



Department of Digital Business

**Journal of Artificial Intelligence and Digital Business (RIGGS)**

Homepage: <https://journal.ilmudata.co.id/index.php/RIGGS>

Vol. 5 No. 1 (2026) pp: 12475-12486

P-ISSN: 2963-9298, e-ISSN: 2963-914X

---

## Perkembangan Teknologi CRISPR dari Cas9 Konvensional Menuju Sistem Editing Presisi Tinggi dalam Aplikasi Bioteknologi Kesehatan

Nur Fajri Nur<sup>1</sup>, Nur Muflaha<sup>2</sup>, Rachmawati<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Magister Pendidikan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Makassar

[nurfajrinur11@gmail.com](mailto:nurfajrinur11@gmail.com)

### Abstrak

Perkembangan bioteknologi kesehatan saat ini telah mengalami pergeseran dari pendekatan yang bersifat simptomatik menuju strategi berbasis molekuler yang menargetkan penyebab penyakit pada tingkat genetik. Salah satu terobosan utama dalam bidang ini adalah teknologi CRISPR-Cas9, yang memungkinkan modifikasi DNA secara spesifik, efisien, dan relatif ekonomis. Meskipun demikian, sistem CRISPR-Cas9 konvensional masih menghadapi berbagai keterbatasan, terutama risiko terjadinya *double-strand break* (DSB) yang dapat memicu mutasi tidak terkontrol serta efek *off-target* yang tidak diinginkan. Hal ini menekankan perlunya pengembangan teknologi penyuntingan genom yang lebih presisi, aman, dan dapat diterapkan secara klinis. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji evolusi teknologi CRISPR menuju sistem genome editing presisi tinggi dalam konteks bioteknologi kesehatan. Metode yang digunakan adalah *Systematic Literature Review* (SLR) dengan pedoman PRISMA terhadap 43 artikel yang diperoleh dari basis data Scopus pada periode 2016–2026. Analisis dilakukan secara kualitatif deskriptif dengan membandingkan mekanisme kerja, keunggulan, serta keterbatasan masing-masing generasi teknologi. Hasil kajian menunjukkan bahwa teknologi genome editing telah berkembang dari CRISPR-Cas9 konvensional menuju *high-fidelity Cas9*, *base editing*, dan *prime editing*. *High-fidelity Cas9* meningkatkan spesifisitas dengan menurunkan efek *off-target*, *base editing* memungkinkan konversi basa tanpa menimbulkan DSB, sedangkan *prime editing* menawarkan fleksibilitas untuk melakukan substitusi, insersi, dan delesi kecil secara presisi. Evolusi ini tidak hanya meningkatkan keamanan dan akurasi genome editing, tetapi juga memperluas potensi aplikasinya di bidang klinis, khususnya dalam terapi penyakit genetik, pengembangan *precision medicine*, serta riset bioteknologi lebih lanjut yang menargetkan pengobatan personal dan pencegahan penyakit.

**Kata kunci:** CRISPR-Cas9, Genome Editing, Base Editing, Prime Editing, Precision Medicine

### 1. Latar Belakang

Ilmu bioteknologi kesehatan berkembang dari pengobatan yang berfokus pada gejala menuju pendekatan berbasis molekuler yang menargetkan penyebab penyakit pada tingkat genetik. Penyakit kompleks seperti kanker, penyakit genetik turunan, dan gangguan degeneratif diketahui berkaitan dengan mutasi gen, sementara terapi konvensional umumnya hanya mengendalikan gejala tanpa memperbaiki kerusakan genetik yang mendasarinya [1]. Oleh karena itu, diperlukan pendekatan pengobatan modern yang bekerja langsung pada tingkat DNA sebagai sumber utama gangguan fungsi tubuh. Salah satu terobosan penting dalam biomedis modern adalah teknologi genome editing [2].

Sebelum hadirnya teknologi berbasis CRISPR-Cas9, manipulasi genom dilakukan menggunakan Zinc Finger Nucleases (ZFN) dan Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN). Meskipun efektif dalam memotong DNA secara spesifik, teknologi tersebut memiliki keterbatasan seperti desain protein yang kompleks, biaya tinggi, dan fleksibilitas penargetan yang rendah [3]. Hal ini mendorong pengembangan metode editing gen yang lebih efisien. Penemuan CRISPR-Cas9 yang diadaptasi dari sistem pertahanan bakteri terhadap virus menjadi tonggak penting dalam rekayasa genetika [2].

CRISPR-Cas9 memungkinkan pemotongan DNA secara spesifik dengan bantuan guide RNA yang mengarahkan enzim Cas9 ke lokasi target [3]. Sistem ini lebih mudah diprogram, efisien, dan ekonomis dibanding teknologi sebelumnya [2], sehingga banyak digunakan dalam penelitian penyakit genetik, terapi gen, dan rekayasa sel imun [4]. Selain itu, teknologi ini mendukung pengembangan *precision medicine* melalui modifikasi genetik yang lebih terarah [1]. Namun, penggunaan Cas9 konvensional memiliki keterbatasan, terutama karena mekanisme *double-strand break* (DSB) yang dapat memicu perbaikan DNA tidak presisi melalui jalur NHEJ, sehingga berpotensi

---

Perkembangan Teknologi CRISPR dari Cas9 Konvensional Menuju Sistem Editing Presisi Tinggi dalam Aplikasi Bioteknologi Kesehatan

menimbulkan mutasi tak terkontrol [5]. Risiko efek *off-target* juga menjadi tantangan dalam aplikasi klinis karena dapat menyebabkan perubahan genetik yang tidak diinginkan [4]. Hal ini mendorong pengembangan teknologi genome editing generasi lanjut yang lebih presisi. Mengingat banyak penyakit genetik disebabkan oleh mutasi satu basa nukleotida, dibutuhkan teknologi yang mampu memperbaikinya secara spesifik tanpa merusak DNA. Oleh karena itu, dikembangkan pendekatan baru seperti base editing dan prime editing yang memungkinkan modifikasi genetik tanpa pemotongan dua untai DNA [6].

Base editing memungkinkan konversi satu basa nitrogen menjadi basa lainnya secara langsung tanpa menghasilkan DSB, sehingga mengurangi risiko mutasi tak terkontrol [6]. Sementara itu, prime editing menawarkan fleksibilitas yang lebih luas dengan kemampuan melakukan substitusi, insersi, maupun delesi skala kecil secara presisi. Pendekatan ini dinilai lebih aman dibandingkan CRISPR-Cas9 konvensional karena meminimalkan aktivasi mekanisme perbaikan DNA yang berpotensi menimbulkan kesalahan [5]. Selain itu, pengembangan varian Cas9 dengan fidelitas tinggi juga berkontribusi dalam menurunkan efek *off-target* secara signifikan [3].

Teknologi editing generasi lanjut tidak hanya meningkatkan akurasi modifikasi genetik tetapi juga memperluas potensi aplikasi klinis dalam bioteknologi kesehatan. Dalam terapi penyakit monogenik, editing presisi tinggi memungkinkan perbaikan mutasi secara langsung pada tingkat DNA [1]. Dalam terapi kanker, teknologi ini dapat digunakan untuk merekayasa sel imun agar memiliki kemampuan lebih baik dalam mengenali dan menghancurkan sel tumor. Selain itu, genome editing juga berperan dalam pengembangan model penyakit serta identifikasi target terapi baru [4]. Penerapan teknologi CRISPR presisi tinggi dalam bioteknologi kesehatan juga berkontribusi terhadap pengembangan pengobatan berbasis *precision medicine* yang disesuaikan dengan profil genetik individu. Pendekatan ini memungkinkan terapi yang lebih efektif dan minim efek samping karena mempertimbangkan variasi genetik pasien [1]. Dengan meningkatnya keamanan dan akurasi sistem editing, potensi translasi teknologi ini ke dalam praktik klinis menjadi semakin besar [6].

