

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Bakteri merupakan sekelompok organisme kecil yang dapat menyebabkan infeksi yang mengganggu kesehatan manusia. Salah satu bakteri yang menginfeksi manusia yaitu *Escherichia coli* (*E. coli*) (Larsen, 2017). Bakteri ini dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti keracunan, meningitis, myositis, hingga infeksi aliran darah primer (IADP) yang menyebabkan lebih dari 40.000 kematian di Amerika Serikat (Vila *et al.*, 2016). Tidak hanya itu, bakteri ini merupakan penyebab utama kejadian diare akut pada wisatawan dan penyebab diare berkepanjangan pada penderita HIV/AIDS (Ellis *et al.*, 2020). Menurut data dari *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2010, sekitar 800.000 anak di bawah usia 5 tahun (Balita) atau setara dengan satu dari sepuluh anak meninggal setiap tahunnya akibat infeksi diare sehingga disebut sebagai penyebab kematian Balita kedua di Indonesia (Anggreli dkk., 2015). Tingginya kasus kesakitan akibat infeksi bakteri *E. coli* menunjukkan pentingnya metode pemeriksaan yang dapat mendeteksi keberadaan bakteri dengan cepat dan tepat untuk mendukung penegakan diagnosa dan pemberian tatalaksana (Mueller *et al.*, 2023).

Pemeriksaan *E. coli* dapat dilakukan dengan berbagai metode. Sampel biologis umumnya diperiksa dengan metode konvensional berupa uji serologis, uji biokimia, dan metode biakan (kultur). Namun, metode ini memerlukan waktu yang relatif lama, memerlukan sampel dalam jumlah banyak, dan dapat berisiko didapatkan hasil yang tidak spesifik (Bakri dkk., 2015). Selain pada sampel biologis, pemeriksaan *E. coli* juga penting dilakukan pada sampel pangan dan deteksi

cemaran air untuk mencegah penyebaran infeksi dari lingkungan ke dalam tubuh yang dapat menyebabkan masalah kesehatan seperti keracunan. Pemeriksaan yang umum dilakukan pada sampel non biologis adalah deteksi mikroba atau perhitungan angka kuman. Namun, pemeriksaan ini tidak spesifik untuk mendeteksi bakteri tertentu termasuk *E. coli* karena dalam metode pemeriksaan akan terdeteksi berbagai jenis mikroba pada sampel (Ekawati dkk., 2017). Hal ini menunjukkan perlunya metode pemeriksaan yang dapat mendeteksi bakteri *E. coli* secara spesifik dengan metode yang cepat dan tepat (Mueller *et al.*, 2023).

Seiring perkembangan teknologi laboratorium, berkembang metode pemeriksaan *E. coli* berbasis molekuler yaitu *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang hanya memerlukan sedikit sampel dan dapat memberikan hasil spesifik dalam waktu singkat. Dalam penelitian Bakri, dkk. (2015) dibuktikan bahwa metode PCR memberikan hasil yang akurat dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan metode kultur. Pemeriksaan PCR menggunakan potongan pendek DNA untai tunggal yang komplemen dengan urutan gen target yang disebut dengan primer. Perancangan primer harus memenuhi kriteria untuk amplifikasi dan spesifik terhadap gen target untuk menjamin keberhasilan amplifikasi (Purwakasih dkk., 2021). Perancangan desain primer dapat dilakukan dengan pemanfaatan bioinformatika dengan metode *in silico*. Metode ini memungkinkan perancangan desain primer baru hingga didapatkan primer spesifik dengan metode PCR terbaik untuk mendeteksi bakteri *E. coli* (Fakih dkk., 2021).

Penelitian menunjukkan bahwa sekuen bakteri dapat memiliki kemiripan hingga 99% sehingga memungkinkan sebuah primer mengamplifikasi lebih dari satu jenis bakteri (Putri, 2021). Berdasarkan penelitian tersebut, peneliti melakukan

