

Uji Diagnostik Virus Hepatitis B dan CRISPR-Cas Sebagai Alternatif: Sebuah Tinjauan Pustaka

Hepatitis B Virus Diagnostic Tests and CRISPR-Cas as Alternative: A Literature Review

Jeanne E Christian*, Hartiyowidi Yulawuri, Natalia Gunawan, Yolanda Charlotte
Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Institut Teknologi Calvin,
Jakarta, Indonesia

Calvin Tower RMCI Jl. Industri Blok B14, Kav. 1, RW.10, East Pademangan,
Kemayoran, Central Jakarta City, Jakarta 10610

*Penulis korespondensi

Email: jeanne.elviac@gmail.com

Received: December 28, 2022

Accepted: January 29, 2024

Abstrak

Infeksi virus hepatitis B (VHB) kronis ditandai dengan keberadaan *covalently closed circular DNA* (cccDNA) VHB. Metode diagnostik VHB umumnya berbasis molekuler dan serologi, tetapi metode ini memiliki kekurangan terutama di dalam mendeteksi jumlah cccDNA VHB yang rendah, mendeteksi VHB di awal tahapan infeksi, dan membedakan cccDNA dari *relaxed circular DNA* (rcDNA). Artikel ini bertujuan untuk membandingkan sistem diagnostik konvensional (molekuler dan serologi) dengan sistem diagnostik berbasis CRISPR-Cas yang dapat menjadi alternatif uji diagnostik VHB. Metode penelitian menggunakan studi literatur mengenai diagnostik VHB secara konvensional dan metode CRISPR-Cas untuk VHB yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Prinsip metode CRISPR dalam sistem penyuntingan genom melibatkan *CRISPR-associated nuclease* (Cas) dalam memodifikasi nukleotida asing yang bekerja dalam tiga tahapan yaitu adaptasi, ekspresi, dan intervensi. Beberapa penelitian penggunaan CRISPR-Cas dalam diagnostik VHB menunjukkan bahwa CRISPR-Cas dapat mendeteksi cccDNA VHB dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Simpulan adalah metode CRISPR-Cas dapat dikembangkan sebagai alternatif uji diagnostik infeksi VHB.

Kata kunci: CRISPR-Cas; cccDNA; diagnostik; VHB

How to Cite:

Christian JE, Yulawuri H, Gunawan N, Charlotte Y. Uji diagnostik virus hepatitis B dan CRISPR-Cas sebagai alternatif: sebuah tinjauan pustaka. *Journal of Medicine and Health*. 2024; 6(1): 103-14. DOI: <https://doi.org/10.28932/jmh.v6i1.5959>

© 2023 The Authors. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License. 

Review Article

Abstract

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is characterized by the presence of HBV covalent closed circular DNA (cccDNA). HBV diagnostic methods are generally molecular and serologic based, but these methods have disadvantages especially in detecting low levels of HBV cccDNA, detecting HBV early in the infection stage, and distinguishing cccDNA from relaxed circular DNA (rcDNA). This article aims to compare conventional diagnostic systems (molecular and serology) with CRISPR-Cas-based diagnostic systems that can be an alternative to HBV diagnostic test. The research method used literature studies regarding HBV conventional diagnostics and CRISPR-Cas methods for HBV that met the inclusion and exclusion criteria. The principle of the CRISPR method in the genome editing system involves CRISPR-associated nuclease (Cas) in modifying foreign nucleotides that work in three stages, namely adaptation, expression, and intervention. Several studies using CRISPR-Cas in HBV diagnostics showed that CRISPR-Cas can detect HBV cccDNA with high sensitivity and specificity. In conclusion, the CRISPR-Cas method can be developed as an alternative test for HBV infection.

Keywords: CRISPR-Cas; cccDNA; diagnostic; HBV

Pendahuluan

Kematian akibat infeksi virus hepatitis B masih tinggi dengan estimasi terjadi 820.000 kematian di seluruh dunia pada tahun 2019.¹ Hepatitis B merupakan virus DNA memiliki *envelope* dengan material genetik berupa DNA sirkular rantai ganda sebagian atau disebut rcDNA (*relaxed circular DNA*) dengan panjang sekitar 3,2 kilobasa. Dalam inti nukleus sel inang, rcDNA akan dimodifikasi oleh faktor-faktor selular dan dikonversi menjadi *covalently closed circular DNA* (cccDNA). Virus ini dapat menyebabkan penyakit hati akut dan kronis seperti sirosis dan karsinoma hepatoselular. Infeksi Hepatitis B kronis ditandai dengan persistensi viral cccDNA.²⁻⁴