Meskipun perkembangan teknologi CRISPR berlangsung sangat pesat, kajian komprehensif yang menelaah evolusi sistem ini dari Cas9 konvensional menuju teknologi editing presisi tinggi dalam konteks aplikasi bioteknologi kesehatan masih terbatas [3]. Sebagian besar penelitian berfokus pada aspek teknis atau aplikasi spesifik tanpa mengintegrasikan perkembangan teknologi dengan implikasi keamanan dan potensi klinisnya [1]. Hal ini menunjukkan adanya celah penelitian yang perlu diisi melalui sintesis ilmiah yang menghubungkan inovasi teknologi genome editing dengan kebutuhan aplikasi kesehatan yang aman dan efektif [6].

Berdasarkan uraian di atas, penting untuk mengkaji mengenai perkembangan teknologi CRISPR menuju sistem editing presisi tinggi guna mendukung pemanfaatannya secara optimal di bidang bioteknologi kesehatan [1]. Kajian ini diharapkan dapat memberikan gambaran menyeluruh mengenai arah perkembangan teknologi genome editing serta implikasinya dalam pengembangan pengobatan di tingkat gen yang lebih aman, presisi, dan berkelanjutan di masa depan [3].

## 2. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah SLR (*Systematic Literature Review*) dengan mengacu pada pedoman PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) serta menggunakan pendekatan kualitatif deskriptif. Studi kepustakaan dilakukan dengan menelaah dan mensintesis berbagai hasil penelitian yang relevan mengenai perkembangan teknologi CRISPR-Cas9 dari generasi awal hingga generasi terbaru dalam meningkatkan presisi genome editing dan reduksi *off-target effects* dalam bidang bioteknologi kesehatan.

Pencarian literatur dilakukan melalui basis data ilmiah kredibel, yaitu Scopus, dengan menggunakan kombinasi kata kunci: ("CRISPR-Cas9" OR "CRISPR Cas9") AND ("high fidelity" OR "high-fidelity" OR "enhanced specificity" OR "off-target reduction" OR "precision editing") AND ("base editing" OR "prime editing") AND ("medical application" OR "therapeutic application" OR "biotechnology health" OR "gene therapy"). Rentang tahun publikasi dibatasi pada periode 2016–2026, serta dibatasi pada artikel berbahasa Inggris dan tersedia dalam akses terbuka. Proses seleksi literatur mengikuti tahapan PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*). Pada tahap *identification*, diperoleh sebanyak 232 artikel dari hasil pencarian awal. Tahap *screening*, dilakukan penyaringan berdasarkan judul dan abstrak untuk mengeliminasi artikel yang tidak relevan, sehingga tersisa 121 artikel. Tahap *eligibility* dilakukan melalui penelaahan teks lengkap untuk memastikan kesesuaian dengan kriteria inklusi, yaitu artikel yang membahas strategi pengurangan *off-target effects*, pengembangan High-Fidelity Cas9, Base Editing, atau Prime Editing dalam konteks biomedis. Pada tahap ini, diperoleh 63 artikel. Pada tahap akhir (*inclusion*), seleksi lebih lanjut berdasarkan kesesuaian substansi dan fokus analisis kemudian diperoleh 43 artikel yang relevan.

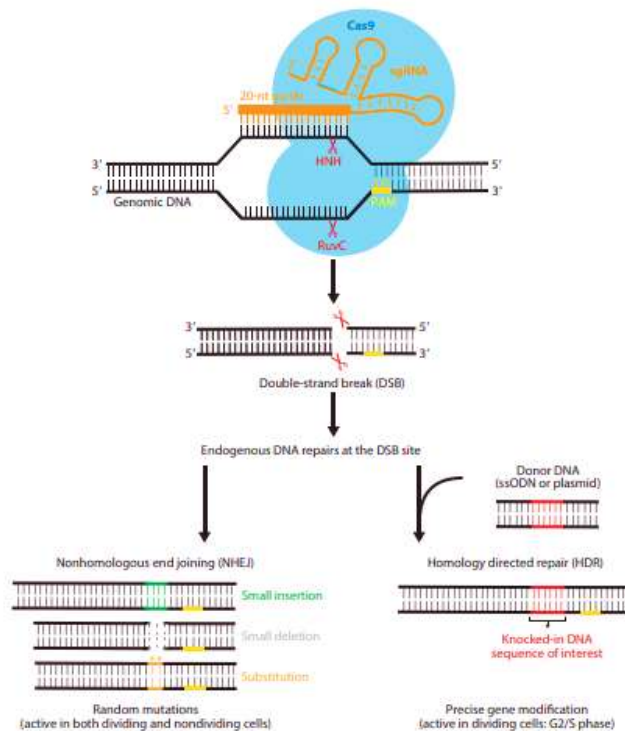
Data yang telah memenuhi kriteria inklusi kemudian dianalisis secara kualitatif deskriptif untuk mengidentifikasi perkembangan teknologi CRISPR-Cas9 dari generasi awal hingga teknologi editing presisi terbaru dalam bidang

bioteknologi kesehatan. Analisis dilakukan dengan membandingkan karakteristik, mekanisme kerja, keunggulan, serta keterbatasan masing-masing generasi teknologi genome editing. Hasil sintesis literatur digunakan untuk memberikan gambaran komprehensif mengenai evolusi teknologi tersebut serta kontribusinya terhadap peningkatan presisi dan keamanan dalam aplikasi biomedis.

### 3. Pembahasan

#### Mekanisme Kerja CRISPR-Cas9 Konvensional

CRISPR-Cas9 adalah sistem penyuntingan genom berbasis enzim Cas9 yang dipandu oleh RNA untuk menghasilkan *double-strand break* (DSB) pada target DNA spesifik. Pada prinsipnya Cas9 memotong DNA target secara spesifik melalui interaksi dengan *guide RNA* (gRNA) dan motif pengenalan *protospacer adjacent motif* (PAM), sehingga memicu perbaikan genom seluler yang dimanfaatkan untuk terapi gen [7].



Gambar 1. Skema mekanisme penyuntingan genom berbasis CRISPR Cas9 Konvensional [7]

[8] menjelaskan bahwa Cas9 ribonukleoprotein (RNP) spesifik dialirkan ke sel punca hematopoietik CD34<sup>+</sup> melalui elektroporasi untuk memotong situs pengikat repressor pada promoter  $\gamma$ -globin. Pemotongan ini menghasilkan DSB pada posisi genom tertentu, yang kemudian diperbaiki oleh mekanisme perbaikan sel (terutama *non-homologous end joining*), menghasilkan *indel* yang mengganggu pengikatan repressor tersebut dan mengaktifkan transkripsi  $\gamma$ -globin secara terapeutik. Proses penyuntingan dimulai dengan kompleks Cas9 yang telah berasosiasi dengan gRNA memasuki inti sel. Cas9 hanya aktif setelah mengenali PAM yang benar pada genom target. Setelah PAM dikenali, Cas9 membuka heliks DNA dan memungkinkan gRNA untuk memandu Cas9 menjalin pasangan basa dengan untai target. Stabilitas interaksi ini menentukan apakah Cas9 akan mengaktifkan domain nukleasenya untuk memotong kedua untai DNA. Hasilnya adalah DSB pada titik yang sangat spesifik, yang kemudian memicu respon perbaikan DNA endogen (yang dalam konteks terapi sel sabit diarahkan untuk mengganggu elemen regulator, bukan memperbaiki mutasi  $\beta$ -globin secara langsung).

