, Wang Y, Zhang Y, Zhuang Q, Li Y, Bao X, Tse HF, Grillari J, Grillari-Voglauer R, Pei D, Esteban MA. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nature Protocols* 2012; 7(12):2080–2089.
16. Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(1): 157–162.
17. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 381-4.
18. Indra K, Nurhadi I. Induksi Sel Somatik Menjadi Sel Punca Pluripoten. *CDK 2011;* 38(5) 327-334.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan dalam pelaksanaan penelitian ini.

19. Quintanilla RH, Asprer JST, Vaz C, Tanavde V and Lakshmipathy U. CD44 Is a Negative Cell Surface Marker for Pluripotent Stem Cell Identification during Human Fibroblast Reprogramming. *PLoS ONE*. 2014; 9(1): e85419
20. van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, and Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR- Cas systems. *Nat. Rev Microbiol*. 2014 .12, 479–492.
21. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, and Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 2009;155, 733–740.
22. Wang H, La Russa M, and Qi LS. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* 2016; 85: 227–264.
23. Baranwal, Deepak, Singh, Prakash, Kumar S, Ramesh, Solankey SS. Gene knockout technology and its application. *Biologix*.2013;2:55-69.
24. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, and Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013;8: 2281–2308.
25. Park CY, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, Kim JH, Kim DW, and Kim JS. Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 2015 Aug 6;17(2):213-20.