Pengobatan spesifik untuk kasus infeksi hepatitis B akut masih belum ada. Pengobatan biasanya ditujukan bagi hepatitis B kronis menggunakan antivirus oral yang hanya akan memperlambat kemajuan sirosis dan meningkatkan ketahanan hidup. Oleh karena itu pencegahan dan diagnosis diharapkan dapat menekan jumlah kasus infeksi virus hepatitis B. Pencegahan dapat dilakukan dengan pemberian vaksinasi dan penggunaan profilaksis antiviral. Diagnosis hepatitis B dapat digunakan untuk membedakan infeksi akut dan kronis. Individu yang terkena infeksi kronis hepatitis B seringkali tidak menyadari status penyakitnya dan diagnosis yang terlambat dapat menyebabkan komplikasi penyakit yang lebih parah lagi. Tantangan diagnosis VHB kronis yaitu diperlukan metode deteksi dengan sensitivitas tinggi untuk mendeteksi cccDNA VHB yang memiliki jumlah sangat rendah (0,1-1 kopi per hepatosit) dan mampu membedakan cccDNA dari *relaxed circular DNA* (rcDNA).⁵⁻⁷

Diagnosis infeksi hepatitis B biasanya menggunakan metode serologi untuk mendeteksi keberadaan HBsAg dan molekuler untuk mendeteksi DNA VHB.⁶ Akan tetapi metode-metode ini memiliki kekurangan seperti sensitivitas dan spesifisitas, perlunya peralatan yang mahal serta

Review Article

keahlian dari personel yang mengerjakannya. Terdapat uji diagnostik VHB berbasis CRISPR-Cas yang belum banyak dikembangkan untuk mendeteksi virus hepatitis B. Kelebihan dari sistem uji tersebut antara lain deteksi cccDNA yang lebih sensitif dibandingkan uji serologi. Uji yang lebih sensitif diharapkan dapat memberikan hasil yang akurat.^{5,8} Artikel ini bertujuan untuk membandingkan sistem diagnostik konvensional (molekular dan serologi) dengan sistem diagnostik berbasis CRISPR-Cas yang dapat menjadi alternatif uji diagnostik VHB.

Metode

Penelitian menggunakan metode studi literatur. Artikel yang digunakan yaitu studi penelitian atau *review* mengenai diagnostik VHB secara konvensional dan metode CRISPR-Cas untuk VHB dari tahun 2014 hingga tahun 2023 serta artikel atau panduan dari laman resmi seperti *World Health Organization (WHO)*, *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, dan *StatPearls Publishing LLC-National Center for Biotechnology Information (NCBI) Bookshelf*.

Kriteria inklusi yang ditetapkan yaitu artikel internasional terindeks Scopus dan artikel nasional yang ditulis dalam bahasa Indonesia atau Inggris terindeks Sinta serta artikel atau panduan yang berasal dari laman resmi. Kriteria eksklusi untuk penelitian ini yaitu artikel mengenai patogenesis dan pengobatan infeksi VHB.

Hasil dan Diskusi

Diagnostik Virus Hepatitis B

Dikarenakan infeksi VHB kronis bersifat asimtomatik, maka uji diagnostik VHB yang cepat dan akurat sangat diperlukan dalam meningkatkan informasi mengenai jumlah orang yang terinfeksi. Kurangnya kesadaran untuk melakukan diagnosis HBV di masyarakat dapat menghambat skrining infeksi HBV, pencegahan penularan (seperti vaksinasi), tatalaksana medis untuk infeksi kronis VHB, dan pengobatan hepatitis B.⁹

Deteksi VHB dapat menggunakan dua uji, yaitu uji serologi dan molekuler. Uji serologi merupakan uji yang dilakukan untuk mengukur kekebalan tubuh seseorang terhadap virus hepatitis B pada beberapa antigen dan antibodi virus.^{5,7} Uji molekuler adalah suatu metode untuk mendeteksi keberadaan VHB dan menghitung jumlah (kuantifikasi) viral load. Uji molekuler juga dapat digunakan untuk kuantifikasi mutasi pada *precore*/promotor inti (*core*) dan resistensi antivirus terhadap pengobatan/terapi, serta genotip dari VHB.^{7,10}

Karakterisasi infeksi VHB dalam diagnosis diperlukan untuk mengetahui tahapan infeksi. Terdapat *marker*/penanda deteksi antara lain HBeAg, antibodi terhadap hepatitis B daerah *envelope* dan *surface* (anti-HBe dan anti-HBs), daerah *core* (anti-HBc total dan anti-HBc IgM),

Review Article

serta DNA VHB.¹¹ Keberadaan DNA VHB digunakan untuk mengukur *viral load* yang menyatakan aktivitas replikasi virus aktif. DNA VHB mungkin dapat terdeteksi pada awal infeksi sebelum HBsAg.^{5,7}

Tahap infeksi akut atau kronis dapat dilihat dari keberadaan *marker* deteksi seperti HBsAg dalam darah. Pada infeksi akut, keberadaan HBsAg dalam darah setelah seseorang terpapar akan terdeteksi pada 1-2 minggu, maksimal 11-12 minggu, dan kemudian diikuti dengan keberadaan HBeAg. Adanya HBeAg menandakan replikasi virus yang tinggi dalam sel hepatosit. Antibodi terhadap HBeAg kemudian akan muncul dan terjadi penurunan jumlah HBsAg dan HBeAg pada minggu ke-24 hingga 36.⁵