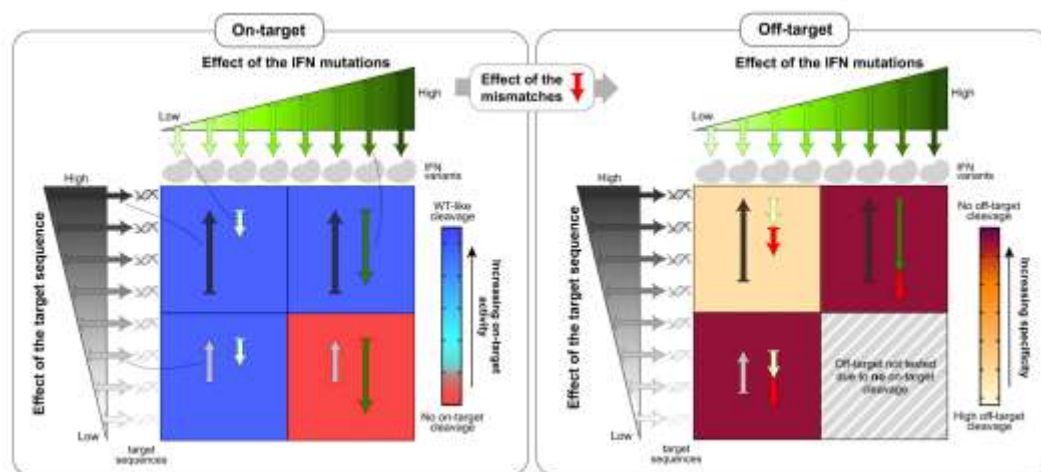
[9] juga menegaskan bahwa strategi berbasis Cas9 ini mengakibatkan DSB yang efisien pada binding site LRF (lymphoma-related factor) di promoter  $\gamma$ -globin, yang memperkuat ekspresi HbF dalam progeni eritroid. Mereka melaporkan bahwa setelah pemotongan, *HSPCs* dari pasien menunjukkan tingkat ekspresi HbF yang tinggi, serta aktivitas perbaikan DNA yang mengarah pada peningkatan HbF tanpa menghambat kemampuan sel untuk berengraftasi atau berdiferensiasi, meskipun juga terdeteksi insiden *off-target* dan beberapa rearrangement kromosom yang umumnya merupakan konsekuensi umum dari DSB berbasis Cas9.

Dalam penelitian oleh [10], meskipun fokus utama adalah pada varian Cas9 (Cj4Cas9), mekanisme dasarnya tetap sama: Cas9 mengenali PAM dan memotong genom pada lokasi target yang dipandu oleh gRNA. Mereka menunjukkan bahwa varian ini memiliki preferensi PAM yang berbeda (5'-NNNGRY-3'), tetapi kemampuan untuk memicu DSB yang mengarah pada modifikasi genom tetap menjadi inti mekanismenya. Dengan memanfaatkan mutasi yang ditambahkan pada varian Cj4Cas9 (misalnya L58Y/D900K), mereka meningkatkan aktivitas nuklease untuk menghasilkan DSB yang lebih efisien dalam konteks *in vivo* editing (misalnya pada gen *Pcsk9* pada hati hewan percobaan) menunjukkan bahwa prinsip DSB tetap konsisten bahkan ketika Cas9 dimodifikasi atau dipilih dari ortholog yang berbeda.

Setelah DSB terbentuk, sel menggunakan mekanisme perbaikan DNA endogen seperti *non-homologous end joining* (NHEJ) atau *homology-directed repair* (HDR) untuk memperbaiki patahan tersebut. Dalam konteks terapi gen hematopoietik, NHEJ sering dimanfaatkan karena dapat menghasilkan mutasi *indel* yang menghentikan fungsi elemen regulator (seperti *BCL11A* atau situs pengikat repressor lainnya), sehingga meningkatkan ekspresi gen yang diinginkan, seperti  $\gamma$ -globin untuk terapi SCD. Sementara HDR lebih presisi dan digunakan ketika pola penyisipan atau koreksi tertentu diperlukan, penerapannya sering lebih kompleks dan kurang efisien dalam sel somatik primitif dibandingkan NHEJ [11].

### Mekanisme Kerja CRISPR High-Fidelity

CRISPR high-fidelity merupakan pengembangan sistem CRISPR-Cas9 yang dirancang untuk meningkatkan presisi pemotongan genom dengan mengurangi kejadian *off-target cleavage* dan *chromosomal rearrangements* serta meningkatkan integrasi DNA donor yang akurat melalui jalur *homology-directed repair* (HDR). Dalam sistem ini, Cas9 tetap menghasilkan *double-strand break* (DSB) pada target yang dipandu oleh sgRNA, namun strategi tambahan diterapkan untuk meningkatkan akurasi hasil editing [12].



Gambar 2. Skema trade-off antara aktivitas on-target dan spesifisitas off-target pada varian CRISPR-Cas9 high-fidelity [13].

Salah satu pendekatan yang dikembangkan adalah sistem RED-CRISPR, yang menggabungkan CRISPR-Cas9 dengan rekombinase  $\lambda$ -Red (*Red $\alpha$* /*Red $\beta$* ) untuk meningkatkan integrasi DNA donor secara presisi. Dalam sistem RED-CRISPR, Cas9 terlebih dahulu menghasilkan *double-strand break* (DSB) pada target genom yang ditentukan oleh sgRNA. Setelah DSB terbentuk, protein Red $\alpha$  bertindak sebagai 5'→3' *exonuclease* yang memproses ujung DNA sehingga menghasilkan overhang 3' tunggal, sedangkan Red $\beta$  memfasilitasi annealing antara ujung tersebut dengan DNA donor homolog. Aktivitas ini secara signifikan meningkatkan efisiensi HDR dibandingkan CRISPR-Cas9 konvensional, serta mengurangi integrasi non-spesifik dan kejadian translocation [14].

Pendekatan lain untuk meningkatkan presisi adalah melalui pemilihan dan karakterisasi varian nuclease dengan profil spesifisitas yang lebih baik. Studi profiling paralel terhadap berbagai varian Cas12a menunjukkan bahwa setiap varian memiliki perbedaan signifikan dalam efisiensi editing dan profil *off-target*, yang dievaluasi menggunakan metode seperti GUIDE-seq. Beberapa varian menunjukkan rasio spesifisitas yang lebih tinggi dengan pengurangan aktivitas di situs non-target, menunjukkan bahwa optimasi enzim secara struktural dapat meningkatkan akurasi genome editing [15].

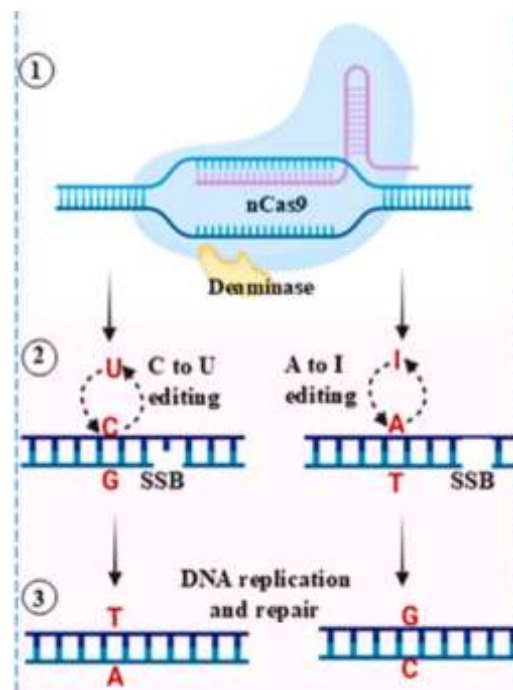
Dalam konteks terapi gen, pendekatan berbasis Cas9 dengan presisi tinggi juga diterapkan pada koreksi mutasi penyakit. Pada studi koreksi *COL7A1* untuk Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa, penggunaan Cas9 berbasis

ribonucleoprotein (RNP) yang dikombinasikan dengan donor DNA homolog memungkinkan terjadinya HDR yang efisien dan menghasilkan tingkat koreksi genetik yang tinggi pada sel pasien. Editing yang presisi ini menghasilkan pemulihan ekspresi kolagen tipe VII tanpa peningkatan signifikan mutasi di luar target yang dianalisis [16].

