

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pangan sebagai bahan makanan diperlukan tubuh untuk keberlangsungan hidup manusia. Makanan memiliki fungsi primer, yaitu sebagai sumber zat gizi yang diperlukan tubuh sebagai sumber energi, regulasi sistem metabolisme, sumber pertumbuhan, serta menjaga jaringan tubuh. Makanan juga memiliki fungsi sekunder, yaitu mempunyai cita rasa yang baik, serta fungsi tersier, yaitu sebagai pemberi pengaruh fisiologis yang menguntungkan bagi tubuh (Tama *et al.*, 2023). Bahan pangan yang dikonsumsi perlu dipastikan aman, bersih dan terbebas dari kontaminasi cemaran yang dapat menimbulkan risiko kesehatan. Keamanan pangan juga berdampak pada kesejahteraan populasi hingga negara, selain berperan penting untuk memenuhi gizi individu. Bahaya keamanan pangan yang melebihi ambang batas tertentu dapat menyebabkan kerugian bagi masyarakat dan industri agropangan, yang kemudian mempengaruhi aspek ekonomi negara (Focker & Fels-Klerx, 2020).

Pangan yang aman berarti aman untuk diproduksi, disimpan, dan disiapkan sedemikian rupa sehingga konsumen tidak terkena dampak buruk, baik akut maupun kronis setelah mengonsumsinya. Pangan yang tidak aman berarti pangan yang terkontaminasi cemaran fisik, mikrobiologi, atau kimia yang berdampak buruk bagi kesehatan (Focker & Fels-Klerx, 2020). Kontaminasi cemaran pada pangan dapat menyebabkan *food-borne disease* dengan gejala ringan sampai fatal. Agen biologis pembawa *food-borne disease* dapat berupa

bakteri, virus, jamur, ragi, dan parasit. Patogenitas *food-borne disease* dapat terjadi melalui infeksi secara langsung oleh mikroorganisme yang terdapat pada pangan, kemudian mikroorganisme menetap pada saluran gastrointestinal dan mengalami inkubasi hingga menunjukkan gejala, atau dengan mengonsumsi pangan yang sudah terkontaminasi toksin yang disekresi oleh mikroorganisme tersebut (Afreen & Ucak, 2021). Individu dengan risiko tinggi terkena *Food-borne disease* meliputi anak kecil, orang lanjut usia, orang dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah, serta wanita hamil (Barkley *et al.*, 2016).

Food-borne disease dapat menimbulkan masalah kesehatan global yang signifikan. Berdasarkan data *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) tahun 2022, sebanyak 299 wabah *food-borne disease* terjadi di Amerika Serikat pada tahun 2020, yang menyebabkan 5.987 orang sakit, 641 orang dirawat inap dan 14 kematian. Berdasarkan data EFSA tahun 2022, pada tahun yang sama, di Eropa terjadi 3.166 wabah food-borne disease yang menyebabkan 22.010 orang sakit, 1.838 orang dirawat inap, dan 48 kematian (Zheng *et al.*, 2023). Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), hingga 30% populasi menderita *food-borne disease* setiap tahunnya pada negara-negara maju, sedangkan pada negara-negara berkembang diperkirakan *food-borne disease* menyebabkan 2 juta kematian setiap tahunnya (Abebe *et al.*, 2020).

Mikroorganisme dapat mencemari produk pangan seperti makanan segar dan mentah, ikan-ikanan, daging, unggas, telur, serta produk susu, selama masa pertumbuhan, pemanenan, pemrosesan, penyimpanan, pengiriman, hingga pengawetan pangan (Kabiraz *et al.*, 2023). *Pseudomonas aeruginosa*