Setelah HBsAg terdeteksi, anti-HBc dapat muncul dengan cepat pada 1-2 minggu. Kehadiran anti-HBc juga menunjukkan adanya infeksi terhadap VHB sebelumnya atau sedang berlangsung dalam jangka waktu yang tidak dapat ditentukan. Pada seseorang yang terinfeksi hepatitis B, anti-HBc IgM pada orang tersebut adalah positif. Hal ini menunjukkan juga bahwa orang tersebut baru terinfeksi VHB (< 6 bulan) yang menunjukkan infeksi akut. Selain anti-HBc, terdapat anti-HBs yang berfungsi untuk melindungi dari infeksi mulai terdeteksi pada minggu ke-32 setelah infeksi dan muncul setelah HBsAg menghilang. Anti-HBs yang terdeteksi mengindikasikan adanya proses pemulihan dan kekebalan seseorang terhadap infeksi VHB. Anti-HBs juga dapat berkembang pada seseorang yang telah mendapatkan vaksin hepatitis B.^{5,12} Pada infeksi kronis, antibodi anti HBeAg akan muncul lebih lama dan keberadaan HBeAg serta HBsAg akan terus ada lebih dari 6 bulan. Antibodi anti-HBc dapat muncul dengan cepat lalu menghilang, tetapi dapat muncul kembali setelah beberapa waktu.⁵

Uji Berbasis Molekuler dan Serologi

Beberapa metode uji molekuler dan serologi yang dapat digunakan untuk skrining dan diagnosis VHB pada seseorang yang diduga terinfeksi, yaitu:

1. *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR)

PCR merupakan metode deteksi berbasis molekuler yang dapat digunakan dalam deteksi dan kuantifikasi genom virus VHB. Metode qPCR ini dapat mendeteksi hingga 2×10^3 - 2×10^{12} kopi/mL DNA. Jika dibandingkan antara PCR dengan ELISA, metode deteksi dengan menggunakan PCR lebih sensitif dan dapat diandalkan karena tidak semua kasus positif yang telah diuji dengan metode ELISA mengonfirmasi infeksi VHB.^{13,14} Prinsip kerjanya, setelah selubung virus lisis, DNA VHB ditangkap oleh *probe* oligonukleotida dan terikat pada mikropartikel magnetik. Metode ini selain dapat digunakan untuk deteksi dan kuantifikasi DNA VHB, dapat juga digunakan untuk menentukan pengobatan yang tepat bagi pasien dengan hepatitis B kronis,

Review Article

pemilihan terapi yang optimal dan sesuai, memantau efektivitas pengobatan yang diterima oleh pasien dan penilaian resistensi VHB terhadap pengobatan dengan analog nukleotida (lamivudine, adefovir, entecavir, tenofovir). Akan tetapi metode ini menunjukkan hasil negatif palsu pada sampel yang mengandung konsentrasi DNA VHB rendah yaitu < 20 IU/mL.^{15,16}

2. *Rolling Circle Amplification (RCA)*

RCA dinamakan juga amplifikasi percabangan dengan metode bergantung pada DNA polimerase faga *phi29* yang memiliki aktivitas eksonuklease 3' yang kuat. DNA polimerase *phi29* memiliki kemampuan untuk mempolimerisasi > 70.000 nukleotida tanpa terlepas dari *template* dan dapat menggantikan rantai yang sebelumnya terelongasi. Hasil dari RCA menunjukkan bias amplifikasi yang lebih kecil dan hasil yang lebih besar, produk panjang, dan fidelitas dari metode PCR. Selain itu metode ini mampu mendeteksi cccDNA VHB dari pasien dengan jumlah virus yang rendah hingga 10^2 - 10^{10} kopi/mL dan dapat juga digunakan untuk uji fenotipik varian VHB untuk terapi antiviral.^{14,17}

3. *Digital Droplet PCR (ddPCR)*

Prinsip metode ini berdasarkan teknologi droplet emulsi air-minyak yang mana sampel dipartisi ke dalam 20.000 droplet, setiap droplet mewakili mikro-reaktor untuk reaksi PCR sehingga keberadaan target diungkap oleh emisi fluoresen. Pendekatan metode ini memiliki sensitivitas yang tinggi dengan kuantifikasi yang akurat serta tidak bergantung pada reaksi PCR dan kurva standar sehingga mampu digunakan untuk kuantifikasi asam nukleat dengan jumlah yang rendah yaitu 1 - 10^6 kopi DNA. DdPCR dapat mengkuantifikasi 89,8% pasien dengan DNA VHB serum < 20 IU/mL dan pada 66,7% pasien dengan DNA VHB yang tidak terdeteksi.^{14,18}

4. *Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*

Teknik LAMP merupakan suatu metode amplifikasi asam nukleat pada enam daerah sekuens target yang menggunakan 4 primer spesifik dan Bst DNA *polymerase* pada suhu 65°C . LAMP mendeteksi gen NDM-1. LAMP merupakan metode deteksi VHB yang cepat, sederhana, spesifik, dan sensitif. Metode deteksi dengan LAMP ini belum banyak digunakan karena untuk meningkatkan efisiensi diagnosis perlu dikombinasikan dengan teknologi yang lain, sehingga perlu mengeluarkan biaya yang lebih untuk mendeteksi VHB. Selain itu LAMP juga memiliki kelemahan lain seperti kontaminasi silang ketika tutup tabung reaksi dibuka untuk elektroforesis gel atau pada saat penambahan pewarna untuk visualisasi hasil.¹⁹