Pendekatan knock-in presisi juga ditunjukkan dalam strategi integrasi terarah cDNA NCF1 ke dalam lokus NCF2 pada model chronic granulomatous disease. Sistem ini menggunakan CRISPR-Cas9 untuk menghasilkan DSB terarah dan donor DNA dengan *homology arms* untuk memastikan integrasi melalui HDR, menghasilkan koreksi fenotipik pada sel mieloid turunan HSPC yang diedit [17].

### Mekanisme Kerja CRISPR Base Editing

CRISPR base editing merupakan sistem penyuntingan genom yang memungkinkan konversi basa tunggal tanpa menghasilkan *double-strand break* (DSB). Sistem ini umumnya terdiri dari protein Cas yang telah dinonaktifkan aktivitas nuklease gandanya (nCAs9 atau dCas9) yang difusikan dengan enzim deaminase, sehingga memungkinkan konversi basa spesifik pada jendela editing tertentu di dalam sekuens target yang dipandu oleh sgRNA [18].



Gambar 3. Skema mekanisme CRISPR base editing melalui deaminasi basa (C→U atau A→I) yang menghasilkan konversi basa permanen tanpa pembentukan DSB [19].

Pada sistem *adenine base editor* (ABE) yang direkayasa untuk meningkatkan presisi, Cas9 nickase (nCAs9) digabungkan dengan enzim adenine deaminase terarah evolusi yang mengkatalisis konversi A•T menjadi G•C melalui deaminasi adenin menjadi inosine, yang kemudian dikenali sebagai guanin selama replikasi DNA. Dalam studi rekayasa ABE pada *human embryonic stem cells*, optimasi struktur editor menghasilkan peningkatan efisiensi editing dengan penurunan signifikan aktivitas *off-target* baik pada DNA maupun RNA, menunjukkan bahwa modifikasi arsitektur enzim dapat meningkatkan fidelity sistem base editing [20]

Pengembangan lebih lanjut terhadap kontrol pola editing dilaporkan dalam sistem “*plug-in*” untuk mereprogram pola penyuntingan base editor. Studi tersebut menunjukkan bahwa domain deaminase dapat dimodifikasi atau diganti untuk mengubah rentang posisi basa yang dapat diedit (*editing window*), sehingga memungkinkan pengaturan presisi posisi nukleotida yang dikonversi tanpa mengubah target sgRNA. Mekanisme ini tetap bergantung pada pengikatan kompleks Cas9-sgRNA ke DNA target, tetapi aktivitas deaminasi dapat diarahkan secara spasial melalui rekayasa modular pada domain editor [21].

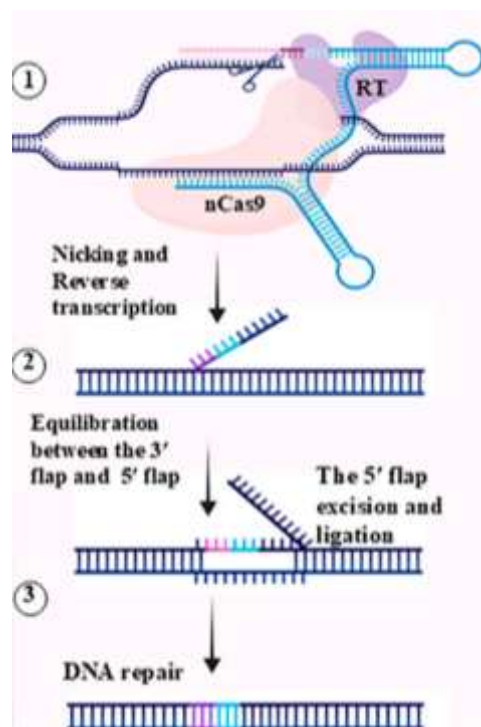
Dalam konteks aplikasi penyakit, base editing mitokondria digunakan untuk memperbaiki mutasi m.8993T→G pada DNA mitokondria pasien. Sistem yang digunakan bekerja tanpa menghasilkan DSB, melainkan melalui

deaminasi basa spesifik pada genom mitokondria, yang menghasilkan perbaikan proporsi heteroplasmia dan pemulihan fungsi bioenergetik serta kapasitas diferensiasi neural pada iPSC pasien [22]. Studi ini menekankan bahwa keunggulan utama base editing dibandingkan CRISPR konvensional adalah kemampuannya melakukan konversi basa presisi tanpa memicu respons perbaikan DSB yang dapat menyebabkan rearrangement genom.

Pendekatan koreksi mutasi transisi tunggal juga ditunjukkan pada kasus GM1 *gangliosidosis* akibat mutasi G→A pada gen GLB1. Dalam studi tersebut, base editing digunakan untuk mengoreksi transisi nukleotida secara langsung pada sel pasien secara *in vitro*, menghasilkan pemulihan aktivitas enzim β-galactosidase. Mekanisme koreksi terjadi melalui konversi basa terarah yang dipandu sgRNA tanpa pembentukan DSB, sehingga meminimalkan risiko indel yang tidak diinginkan [23].

### Mekanisme Kerja CRISPR Prime Editing

CRISPR prime editing merupakan sistem penyuntingan genom presisi yang menggabungkan Cas9 nickase (H840A) dengan *reverse transcriptase* (RT) yang difusikan secara kovalen, serta dipandu oleh prime editing guide RNA (pegRNA). PegRNA tidak hanya menentukan lokasi target melalui *spacer sequence*, tetapi juga membawa template RNA yang mengandung sekuens edit yang diinginkan serta primer binding site (PBS) [19]. Berbeda dengan CRISPR-Cas9 konvensional yang menghasilkan *double-strand break* (DSB), *prime editing* hanya menghasilkan *single-strand nick* pada DNA target [24].



Gambar 4. Mekanisme CRISPR prime editing melalui nicking oleh nCas9 (H840A) dan sintesis DNA oleh reverse transcriptase menggunakan template pada pegRNA, diikuti pemrosesan flap dan perbaikan DNA hingga terbentuk edit permanen tanpa DSB [19]

Dalam desain yang dioptimalkan sebagaimana dijelaskan oleh [25], bahwa kompleks Cas9 nickase–RT pertama-tama mengenali sekuens target melalui pasangan basa antara spacer pegRNA dan DNA genomik, kemudian membuat nick pada untai target sehingga menghasilkan ujung 3'-OH yang berfungsi sebagai primer untuk sintesis DNA baru. PegRNA memiliki struktur yang lebih kompleks dibanding sgRNA konvensional karena selain menentukan lokasi target, ia juga mengandung primer binding site (PBS) dan template RNA yang membawa sekuens edit yang diinginkan. Setelah pembentukan nick, PBS pada pegRNA berikatan dengan ujung 3' DNA genomik, memungkinkan reverse transcriptase memperpanjang ujung tersebut dengan menggunakan template RNA sebagai cetakan. Proses ini menghasilkan DNA baru yang mengandung modifikasi yang telah diprogram, membentuk struktur yang dikenal sebagai 3' flap. Studi [25], menunjukkan bahwa efisiensi dan fidelitas proses ini sangat dipengaruhi oleh panjang PBS, panjang template RT, serta rekayasa domain RT untuk memperluas atau membalik editing window tanpa meningkatkan efek off-target secara signifikan.