merupakan salah satu patogen oportunistik yang dapat mengakibatkan gangguan saluran pernapasan, baik dari gejala ringan hingga berat. *P. aeruginosa* dapat dengan mudah ditemukan di berbagai kondisi lingkungan akibat kemampuan metabolismenya dan sekresi mekanisme tertentu. *P. aeruginosa* secara alami dapat ditemukan di air, tanaman, tanah, lingkungan dengan kondisi lembab, serta mudah mengkontaminasi berbagai jenis makanan (Oliver *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* ditemukan terdapat pada air mineral kemasan, air keran, produk *dairy*, ikan-ikanan serta sayuran siap saji dan berpotensi menjadi sumber patogen *food-borne* yang dapat membahayakan kelompok rentan (Rahman *et al.*, 2022). Keberadaan *P. aeruginosa* dalam pangan dapat menyebabkan penyakit dan memicu pembusukan. *P. aeruginosa* dapat menyebabkan pembusukan pada makanan dan merupakan patogen bagi manusia dan hewan, serta seringkali menyebabkan infeksi sekunder. *P. aeruginosa* merupakan sumber umum infeksi nosokomial, dan menjangkit orang-orang dengan sistem imun lemah serta fibrosis kistik. Infeksi yang paling umum terjadi pada kornea, kulit, saluran kemih, dan saluran pernapasan, meskipun infeksi pada dasarnya dapat terjadi di semua lokasi anatomi (Raposo *et al.*, 2016).

Pseudomonas aeruginosa memiliki faktor virulensi beragam yang membantu dalam perkembangan infeksi hingga pertahanan diri. Salah satu faktor virulensi *P. aeruginosa* yaitu dengan memproduksi fenazin yang dapat berdampak buruk pada sel inang, meliputi kerusakan langsung pada jaringan sel inang melalui pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), perubahan

produksi sitokin, penghambatan gerakan silia pada epitel sel inang, dan memicu gangguan sinyal sel. Fenazin dapat menyebabkan apoptosis pada sel, menghambat dan memberhentikan siklus sel, serta menginduksi penuaan dini suatu sel. Fenazin juga dapat memberikan efek toksik pada sel lain, namun menguntungkan produsennya dengan memediasi transfer elektron ekstraseluler dan kelangsungan hidup pada lingkungan anoksik (Vilaplana & Marco, 2020).

Metode deteksi akurat keberadaan *P. aeruginosa* diperlukan untuk mengidentifikasi dan mengendalikan penyebaran patogen sebelum wabah parah terjadi. Berbagai metode deteksi telah dikembangkan untuk mengidentifikasi patogen *food-borne disease*, mulai dari metode konvensional hingga metode berbasis molekuler. Metode konvensional dilakukan berbasis kultur pada petri agar dan identifikasi biokimia. Metode konvensional memberikan hasil yang sensitif, prosedur sederhana, dan umumnya berbiaya rendah, namun, metode konvensional memerlukan waktu pengerjaan beberapa hari, bergantung pada pertumbuhan bakteri (Wang & Salazar, 2016). Metode berbasis molekuler meliputi metode berbasis asam nukleat atau *immunoassay*, seperti *polymerase chain reaction (PCR)*, *multiplex PCR*, *real-time PCR (qPCR)*, *reverse transcriptase PCR (RT-PCR)*, *DNA microarrays*, *nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)*, teknik amplifikasi DNA secara isothermal serta *next-generation sequencing* (Paparella & Maggio, 2023). Uji molekuler seperti PCR dapat bersifat cepat, namun jumlah sel yang hidup dapat terhitung berlebihan oleh adanya amplifikasi DNA dari sel mati dan DNA ekstraseluler pada sampel (Wang & Salazar, 2016). Amplifikasi sel mati dan DNA ekstraseluler dapat

memberikan kekeliruan hasil dan berisiko terhadap validitas uji. Metode berbasis molekuler seperti PCR, ELISA, dan *flow cytometry* memang lebih cepat dibandingkan kultur, namun metode berbasis molekuler membutuhkan ketergantungan laboratorium, kurang sensitif dan tidak dapat dilakukan secara *on-site* (Xing *et al.*, 2023). Adanya urgensi sensitivitas dan spesifitas pemantauan bakteri dalam pemeriksaan keamanan pangan maka dibutuhkan pengembangan metode deteksi dengan kecepatan, sensitivitas, spesifisitas, dan keandalan yang tinggi (Li *et al.*, 2023).