5. *Rapid Test Diagnostic (RDT)*

RDT merupakan metode untuk skrining dan prognosis pasien yang terinfeksi VHB secara kualitatif. Tujuan RDT yaitu mendeteksi kadar antigen target yang ada pada darah pasien asimtomatik. Metode deteksi dengan RDT ini digunakan karena biaya yang lebih rendah jika

Review Article

dibandingkan dengan berbagai metode diagnosis VHB lainnya. RDT digunakan untuk mendeteksi berbagai penanda serologi VHB, seperti HBsAg, anti-HBcAb, HbeAg, dan anti-HBeAb. RDT untuk HBsAg menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas yang optimal, sedangkan RDT untuk anti-HBeAg menunjukkan sensitivitas yang masih dapat diterima dan spesifisitas yang sangat baik, sehingga dapat digunakan untuk membedakan status HBeAb.²⁰ Suatu studi memperlihatkan bahwa RDT tidak cukup sensitif untuk mengonfirmasi status infeksi VHB pada donor dari transfusi darah dibandingkan dengan ELISA. Untuk hasil sampel yang positif mengandung HBsAg akan terbentuk dua garis merah pada titik di daerah C dan T, yang mana garis tersebut menunjukkan reaksi antara HBsAg dengan Anti-HBsAg yang sudah dilapisi dengan konjugat koloidal.^{21,22}

6. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

ELISA merupakan uji serologi untuk mendeteksi antibodi berdasarkan prinsip ikatan antigen-antibodi yang spesifik dalam suatu sampel. Metode deteksi dengan ELISA dapat dilakukan secara kuantitatif maupun kualitatif. Selain untuk mendeteksi VHB, ELISA juga dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi terhadap hepatitis C.¹⁹ Untuk mendeteksi HBsAg pada sampel yang terinfeksi VHB, teknik uji ELISA yang digunakan adalah teknik *sandwich* ELISA. Pada teknik ini antibodi penangkap antigen dilapisi ke lubang pelat dan diikat pada fase padat. Antigen akan berada di antara dua lapisan antibodi penangkap dan pendeteksi. Teknik ini memiliki sensitivitas dan spesifisitas tertinggi di antara teknik ELISA lainnya, tidak menggunakan radioisotop dan reagen yang digunakan stabil dengan sensitifitas yang cukup baik jika dibandingkan dengan metode deteksi dengan *Radioimmunoassay* (RIA). Namun kekurangan yang dimiliki oleh teknik *sandwich*-ELISA ini adalah membutuhkan waktu dan biaya yang cukup banyak.^{5,23}

7. *Southern blot*

Metode *Southern blot* dapat digunakan mendeteksi cccDNA ≥ 10 fg DNA ($\sim 2 \times 10^6$ kopi). Prosesnya melibatkan persiapan *probe*, elektroforesis, hibridisasi *transmembrane* dan deteksi. Keberadaan cccDNA harus diekstraksi terlebih dulu, kemudian baru didenaturasi dan dipotong endonuklease restriksi. Metode ini dapat diandalkan dan dapat direproduksi. Akan tetapi metode ini memiliki kekurangan yaitu lebih rumit, mahal, dan memerlukan waktu lama dibandingkan qPCR.¹⁴

Uji Berbasis CRISPR-Cas

a) Pengertian dan Tipe-tipe CRISPR-Cas

Salah satu teknologi penyuntingan genom yang sedang terus dikembangkan adalah CRISPR-Cas. Teknologi penyuntingan genom berbasis CRISPR-Cas pertama kali ditemukan pada tahun 2012 oleh Emmanuelle Charpentier dan Jennifer Doudna. Sejak penemuan CRISPR-Cas, para peneliti di seluruh dunia akhirnya turut mengembangkan CRISPR-Cas dan menyadari bahwa teknologi penyuntingan genom dengan CRISPR-Cas memiliki potensi yang besar, khususnya dalam pengembangan diagnostik penyakit infeksius.²⁴

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) merupakan sebuah sistem imun adaptif yang biasanya ditemukan pada arkea dan bakteri. Sistem imun adaptif merupakan sistem imun yang aktif terhadap pengenalan akan keberadaan suatu antigen dari sebuah sel tertentu. Setelah mengenali antigen, sistem imun akan merespons antigen tersebut. Dalam hal ini, CRISPR memiliki kemampuan untuk mengenali sel target yang spesifik dengan melakukan penargetan urutan DNA atau RNA pada sel target tersebut.²⁵