Hasil *reverse transcription* menghasilkan dua kemungkinan struktur DNA, yaitu 3' flap yang membawa sekuens edit dan 5' flap yang mengandung sekuens asli. Sistem perbaikan DNA endogen sel kemudian memproses struktur ini melalui mekanisme resolusi flap dan ligasi. Integrasi edit terjadi ketika 3' flap dipertahankan dan disintesis ulang secara stabil oleh sistem repair seluler. Mekanisme ini memungkinkan terjadinya substitusi basa, insersi kecil, maupun delesi kecil tanpa memerlukan donor DNA eksternal. Dalam penelitian [26], diketahui bahwa mekanisme tersebut digunakan untuk mengoreksi berbagai mutasi CFTR pada organoid dan sel epitel saluran napas manusia, menunjukkan bahwa prime editing dapat memperbaiki mutasi patogenik secara presisi tanpa menghasilkan DSB atau ketergantungan pada *homology-directed repair* klasik.

Untuk meningkatkan efisiensi konversi alel, beberapa sistem prime editing menggunakan strategi tambahan berupa nick pada strand non-edited (sering disebut pendekatan PE3). Nick sekunder ini mendorong sel menggunakan strand yang telah diedit sebagai template selama proses perbaikan mismatch, sehingga meningkatkan proporsi alel yang berhasil diedit. Pendekatan ini diterapkan dalam *paper* [27], di mana prime editing mampu mengoreksi mutasi patogenik pada gen RBM20 dan memulihkan fenotipe seluler tanpa peningkatan signifikan kejadian indel besar yang umumnya dikaitkan dengan sistem berbasis DSB.

Secara keseluruhan, mekanisme prime editing bekerja melalui pengenalan target oleh Cas9 nickase-RT, pembentukan single-strand nick, annealing PBS, sintesis DNA baru oleh reverse transcriptase menggunakan template pada pegRNA, pembentukan dan resolusi struktur flap oleh sistem perbaikan DNA seluler, serta stabilisasi edit dalam genom. Pendekatan ini memungkinkan penyuntingan genom presisi tinggi dengan spektrum modifikasi yang lebih luas dibanding base editing, sekaligus meminimalkan risiko kerusakan genomik yang sering terjadi pada sistem berbasis *double-strand break* [28].

### Evolusi Teknologi CRISPR Menuju Penyuntingan Genom Presisi Tinggi

Perkembangan sistem CRISPR menunjukkan pola evolusi berbasis penyempurnaan presisi dan keamanan penyuntingan genom. CRISPR-Cas9 konvensional yang menghasilkan *double-strand break* (DSB) memberikan efisiensi tinggi namun menimbulkan risiko indel dan rearrangements kromosom. Modifikasi *high-fidelity* dikembangkan untuk mengurangi *off-target effect* tanpa mengubah prinsip dasar DSB. Selanjutnya, *base editing* diperkenalkan untuk memungkinkan konversi basa spesifik tanpa DSB, meskipun terbatas pada tipe substitusi tertentu. *Prime editing* kemudian hadir sebagai platform yang lebih fleksibel, memungkinkan substitusi, insersi, dan delesi kecil tanpa DSB maupun donor DNA eksternal, sehingga merepresentasikan tahap evolusi yang mengintegrasikan presisi dan fleksibilitas dalam satu sistem.

Tabel 1. Ringkasan Evolusi Teknologi Generasi CRISPR dan Implementasi Klinis pada Paper yang Terinklusi

Tipe CRISPR	Temuan / Hasil Uji	Aplikasi Klinis / Kesehatan	Referensi
<i>High-Fidelity</i> (novel Cas9 ortholog-Cj4Cas9)	Menunjukkan kemampuan editing in vivo dengan ukuran enzim lebih kecil dan efisiensi signifikan	Potensial terapi gen in vivo berbasis delivery vektor kecil	[29]
<i>Base Editing (engineering system plug-in)</i>	Sistem plug-in memungkinkan pemrograman ulang pola dan window editing tanpa mengganti keseluruhan editor	Optimalisasi presisi base editing untuk terapi gen	[21]
CRISPR-Cas9 ( <i>knock-in enhanced</i> / RED-CRISPR)	Peningkatan efisiensi knock-in presisi melalui integrasi DNA berbasis rekombinase	Strategi terapi gen berbasis knock-in presisi	[14]
CRISPR-Cas9 + <i>Base Editing (orthogonal systems)</i>	Integrasi terarah dan multiplex base editing tanpa vektor virus pada sel T	Rekayasa CAR-T allogeneic untuk terapi kanker	[30]
<i>Base Editing (engineered BE-reduced bystander)</i>	Strategi rekayasa mengurangi bystander editing dengan tetap mempertahankan efisiensi	Peningkatan keamanan base editing terapeutik	[31]
<i>Prime Editing</i>	Desain rasional dan optimasi AI memperluas reverse editing window serta meningkatkan fidelity	Platform terapi gen presisi	[25]

<i>High-Fidelity (Cas12a variants profiling)</i>	Profil aktivitas dan spesifisitas varian Cas12a menunjukkan kontrol mismatch yang lebih baik	Kandidat nuclease presisi tinggi untuk terapi gen	[15]
<i>High-Fidelity (AI-engineered Cas9)</i>	Rekayasa Cas9 berbasis AI meningkatkan performa dan efisiensi base editing	Optimalisasi keamanan dan efisiensi terapi gen	[32]
<i>Base Editing (mitochondrial BE)</i>	Editing mtDNA memulihkan fungsi bioenergetik dan diferensiasi sel pasien	Terapi penyakit mitokondria	[22]
<i>Base Editing (mitochondrial disease models)</i>	Koreksi mtDNA patogenik memperbaiki fenotipe seluler model pasien	Terapi penyakit mitokondria	[33]
<i>High-Fidelity / Delivery Engineering</i>	Rekayasa kendaraan nukleositolasmik meningkatkan efisiensi loading dan pengantaran editor ke sel	Strategi delivery non-viral untuk terapi gen in vivo	[34]
<i>Base Editing (engineered BE-peptide inserted)</i>	Penyisipan peptida meningkatkan akurasi editing dan menurunkan off-target/bystander	Peningkatan keamanan base editing terapeutik	[35]
<i>Base Editing (cytidine deaminase engineering)</i>	Identifikasi deaminase efisiensi tinggi dengan independensi konteks sekuens	Memperluas cakupan terapi berbasis cytidine base editing	[36]
CRISPR-Cas9 (konvensional, klinis)	Evaluasi keamanan dan efikasi editing pada pasien menunjukkan respons spesifik penyakit	Terapi sickle cell disease	[9]
<i>Base Editing (directed evolution CBE &amp; ABE)</i>	Evolusi kontinu meningkatkan presisi dan meminimalkan off-target DNA/RNA	Optimalisasi klinis base editing	[37]
<i>High-Fidelity (PAM-flexible FnCas9)</i>	Varian FnCas9 dengan fleksibilitas PAM lebih luas dan presisi tinggi	Platform genome editing presisi dan diagnostik	[38]
CRISPR-Cas9 (ex vivo HSC editing)	Studi pra-klinis mendukung editing sel CD34+ untuk induksi HbF dengan profil keamanan memadai	Terapi autologous untuk sickle cell disease	[8]
CRISPR-Cas9 (knock-in HDR)	Knock-in presisi menghasilkan koreksi fenotipe seluler	Terapi chronic granulomatous disease	[17]
<i>Base Editing (splice correction)</i>	Context base editing memperbaiki splicing abnormal tanpa DSB	Terapi $\beta$ -thalassemia	[39]
CRISPR-Cas9 + HDR (RNP-based)	Koreksi ex vivo efisien menggunakan Cas9 RNP dan HDR	Terapi recessive dystrophic epidermolysis bullosa	[16]
<i>Prime Editing</i>	Koreksi fungsional mutasi tanpa DSB pada organoid dan sel epitel saluran napas	Terapi cystic fibrosis	[26]
<i>High-Fidelity (engineered Cas12a-AiEvo2)</i>	Rekayasa nuclease meningkatkan efisiensi editing pada sel manusia	Kandidat nuclease alternatif untuk terapi gen	[40]
<i>Base Editing (ABE-splicing remodeling)</i>	ABE memodulasi <i>splicing</i> dengan mengaktifkan <i>splice site</i> nonkanonik	Strategi terapi berbasis koreksi splicing	[41]
<i>Base Editing (engineered Nme2Cas9 ABE)</i>	Rekayasa domain meningkatkan efisiensi on-target dan memperluas cakupan target	Optimalisasi ABE untuk terapi gen	[42]
<i>Base Editing (compact ABE)</i>	Penghapusan domain menghasilkan editor lebih kecil dengan aktivitas tetap efisien	Potensial delivery berbasis AAV untuk terapi gen	[43]
<i>Base Editing (protospacer modification)</i>	Modifikasi protospacer meningkatkan efisiensi koreksi splice site dan pemulihan fungsi	Terapi cystic fibrosis	[44]
<i>Base Editing (ABE evolved to CBE)</i>	Evolusi ABE menghasilkan CBE kecil dengan efisiensi tinggi dan off-target rendah	Peningkatan keamanan base editing terapeutik	[45]