Sistem CRISPR/Cas merupakan salah satu kandidat metode deteksi berbasis asam nukleat yang menjanjikan. Sistem CRISPR/Cas merupakan sistem endonuklease yang terdiri atas sekuens *crRNA* serta enzim Cas. Prinsip sistem CRISPR/Cas yaitu *crRNA* memandu enzim Cas ke sekuens target lewat pasangan basa Watson-Crick yang sederhana, kemudian enzim Cas memodifikasi template dengan memutus untai ganda pada lokasi tertentu (Lim & Kim, 2022). Sistem CRISPR/Cas terbagi atas 2 kelas, 6 tipe dan 21 subtype. Deteksi mikroorganisme menggunakan CRISPR/Cas hingga saat ini menunjukkan hasil yang baik, terbukti dengan adanya sistem SHERLOCK dan DETECTR yang dikembangkan berdasarkan *trans-cleavage* menggunakan Cas13a dan Cas12a (Li *et al.*, 2023). Sistem CRISPR/Cas12a dapat menghasilkan aktivitas pembelahan yang memiliki spesifisitas dan sensitivitas kuat, serta fleksibel melalui proses sederhana (Wang *et al.*, 2020).

Berdasarkan uraian yang telah disebutkan, maka perlu dilakukan penelitian kajian preliminer CRISPR/Cas12a sebagai upaya deteksi cepat dan ultrasensitif

bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan gen virulensi *phzA2*. Kajian preliminar CRISPR/Cas12a sebagai upaya deteksi diharapkan dapat menjadi dasar penelitian lanjut terhadap pengaplikasian CRISPR/Cas12a dalam mendeteksi *Pseudomonas aeruginosa* secara cepat dan ultrasensitif.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka rumusan masalah yang dapat dikaji adalah sebagai berikut.

- 1.2.1 Bagaimana hasil analisis rancangan desain urutan basa CRISPR-RNA (crRNA) pada sistem CRISPR/Cas12a dengan target gen *phzA2* pada Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in silico*?
- 1.2.2 Bagaimana perancangan primer *forward* dan *reverse* untuk amplifikasi gen *phzA2* bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada sistem CRISPR/Cas12a?
- 1.2.3 Apakah primer *forward* dan *reverse* gen *phzA2* dapat mengamplifikasi gen *phzA2* pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*?
- 1.2.4 Bagaimana hasil analisis sekunsing gen *phzA2* pada *Pseudomonas aeruginosa*?
- 1.2.5 Bagaimana spesifisitas dan sensitivitas primer gen *phzA2* pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*?
- 1.2.6 Bagaimana sensitivitas gen *phzA2* pada sampel yang tercemar *Pseudomonas aeruginosa*?

1.3 Tujuan

- 1.3.1 Merancang CRISPR RNA (crRNA) pada sistem CRISPR/Cas12a dengan target gen *phzA2* pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in silico*
- 1.3.2 Merancang primer *forward* dan *reverse* untuk amplifikasi gen *phzA2* bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada sistem CRISPR/Cas12a secara *in silico*
- 1.3.3 Menganalisis kemampuan primer *forward* dan *reverse* gen *phzA2* dalam mengamplifikasi gen *phzA2* pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*
- 1.3.4 Menganalisis sekuens DNA bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang diamplifikasi dengan primer gen *phzA2*
- 1.3.5 Menguji spesifisitas dan sensitivitas primer *forward* dan *reverse* gen *phzA2* bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan PCR
- 1.3.6 Mengetahui sensitivitas gen *phzA2* pada sampel yang tercemar *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan PCR

1.4 Manfaat

Adanya penelitian diharapkan dapat menjadi landasan dan memperluas wawasan terkait pengaplikasian biosensor dalam deteksi mikroorganisme patogen yang terdapat pada pangan dan menyebabkan *food-borne disease*. Penelitian diharapkan dapat menjadi kajian awal untuk penelitian lanjut terhadap sistem CRISPR/Cas12a, sehingga dapat lebih umum diaplikasikan untuk deteksi *P. aeruginosa* secara cepat dan ultrasensitif. Penelitian juga diharapkan dapat memperluas wawasan terkait *P. aeruginosa* sebagai patogen *food-borne* dan membantu pencegahan maupun penanganan kasus yang ditimbulkan akibat *P. aeruginosa*.