Aktivitas pengenalan sel target oleh CRISPR juga dibantu oleh enzim *Cas*. Enzim *Cas* akan bekerja sama dengan RNA pemandu atau *guide* RNA (crRNA) dan tracrRNA untuk memotong urutan DNA atau RNA target, khususnya pada bagian *protospacer* dari DNA atau RNA target. Setelah itu fragmen *protospacer* yang sudah dipotong akan disimpan pada bagian depan urutan crRNA yang disebut dengan *spacer*. Dengan demikian bakteri akan memiliki “memori” dari virus yang menginfeksi sehingga dapat meningkatkan sistem kekebalan bakteri. Enzim *Cas* yang berperan dalam proses pemasukan fragmen dalam *spacer* adalah enzim *Cas1* dan *Cas2*. Kedua enzim ini akan saling berintegrasi dalam upaya pelestarian informasi yang didapat selama proses infeksi berlangsung.^{25,26}

Terdapat hal penting yang perlu diperhatikan, yaitu urutan RNA pemandu harus memiliki panjang yang sesuai untuk mencapai tingkat spesifisitas yang baik. Menurut beberapa penelitian, semakin panjang urutan RNA pemandu, maka tingkat spesifisitasnya akan berkurang. CRISPR-Cas memiliki sistem tersendiri untuk meningkatkan spesifisitas dari RNA pemandu, yaitu dengan menggunakan pengikatan *Protospacer Adjacent Motif* atau PAM. PAM terdiri dari urutan DNA untai pendek yang terdapat di sepanjang wilayah target dan berdekatan dengan *protospacer*. Keberadaan PAM sangat memengaruhi jalannya proses pemotongan DNA yang dilakukan oleh enzim *Cas*. Hal tersebut dikarenakan PAM memiliki fungsi yaitu sebagai kode penanda spesifik dalam urutan basa nitrogen yang terdapat dalam DNA target. Selanjutnya enzim *Cas* akan secara spesifik mengenal daerah PAM, dengan kode penanda yang sesuai dengan pengenalan oleh enzim

Review Article

Cas. Bila daerah PAM tidak memiliki kode penanda urutan basa nitrogen yang dikenali oleh enzim Cas, maka enzim Cas tidak akan melakukan pemotongan atau pembelahan DNA.²⁶

Pembagian kelas dalam sistem CRISPR-Cas menjadi dua bagian, yaitu kelas 1 dan kelas 2. Salah satu perbedaan dari kedua sistem CRISPR-Cas ini terletak pada kompleks molekul efekturnya. Pada sistem CRISPR-Cas kelas 1, kompleks molekul efektor yang digunakan terdiri dari beberapa subunit, sedangkan pada sistem CRISPR-Cas kelas 2, kompleks molekul efektor yang digunakan hanya terdiri dari satu protein tunggal. Selain kompleks molekul efektor, kedua kelas sistem CRISPR-Cas juga terdiri dari beberapa tipe dan subtype yang berbeda.^{24,26}

CRISPR-Cas kelas 1 memiliki 3 tipe, yaitu tipe I, III, dan IV. Menurut beberapa penelitian, keberadaan CRISPR-Cas di alam sangat berlimpah dan biasa ditemukan pada arkea dan bakteri. Tipe I memiliki 9 subtype yang terdiri dari IA, IB, IC, ID, IE, IF1, IF2, IF3, dan IG. Dalam sistem CRISPR-Cas tipe I, efektor yang digunakan dikenal dengan istilah *Cascade* yang terdiri dari protein Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas11. Masing-masing protein ini mengandung molekul crRNA dan memiliki kemampuan mengenali PAM. Target dari tipe I adalah DNA untai tunggal. Kemudian untuk tipe III memiliki subtype yang dibedakan dari kompleks molekul efekturnya. Contohnya, untuk subtype III A, III D, III E, dan III F, kompleks molekul efektor yang digunakan adalah Csm (*Cas subtype mtube*). Sementara subtype III B dan III C menggunakan kompleks molekul efektor Cmr (*Cas module RAMP*). Protein Cas yang digunakan dalam tipe III adalah Cas10. Sama seperti protein Cas pada tipe I, protein Cas10 juga memiliki daerah crRNA yang memungkinkan adanya aktivitas pengenalan daerah target. Target dari tipe III adalah DNA/RNA. Tipe IV memiliki subtype IV A, IV B, dan IV C. Menurut beberapa penelitian, struktur dan target dari sistem CRISPR-Cas tipe IV masih dalam tahap observasi penelitian dan belum ditentukan secara keseluruhan. Protein yang digunakan dalam sistem tipe IV ini adalah Cas5, Cas6, Cas7, dan Csf1.^{27,28}

Sistem CRISPR-Cas kelas 2 memiliki tiga tipe, yang meliputi tipe II, tipe V, dan tipe VI. Keberadaan sistem kelas 2 di alam sangat minim dan hanya ditemukan pada filum bakteri. Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, sistem CRISPR-Cas kelas 2 hanya menggunakan kompleks molekul efektor yang terdiri dari satu protein tunggal. Hal tersebut membuat sistem ini memiliki tingkat kompleksitas yang lebih rendah daripada sistem CRISPR-Cas kelas 1. Selain itu, kompleksitas yang rendah juga membuat sistem ini sering digunakan dalam berbagai penelitian yang berhubungan dengan penyuntingan genom. Ketiga tipe dalam sistem ini memiliki kompleks molekul efektor yang berbeda. Pada tipe II, kompleks molekul efektor yang digunakan adalah Cas9, dengan subtype II A, II B, dan II C. Target dari tipe II adalah DNA untai ganda.^{27,29}