<i>High-Fidelity (efficiency-enhanced Cas9 &amp; BE)</i>	Rekayasa meningkatkan efisiensi editing dan performa terapi gen	Optimalisasi terapi gen berbasis Cas9 dan base editing	[46]
<i>Base Editing (disease-specific correction)</i>	Koreksi in vitro mutasi genetik pada sel pasien	Terapi GM1 gangliosidosis	[23]
<i>High-Fidelity (SuperFi-Cas9)</i>	Fidelitas sangat tinggi namun aktivitas menurun; tetap efektif saat dikombinasikan dengan ABE8e	Peningkatan keamanan editing berbasis Cas9 dan ABE	[47]
<i>High-Fidelity (SpCas9 variants)</i>	Benchmarking varian SpCas9 meningkatkan akurasi skrining base editor pada gen BRCA1 dan BCL2	Terapi kanker (BRCA1/BCL2)	[48]
<i>CRISPR-Cas9</i>	Editing presisi mutasi RBM20 memulihkan fenotipe sel	Terapi kardiomiopati dilatasi	[27]
<i>Base Editing (ABE compact-AAV)</i>	Base editing in vivo efisien menggunakan AAV tunggal berukuran optimal	Terapi penyakit genetik berbasis mutasi titik	[49]
<i>Base Editing (ABE low off-target)</i>	ABE direkayasa dengan aktivitas off-target DNA dan RNA minimal	Terapi gen presisi	[20]
<i>CRISPR-Cas9 (HDR)</i>	Perbaikan gen COL17A1 melalui <i>homology-directed repair</i>	Terapi epidermolisis bulosa	[50]
<i>CRISPR-Cas9 (mRNA delivery)</i>	Pengantaran alat editing via mRNA aman dan efisien pada sel punca otot	Terapi penyakit otot genetik	[51]
<i>CRISPR-Cas9 (self-inactivating AAV)</i>	Vektor <i>all-in-one</i> AAV memungkinkan editing presisi dan membatasi durasi aktivitas Cas9	Terapi gen in vivo lebih aman	[52]
<i>Base Editing (DUX4 editing)</i>	Editing sinyal poliadenilasi menekan ekspresi gen patologis DUX4	Terapi FSHD (distrofi otot)	[53]
<i>CRISPR-Cas9 (diagnostic platform)</i>	Cas9 pada graphene transistor mendeteksi mutasi titik tanpa PCR	Diagnostik genetik presisi	[54]
<i>Base Editing</i>	Produksi garis sel klonal dengan variasi nukleotida tunggal	Pemodelan penyakit genetik	[55]
<i>High-Fidelity (SaCas9)</i>	Identifikasi SaCas9 dengan fidelitas tinggi dan off-target rendah	Terapi gen lebih aman	[56]
<i>Base Editing (protein engineering)</i>	Rekayasa protein dan delivery meningkatkan spesifisitas DNA	Terapi gen presisi	[57]
<i>CRISPR-Cas9 (compact, dinucleotide PAM)</i>	Cas9 kompak dengan akurasi tinggi dan cakupan target lebih luas	Terapi gen in vivo	[58]

### Perbandingan Keunggulan dan Keterbatasan Tiap Generasi Penyuntingan Genom

Setiap generasi penyuntingan genom memiliki mekanisme kerja yang berbeda, yang berimplikasi langsung pada tingkat presisi, efisiensi, dan risiko efek samping genomik. Disajikan dalam tabel sebagai berikut

Tabel 2. keunggulan dan keterbatasan dari masing-masing generasi penyuntingan genom

Sistem	Keunggulan Utama	Keterbatasan Utama
CRISPR-Cas9	Efisien untuk knockout; desain sederhana	Menghasilkan DSB; risiko off-target dan indel tak terkontrol
<i>High-Fidelity Cas9</i>	Spesifisitas lebih tinggi; off-target berkurang	Tetap menghasilkan DSB; bisa menurunkan efisiensi
<i>Base Editing</i>	Tanpa DSB; efisien untuk mutasi titik	Terbatas pada jenis konversi basa tertentu

## Implikasi dalam Bioteknologi Kesehatan

Hasil sintesis dari 43 artikel menunjukkan bahwa teknologi CRISPR telah bergerak dari tahap eksplorasi menuju tahap translasi klinis. Aplikasi yang paling dominan mencakup *hemoglobinopathy* seperti  $\beta$ -*thalassemia* dan *sickle cell disease* (SCD), penyakit genetik monogenik, terapi sel punca hematopoietik, penyakit neuromuskular, serta penyakit metabolik. Seiring dengan peningkatan presisi sistem penyuntingan genom, risiko mutasi tidak terkontrol semakin dapat ditekan. Hal ini berimplikasi pada meningkatnya keamanan terapi, semakin realistiknya pelaksanaan uji klinis, serta peluang penerimaan regulasi yang lebih besar dalam konteks implementasi klinis.