uji pendahuluan dengan melakukan pensejajaran sekuen >NC_000913.3 *Escherichia coli* str. K-12 dengan >AE005674.2 *Shigella flexneri* 2a str. 301 dan didapatkan bahwa hanya terdapat 42 dari 70.086 sekuen yang berbeda sehingga memiliki tingkat kemiripan 99%. Penelitian Putri (2021) melakukan perancangan desain primer dalam metode PCR konvensional untuk mendeteksi bakteri *E. coli*. Namun, primer dengan metode PCR yang dihasilkan dalam penelitian tersebut masih memungkinkan terjadinya reaksi silang dengan bakteri lain sehingga dapat menimbulkan risiko positif palsu. Pada penelitian ini telah dilakukan uji pendahuluan dengan merancang beberapa pasangan primer yang keseluruhannya tidak spesifik hanya pada *E. coli*. Primer *forward* TCTCCGTGAAGCTGGTTTCC dan primer *reverse* GCGACCAATCAGATCCACCA dengan berat molekul produk 509 bp masih komplemen dengan sekuen dari spesies lain seperti *Shigella*, *Citrobacter*, dan *Phytobacter*. Hal ini menunjukkan bahwa perancangan desain primer perlu didukung dengan penggunaan metode yang optimal sehingga dapat mendeteksi secara spesifik terhadap bakteri *E. coli* (Suryani dkk., 2019).

Berdasarkan permasalahan di atas, peneliti tertarik untuk merancang desain primer yang didukung dengan metode PCR optimal dalam mendeteksi bakteri *E. coli* secara spesifik. Pada penelitian ini dirancang dua pasang desain primer yang digunakan dalam dua reaksi PCR berurutan yang dikenal dengan *Nested PCR*. Primer yang dirancang harus memenuhi syarat primer, yaitu memiliki berat molekul 18 – 20 bp, %GC 40 – 60%, nilai Tm 50 – 65°C, serta tidak terdapat hairpin maupun dimer (Melati dkk., 2022). Pada *Nested PCR*, produk hasil reaksi pertama dijadikan sebagai template DNA dalam reaksi kedua sehingga akan dihasilkan produk yang spesifik terhadap gen target (Green *et al.*, 2019). Oleh karena itu, konsentrasi DNA

pada hasil reaksi pertama akan berpengaruh terhadap hasil amplifikasi reaksi kedua sehingga perlu dilakukan optimasi jumlah siklus reaksi pertama untuk mendapatkan konsentrasi DNA templat reaksi kedua yang sesuai. Selain itu, setiap desain primer memiliki titik leleh (T_m) yang berbeda dan akan berpengaruh pada suhu penempelan primer (T_a). Oleh karena itu, pada penelitian ini juga dilakukan optimasi pada konsentrasi primer dan suhu penempelan primer (*annealing*). Hasil penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan sensitifitas dan spesifisitas deteksi bakteri *E. coli* sehingga metode *Nested* PCR dapat dijadikan metode diagnostik dalam upaya menutupi kekurangan pemeriksaan bakteri dengan metode konvensional.

B. Rumusan Masalah Penelitian

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka permasalahan yang ingin diteliti adalah:

1. Bagaimana desain primer yang spesifik untuk mendeteksi bakteri *E. coli*?
2. Bagaimana hasil ekstraksi DNA yang sesuai sebagai template pada proses PCR?
3. Bagaimana reaksi *Nested* PCR yang optimal dengan pasangan primer spesifik untuk mendeteksi bakteri *E. coli*?
4. Bagaimana hasil identifikasi bakteri *E. coli* dengan metode *Nested* PCR menggunakan primer spesifik?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan umum

Untuk mendapatkan desain primer serta reaksi *Nested Polymerase Chain Reaction* yang optimal sebagai deteksi spesifik bakteri *Escherichia coli*.

2. Tujuan khusus:

- a. Mendapatkan desain primer spesifik untuk mendeteksi bakteri *E. coli* dengan metode *Nested* PCR.
- b. Mendapatkan hasil ekstraksi DNA yang memenuhi syarat sebagai template PCR.
- c. Mendapatkan reaksi *Nested* PCR yang optimal dengan pasangan primer spesifik untuk mendeteksi bakteri *E. coli*
- d. Menganalisis hasil identifikasi bakteri *E. coli* dengan metode *Nested* PCR menggunakan primer spesifik.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi tambahan informasi bagi penelitian terkait pembuatan desain primer dan optimasi metode *Nested* PCR untuk mendeteksi bakteri *E. coli* secara spesifik di masa mendatang.

2. Manfaat praktis

Hasil penelitian diharapkan dapat meningkatkan kualitas hasil pemeriksaan keberadaan bakteri *E. coli* dalam penegakan diagnosis sehingga dapat meningkatkan kualitas tatalaksana yang diterima oleh masyarakat.