Review Article

Tipe V CRISPR-Cas kelas 2 memiliki tujuh subunit yang memiliki kompleks molekul efektor yang berbeda-beda. Ketujuh subunit ini meliputi subtype V-A (Cas12a (Cpf1)), V-B (Cas12b (C2c1)), V-C (Cas12c), V-E (Cas12e (CasX)), V-K (Cas12k (C2c5)), V-F (Cas14b) dan V-F(Cas14a)(8). Target dari tipe V adalah DNA untai ganda dan DNA untai tunggal. Selanjutnya, untuk tipe VI terdapat dua subtype, yaitu VI-A (Cas13a (C2c2)) dan VI-B1 (Cas13b (C2c6))(8). Target dari tipe VI adalah RNA untai tunggal.^{27,30}

b) CRISPR-Cas sebagai Alternatif Diagnostik VHB

Dalam pengembangan lebih lanjut mengenai diagnostik VHB, para peneliti menemukan salah satu cara dengan melakukan penyuntingan genom atau *genome editing*. Teknik deteksi yang sekarang digunakan biasanya berbasis teknik PCR dan serologi yang memiliki kekurangan seperti hasil negatif palsu pada sampel yang mengandung konsentrasi DNA VHB yang rendah dan ketidakmampuan teknik untuk mendeteksi keberadaan VHB atau antibodi anti-VHB pada tahap awal infeksi. Hal-hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya keterlambatan dan kesalahan dalam pemberian terapi serta meningkatkan risiko infeksi VHB.^{24,25}

Saat ini telah dikembangkan beberapa sistem uji diagnostik berbasis CRISPR-Cas untuk mendeteksi keberadaan berbagai macam penyakit infeksius, termasuk VHB. Sistem deteksi CRISPR-Cas membutuhkan sekuen pengikatan *Protospacer Adjacent Motif* atau PAM untuk mengidentifikasi target dsDNA. Fitur ini dapat meningkatkan spesifisitas pengenalan target, walaupun sekuen target yang dipilih menjadi terbatas. Akan tetapi, sekuen PAM dapat ditambahkan saat mendesain primer PCR sehingga diharapkan dapat mengurangi ketergantungan sekuen PAM pada sistem CRISPR-Cas.³¹ Berdasarkan beberapa tipe CRISPR-Cas, secara berturut-turut, terdapat 1, 11, 1, 20, 10 metode untuk CRISPR-Cas tipe I, II, III, V, dan VI.²⁸

Penggunaan sistem CRISPR-Cas untuk deteksi asam nukleat biasanya dengan 2 tahapan, yaitu pre-amplifikasi atau perbanyak asam nukleat dan penambahan kompleks protein efektor dan reporter.³¹ Beberapa metode yang telah dikembangkan untuk uji diagnostik hepatitis B virus berbasis CRISPR-Cas, seperti di bawah ini:

1. DETECTR

DNA-*endonuclease-targeted CRISPR transreported* (DETECTR) dikembangkan pada tahun 2018 oleh Doudna dkk. Metode ini merupakan gabungan antara tipe V dan tipe VI. DETECTR bergantung pada aktivitas kolateral protein Cas12a yang diaktifkan setelah pengenalan RNA target. Protein Cas12a akan mendegradasi semua molekul DNA yang berdekatan setelah mengenali ssDNA atau dsDNA target. Pengenalan asam nukleat patogen yang bergantung pada crRNA oleh Cas12a akan mengaktifkan aktivitas kolateral yang dapat menghancurkan *probe* DNA, jika ada reaksi antara Cas12a dengan crRNA target yang dilengkapi dengan reporter DNA

Review Article

untai tunggal (*probe*), yang kemudian dicampur dengan sampel biologis. Metode ini memiliki sensitivitas yang tinggi hingga 10^{-18} - 10^{-17} M.²⁸

2. SHERLOCKv2

Secara umum, diagnostik menggunakan SHERLOCK adalah diagnostik yang dilakukan dengan menggunakan sistem CRISPR-Cas tipe VI. Diagnostik ini telah banyak digunakan untuk mendeteksi beberapa penyakit yang disebabkan oleh virus seperti virus Zika, bakteri patogenik, virus *dengue*, dan lain-lain. Namun penelitian terbaru mengeluarkan versi lebih baru dari SHERLOCK, yaitu SHERLOCKv2. Bila dibandingkan dengan SHERLOCK, kelebihan diagnostik SHERLOCKv2 dapat dilihat dari kemampuannya mendeteksi empat target yang berbeda sehingga menjadikan SHERLOCKv2 memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi. Metode ini dapat mendeteksi hingga 8×10^{-21} M. Sama seperti SHERLOCK, SHERLOCKv2 menggunakan RPA/RT-RPA *amplification* dan T7 *transcription*, tetapi SHERLOCKv2 menggunakan setidaknya empat protein Cas13 yang diambil dari organisme yang berbeda.²⁸