## 4. Kesimpulan

Perkembangan teknologi CRISPR menunjukkan evolusi signifikan dari sistem CRISPR-Cas9 konvensional berbasis *double-strand break* (DSB) menuju platform penyuntingan genom presisi tinggi yang lebih aman dan fleksibel untuk aplikasi bioteknologi kesehatan. Keterbatasan Cas9 konvensional, seperti risiko off-target dan indel tidak terkontrol, mendorong lahirnya varian high-fidelity yang meningkatkan spesifisitas tanpa mengubah mekanisme dasar DSB. Selanjutnya, inovasi base editing memungkinkan koreksi mutasi titik tanpa DSB, sementara prime editing menghadirkan kemampuan substitusi, insersi, dan delesi kecil secara presisi tanpa donor DNA eksternal. Secara keseluruhan, evolusi ini mencerminkan pergeseran paradigma menuju genome editing yang lebih akurat, terkendali, dan berorientasi pada translasi klinis dalam kerangka *precision medicine*. Berdasarkan perkembangan teknologi CRISPR, penelitian selanjutnya disarankan untuk berfokus pada peningkatan efisiensi dan spesifisitas sistem base editing dan prime editing. Selain itu, diperlukan pengembangan regulasi bioetika yang adaptif serta kolaborasi multidisipliner antara peneliti molekuler, klinisi, dan pembuat kebijakan agar transisi teknologi penyuntingan genom menuju aplikasi *precision medicine* dapat berlangsung secara aman, efektif, dan bertanggung jawab.

## Referensi

- [1] W. Xu, S. Zhang, H. Qin, and K. Yao, "From bench to bedside: cutting-edge applications of base editing and prime editing in precision medicine," *J. Transl. Med.*, vol. 22, no. 1, p. 1133, Dec. 2024, doi: 10.1186/s12967-024-05957-3.
- [2] R. Hermantara, "CRISPR-Cas9: A Story of Discovery, Innovation, and Revolution in Genome Editing," *Indonesian Journal of Life Sciences*, pp. 83–104, Mar. 2024, doi: 10.54250/ijls.v6i01.197.
- [3] A. S. Sichani, M. Ranjbar, M. Baneshi, F. T. Zadeh, and J. Fallahi, "A Review on Advanced CRISPR-Based Genome-Editing Tools: Base Editing and Prime Editing," *Mol. Biotechnol.*, vol. 65, no. 6, pp. 849–860, Jun. 2023, doi: 10.1007/s12033-022-00639-1.
- [4] M. Chehelgerdi *et al.*, "Comprehensive review of CRISPR-based gene editing: mechanisms, challenges, and applications in cancer therapy," *Mol. Cancer*, vol. 23, no. 1, p. 9, Jan. 2024, doi: 10.1186/s12943-023-01925-5.
- [5] Z. Liu, D. Guo, D. Wang, J. Zhou, Q. Chen, and J. Lai, "Prime editing: A gene precision editing tool from inception to present," *The FASEB Journal*, vol. 38, no. 21, Nov. 2024, doi: 10.1096/fj.202401692R.
- [6] M. Ismail and E. Sajjid, "Next-Generation CRISPR Editing: Base Editing, Prime Editing, and the Transition Beyond Double-Strand Breaks," *Pakistan Journal of Medical & Cardiological Review*, vol. 5, no. 1, 2026, [Online]. Available: <https://pakjmcrcr.com/index.php/1/about>
- [7] F. Jiang and J. A. Doudna, "CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 46, no. 1, pp. 505–529, May 2017, doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
- [8] V. Katta *et al.*, "Development and IND-enabling studies of a novel Cas9 genome-edited autologous CD34+ cell therapy to induce fetal hemoglobin for sickle cell disease," *Molecular Therapy*, vol. 32, no. 10, pp. 3433–3452, Oct. 2024, doi: 10.1016/j.ymthe.2024.07.022.
- [9] G. Frati *et al.*, "Safety and efficacy studies of CRISPR-Cas9 treatment of sickle cell disease highlights disease-specific responses," *Molecular Therapy*, vol. 32, no. 12, pp. 4337–4352, Dec. 2024, doi: 10.1016/j.ymthe.2024.07.015.
- [10] T. Wang *et al.*, "In vivo genome editing with a novel Cj4Cas9," *Commun. Biol.*, vol. 9, no. 1, p. 152, Dec. 2025, doi: 10.1038/s42003-025-09430-9.
- [11] A. A. Abraham and J. F. Tisdale, "Gene therapy for sickle cell disease: moving from the bench to the bedside," *Blood*, vol. 138, no. 11, pp. 932–941, Sep. 2021, doi: 10.1182/blood.2019003776.
- [12] D. Matsumoto, E. Matsugi, K. Kishi, Y. Inoue, K. Nigorikawa, and W. Nomura, "SpCas9-HF1 enhances accuracy of cell cycle-dependent genome editing by increasing HDR efficiency, and by reducing off-target effects and indel rates," *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 35, no. 1, p. 102124, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.omtn.2024.102124.
- [13] P. I. Kulcsár *et al.*, "A cleavage rule for selection of increased-fidelity SpCas9 variants with high efficiency and no detectable off-targets," *Nat. Commun.*, vol. 14, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-41393-5.
- [14] W. Li *et al.*, "Efficient high-precision transgene knock-in by Recombinases (Red $\alpha/\beta$ )-enhanced DNA integration-CRISPR-Cas9 (RED-CRISPR)," *Nature Communications*, vol. 17, no. 1, Dec. 2026, doi: 10.1038/s41467-025-67239-w.
- [15] P. Chen *et al.*, "Highly parallel profiling of the activities and specificities of Cas12a variants in human cells," *Nature Communications*, vol. 16, no. 1, Dec. 2025, doi: 10.1038/s41467-025-57150-9.