3. HOLMESv2

HOLMES merupakan salah satu metode diagnostik lainnya yang dapat digunakan untuk diagnostik VHB. HOLMES memiliki persamaan dengan DETECTR, yaitu menggunakan protein Cas12a dalam melakukan deteksi DNA dan RNA. Kemudian metode diagnostik ini dikembangkan menjadi HOLMESv2 yang menggunakan metode amplifikasi *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP). Protein Cas yang digunakan dalam metode HOLMESv2 adalah Cas12b. Aktivitas dari Cas12b dinilai lebih tinggi daripada Cas12a, terutama pada dsDNA. Metode ini memiliki sensitivitas tinggi hingga 10^{-17} M.^{28,32}

4. PCR-based CRISPR Cas13a Systems

Sistem CRISPR-Cas13a merupakan salah satu metode diagnostik yang tidak memerlukan peralatan yang kompleks dan menggunakan '*reporter RNA*' yang universal sehingga dapat dideteksi oleh detektor fluoresen pada umumnya. Sistem ini menggabungkan dua metode, yang mana amplifikasi DNA menggunakan PCR sebelum dideteksi oleh CRISPR-Cas13a. PCR-CRISPR lebih sensitif dan spesifik dibandingkan penggunaan PCR dan qPCR, dapat meminimalisir asam nukleat yang hilang karena tahapan reaksi hanya sekali, dan dapat mendiagnosis OBI (*occult VHB infection*) pada seseorang yang biasanya memiliki jumlah DNA VHB dalam serum sangat rendah. Selain itu metode ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi mutasi resistansi obat pada konsentrasi dan frekuensi yang rendah saat tahap awal terinfeksi virus hepatitis B. Spesifik RNA CRISPR didesain untuk deteksi DNA VHB. Metode PCR-CRISPR dapat mendeteksi satu kopi per uji DNA VHB dengan crRNA VHB dalam waktu 15 menit setelah

Review Article

amplifikasi PCR. Metode ini mampu mendeteksi DNA VHB dalam jumlah yang rendah dalam sampel, yang mana metode qPCR tidak dapat mendeteksinya.^{16,28}

5. CRISPR/Cas13-assisted hepatitis B virus cccDNA detection

Metode deteksi cccDNA HBV dikembangkan menggunakan enzim *plasmid-safe ATP-dependent DNase* (PSAD) dan HindIII untuk memotong rcDNA dan DNA linear dua rantai. Fragmen cccDNA HBV diamplifikasi menggunakan RCA dan PCR dan deteksi gen target menggunakan sistem CRISPR-Cas13a. Satu kopi/uL cccDNA HBV setelah diamplifikasi dapat dideteksi dengan pembacaan fluoresen dibantu CRISPR/Cas13. Sistem deteksi berbasis CRISPR-Cas13a dapat meningkatkan laju positif cccDNA VHB di sampel jaringan hati pasien. Metode RCA-PCR-CRISPR memiliki tingkat positif 72,5%, paling besar di antara 4 metode lain (qPCR dengan tingkat positif 10%, PCR-CRISPR dengan tingkat positif 35%, RCA-qPCR dengan tingkat positif 45%, dan ddPCR dengan tingkat positif 45%) yang diuji pada 40 sampel jaringan hati pasien positif VHB. Metode ini dapat mendeteksi cccDNA yang sulit dideteksi di plasma, *whole blood*, dan sampel PBMC dari pasien positif VHB.²⁴

Metode deteksi menggunakan CRISPR-Cas menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yang mana dapat mendeteksi cccDNA VHB mulai dari satu kopi per uji DNA VHB. Metode ini terbukti lebih efisien dan lebih sederhana untuk dilakukan dibandingkan teknik konvensional lainnya sehingga kemungkinan bias dan kontaminasi silang dari sampel lebih sedikit.

Simpulan

Keberadaan diagnostik VHB dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi sangat penting dalam upaya mengendalikan infeksi akibat VHB. Beberapa penelitian menunjukkan sistem CRISPR-Cas memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk mendeteksi cccDNA HBV dalam jumlah kopi yang sangat rendah. Oleh karena itu, sistem CRISPR-Cas dapat menjadi alternatif uji diagnostik infeksi VHB.

Sistem CRISPR-Cas sebagai diagnostik dapat terus dikembangkan untuk dapat memajukan teknologi berbasis deteksi asam nukleat sehingga inisiasi terapi dapat cepat dilakukan dan dapat meningkatkan kesehatan secara global.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. Hepatitis B. 2022 [cited 2022 Jul 28]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
2. Yano Y, Utsumi T, Lusida MI, Hayashi Y. Hepatitis B virus infection in Indonesia. *World J Gastroenterol*. 2015;21(38):10714–20.
3. Zhang X, Tian Y, Xu L, Fan Z, Cao Y, Ma Y, et al. CRISPR/Cas13-assisted hepatitis B virus covalently closed