- [16] C. Berthault *et al.*, “Highly Efficient Ex Vivo Correction of COL7A1 through Ribonucleoprotein-Based CRISPR/Cas9 and Homology-Directed Repair to Treat Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa,” *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 144, no. 6, pp. 1322-1333.e13, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.jid.2023.10.035.
- [17] K. M. Siow *et al.*, “Targeted knock-in of NCF1 cDNA into the NCF2 locus leads to myeloid phenotypic correction of p47phox-deficient chronic granulomatous disease,” *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 35, no. 3, Sep. 2024, doi: 10.1016/j.omtn.2024.102229.
- [18] A. Eid, S. Alshareef, and M. M. Mahfouz, “CRISPR base editors: Genome editing without double-stranded breaks,” Jun. 11, 2018, *Portland Press Ltd.* doi: 10.1042/BCJ20170793.
- [19] S. N. Begum and S. K. Hasan, “Prime Editing Driven Functional Genomics: Bridging Genotype to Phenotype in the Post-Genomic Era,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 27, no. 4, p. 1703, Feb. 2026, doi: 10.3390/ijms27041703.
- [20] Z. Zhang *et al.*, “Engineering an adenine base editor in human embryonic stem cells with minimal DNA and RNA off-target activities,” *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 29, pp. 502–510, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.omtn.2022.07.026.
- [21] C. Zhong *et al.*, “A Plug-in system for reprogramming the editing patterns of base editors,” *Nat. Commun.*, Dec. 2025, doi: 10.1038/s41467-025-67632-5.
- [22] L. Yin, A. Yin, and M. Jones, “Mitochondrial Base Editing of the m.8993T>G Mutation Restores Bioenergetics and Neural Differentiation in Patient iPSCs,” *Genes (Basel)*, vol. 16, no. 11, Nov. 2025, doi: 10.3390/genes16111298.
- [23] D. Leclerc *et al.*, “Gene Editing Corrects In Vitro a G > A GLB1 Transition from a GM1 Gangliosidosis Patient,” *CRISPR Journal*, vol. 6, no. 1, pp. 17–31, Feb. 2023, doi: 10.1089/crispr.2022.0045.
- [24] A. V. Anzalone *et al.*, “Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA,” *Nature*, vol. 576, no. 7785, pp. 149–157, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1711-4.
- [25] C. Yang *et al.*, “Prime editor with rational design and AI-driven optimization for reverse editing window and enhanced fidelity,” *Nature Communications*, vol. 16, no. 1, Dec. 2025, doi: 10.1038/s41467-025-60495-w.
- [26] M. Bulcaen *et al.*, “Prime editing functionally corrects cystic fibrosis-causing CFTR mutations in human organoids and airway epithelial cells,” *Cell Rep. Med.*, vol. 5, no. 5, May 2024, doi: 10.1016/j.xcrm.2024.101544.
- [27] T. Nishiyama *et al.*, “Precise genomic editing of pathogenic mutation in RBM20 rescues dilated cardiomyopathy,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 14, no. 672, Nov. 2022, doi: 10.1126/scitranslmed.ade1633.
- [28] P. J. Chen and D. R. Liu, “Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 24, no. 3, pp. 161–177, Mar. 2023, doi: 10.1038/s41576-022-00541-1.
- [29] T. Wang *et al.*, “In vivo genome editing with a novel Cj4Cas9,” *Commun. Biol.*, vol. 9, no. 125, p. 1, 2026, doi: 10.1038/s42003-025-09430-9.
- [30] N. S. Mikkelsen *et al.*, “Orthogonal CRISPR systems for targeted integration and multiplex base editing enable nonviral engineering of allogeneic CAR-T cells,” *Molecular Therapy*, vol. 33, no. 12, pp. 6082–6100, Dec. 2025, doi: 10.1016/j.ymthe.2025.08.032.
- [31] I. Valdez *et al.*, “A streamlined base editor engineering strategy to reduce bystander editing,” *Nature Communications*, vol. 16, no. 1, Dec. 2025, doi: 10.1038/s41467-025-63609-6.
- [32] D. Wei *et al.*, “AI-guided Cas9 engineering provides an effective strategy to enhance base editing,” *Molecular Systems Biology*, vol. 21, no. 11, pp. 1563–1580, Nov. 2025, doi: 10.1038/s44320-025-00142-0.
- [33] I. P. Joore *et al.*, “Correction of pathogenic mitochondrial DNA in patient-derived disease models using mitochondrial base editors,” *PLoS Biol.*, vol. 23, no. 6, Jun. 2025, doi: 10.1371/journal.pbio.3003207.
- [34] J. Geilenkeuser *et al.*, “Engineered nucleocytoplasmic vehicles for loading of programmable editors,” *Cell*, vol. 188, no. 10, pp. 2637–2655.e31, May 2025, doi: 10.1016/j.cell.2025.03.015.
- [35] Q. Chen *et al.*, “Engineering of Peptide-Inserted Base Editors with Enhanced Accuracy and Security,” *Small*, vol. 21, no. 14, Apr. 2025, doi: 10.1002/smll.202411583.
- [36] K. Xu *et al.*, “Structure-guided discovery of highly efficient cytidine deaminases with sequence-context independence,” *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 9, no. 1, pp. 93–108, Jan. 2025, doi: 10.1038/s41551-024-01220-8.
- [37] N. Zhao *et al.*, “Evolved cytidine and adenine base editors with high precision and minimized off-target activity by a continuous directed evolution system in mammalian cells,” *Nature Communications*, vol. 15, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-52483-3.
- [38] S. Acharya *et al.*, “PAM-flexible Engineered FnCas9 variants for robust and ultra-precise genome editing and diagnostics,” *Nat. Commun.*, vol. 15, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-49233-w.
- [39] B. Naisseh *et al.*, “Context base editing for splice correction of IVS1-110  $\beta$ -thalassemia,” *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 35, no. 2, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.omtn.2024.102183.
- [40] A. Sharrar *et al.*, “Discovery and engineering of AiEvo2, a novel Cas12a nuclease for human gene editing applications,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 300, no. 3, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.jbc.2024.105685.
- [41] Y. Liu *et al.*, “Adenine base editor-mediated splicing remodeling activates noncanonical splice sites,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 299, no. 12, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.jbc.2023.105442.
- [42] D. Zhao *et al.*, “Engineered domain-inlaid Nme2Cas9 adenine base editors with increased on-target DNA editing and targeting scope,” *BMC Biol.*, vol. 21, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1186/s12915-023-01754-4.
- [43] Y. Qian *et al.*, “A new compact adenine base editor generated through deletion of HNH and REC2 domain of SpCas9,” *BMC Biol.*, vol. 21, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1186/s12915-023-01644-9.
- [44] A. T. Joynt *et al.*, “Protospacer modification improves base editing of a canonical splice site variant and recovery of CFTR function in human airway epithelial cells,” *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 33, pp. 335–350, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.omtn.2023.06.020.
- [45] M. E. Neugebauer *et al.*, “Evolution of an adenine base editor into a small, efficient cytosine base editor with low off-target activity,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 41, no. 5, pp. 673–685, May 2023, doi: 10.1038/s41587-022-01533-6.
- [46] S. Yin *et al.*, “Engineering of efficiency-enhanced Cas9 and base editors with improved gene therapy efficacies,” *Molecular Therapy*, vol. 31, no. 3, pp. 744–759, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.ymthe.2022.11.014.
- [47] P. I. Kulcsár, A. Tálas, Z. Ligeti, S. L. Krausz, and E. Welker, “SuperFi-Cas9 exhibits remarkable fidelity but severely reduced activity yet works effectively with ABE8e,” *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-34527-8.
- [48] A. K. Sangree *et al.*, “Benchmarking of SpCas9 variants enables deeper base editor screens of BRCA1 and BCL2,” *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-28884-7.
- [49] J. R. Davis *et al.*, “Efficient in vivo base editing via single adeno-associated viruses with size-optimized genomes encoding compact adenine base editors,” *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 6, no. 11, pp. 1272–1283, Nov. 2022, doi: 10.1038/s41551-022-00911-4.
- [50] I. Petković *et al.*, “COL17A1 editing via homology-directed repair in junctional epidermolysis bullosa,” *Front. Med. (Lausanne)*, vol. 9, Aug. 2022, doi: 10.3389/fmed.2022.976604.

- [51] C. Stadelmann, S. Di Francescantonio, A. Marg, S. Müthel, S. Spuler, and H. Escobar, "mRNA-mediated delivery of gene editing tools to human primary muscle stem cells," *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 28, pp. 47–57, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.omtn.2022.02.016.
- [52] R. Ibraheim *et al.*, "Self-inactivating, all-in-one AAV vectors for precision Cas9 genome editing via homology-directed repair in vivo," *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-26518-y.
- [53] D. Šikrová, V. A. Cadar, Y. Ariyurek, J. F. J. Laros, J. Balog, and S. M. van der Maarel, "Adenine base editing of the DUX4 polyadenylation signal for targeted genetic therapy in facioscapulohumeral muscular dystrophy," *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 25, pp. 342–354, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.omtn.2021.05.020.
- [54] S. Balderston *et al.*, "Discrimination of single-point mutations in unamplified genomic DNA via Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 5, no. 7, pp. 713–725, Jul. 2021, doi: 10.1038/s41551-021-00706-z.
- [55] C. A. Vasquez, Q. T. Cowan, and A. C. Komor, "Base Editing in Human Cells to Produce Single-Nucleotide-Variant Clonal Cell Lines," *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, vol. 133, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1002/cpmb.129.
- [56] H. Xie *et al.*, "High-fidelity SaCas9 identified by directional screening in human cells," *PLoS Biol.*, vol. 18, no. 7, Jul. 2020, doi: 10.1371/journal.pbio.3000747.
- [57] H. A. Rees *et al.*, "Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery," *Nat. Commun.*, vol. 8, Jun. 2017, doi: 10.1038/ncomms15790.
- [58] A. Edraki *et al.*, "A Compact, High-Accuracy Cas9 with a Dinucleotide PAM for In Vivo Genome Editing," *Mol. Cell*, vol. 73, no. 4, pp. 714–726.e4, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2018.12.003.