Review Article

- circular DNA detection. *Hepatol Int.* 2022;16(2):306–15.
4. Tsukuda S, Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res.* 2020;182:104925.
 5. World Health Organization. Guidelines on Hepatitis B and C testing. 2017. p30-32, 52-59.
 6. Centers for Diseases Control and Prevention. Viral Hepatitis. 2020 [cited 2022 Jul 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/hepatitis/populations/Born-Outside-United-States.htm>.
 7. Song JE, Kim DY. Diagnosis of hepatitis B. *Ann Transl Med.* 2016;4(18):338.
 8. Kaminski MM, Abudayeh OO, Gootenberg JS, Zhang F, Collins JJ. CRISPR-based diagnostics. *Nat Biomed Eng.* 2021;5(7):643–56.
 9. Zhou K, Terrault NA. Gaps in viral hepatitis awareness in the United States in a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(1):188-195.e4.
 10. Kim JH, Park YK, Park E-S, Kim K-H. Molecular diagnosis and treatment of drug-resistant hepatitis B virus. *World J Gastroenterol.* 2014;20(19):5708–20.
 11. Jackson K, Locarnini S, Gish R. Diagnostics of Hepatitis B Virus: Standard of Care and Investigational. *Clin Liver Dis.* 2018;12(1):5–11.
 12. Haber P and Schillie S. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases: Hepatitis B. 2021 [cited 2022 Jul 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hepb.html>.
 13. Kurdi M, Abughararah M, Mulike M, Yamani O, Bugdady M, Noor M. Molecular detection of hepatitis B virus (HBV) among voluntary ELISA positive blood donors in Almadinah Almunawwarah. *J Taibah Univ Med Sci.* 2014;9(2):166–70.
 14. Li X, Zhao J, QUAN Q, dan Xia N. Detection of HBV Covalently Closed Circular DNA. *Viruses.* 2017; 9: 139.
 15. Datta S, Chatterjee S, Veer V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol.* 2014;20(40):14615–25.
 16. Wang S, Li H, Kou Z, Ren F, Jin Y, Yang L, et al. Highly sensitive and specific detection of hepatitis B virus DNA and drug resistance mutations utilizing the PCR-based CRISPR-Cas13a system. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(3):443–50.
 17. Zhong YW, Hu SY, Xu C, Zhao YL, Xu DP, Zhao YQ, et al. A novel method for detection of HBVcccDNA in hepatocytes using rolling circle amplification combined with in situ PCR. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 608
 18. Permatteo L, Scutari R, Hirichiello R, Alkhatib M, Malagnino V, Bertoli A, et al. Droplet digital PCR assay as an innovative and promising highly sensitive assay to unveil residual and cryptic HBV replication in peripheral compartment. *Methods.* 2022; 201:74-81.
 19. Quoc NB, Phuong NDN, Chau NNB, Linh DTP. Closed tube loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis B virus in human blood. *Heliyon.* 2018;4(3):e00561. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00561>.
 20. Leathers JS, Pisano MB, Re V, Oord G van, Sultan A, Boonstra A, et al. Evaluation of rapid diagnostic tests for assessment of hepatitis b in resource-limited settings. *Ann Glob Heal.* 2019;85(1):1–3.
 21. Wijayanti IB. Efektivitas HBsAg-Rapid Screening Test untuk Deteksi Dini Hepatitis B. *Sem Schol.* 2016;29–34.
 22. Adeyemi AA, Omolade OA, Raheem-Ademola RR. Immunochromatographic Testing Method for Hepatitis B, C in Blood Donors. *J Antivir Antiretrovir.* 2014;S3(3):1-2.
 23. Alhaji M, Zubair M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *StatPearls Publishing;* 2023. [cited Jan 23, 2023]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/#:~:text=Enzyme-linked immunosorbent assay \(ELISA,proteins%2C glycoproteins%2C and hormones](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/#:~:text=Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA,proteins%2C glycoproteins%2C and hormones).
 24. Zhang X, Tian Y, Xu L, Fan Z, Cao Y, Ma Y, et al. CRISPR/Cas13-assisted hepatitis B virus covalently closed circular DNA detection. *Hepatol Int.* 2022;16(2):306–15.
 25. Hille F, Charpentier E. CRISPR-cas: Biology, mechanisms and relevance. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2016;371(1707):20150496.
 26. Makarova KS, Koonin EV. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol.* 2015;1311:47–75.
 27. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie.* 2015;117:119–28.
 28. Kostyusheva A, Brezgin S, Babin Y, Vasilyeva I, Glebe D, Kostyushev D, et al. CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases. *Methods.* 2022;203:431–46.
 29. Makarova KS, Zhang F, Koonin E V. SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Cell.* 2017;168(1–2):328-328.e1.
 30. Moon SB, Kim DY, Ko J-H, Kim Y-S. Recent advances in the CRISPR genome editing tool set. *Exp Mol Med.* 2019;51(11):1-11.
 31. Yuan B, Yuan C, Li L, Long M, Chen Z. Application of the CRISPR/Cas System in Pathogen Detection: A Review. *Molecules.* 2022; 27(20):1-15.
 32. Jia F, Li X, Zhang C, Tang X. The expanded development and application of CRISPR system for sensitive nucleotide detection. *Protein Cell.* 2020;11(9):624–9.