

SISTEMATIC REVIEW : CRISPR-CAS SEBAGAI ALTERNATIF DALAM MENGURANGI RESISTENSI ANTIBIOTIK

Rizatul Hikmah^{1*}, Afifa Dian Safitri², Baiq Khaeratinnisa Oktari³, Muhammad Iqbal Farobbi⁴, Baiq Ayu Wulan Maharani Putri⁵

Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Mataram^{1,2,3,4,5}

*Corresponding Author : rizatulhikmah7433@gmail.com

ABSTRAK

Resistensi antibiotik merupakan krisis kesehatan global dengan dampak serius, termasuk peningkatan morbiditas, mortalitas, dan beban ekonomi. Antibiotik konvensional semakin tidak efektif, sehingga diperlukan solusi inovatif. Salah satu teknologi yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah ini adalah sistem CRISPR-Cas yang merupakan alat pengeditan genom yang bekerja dengan cara menargetkan dan memanipulasi determinan genetik resistensi pada bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas CRISPR-Cas dalam menurunkan resistensi antibiotik pada berbagai bakteri patogen. Desain dalam artikel ini adalah sistematik review. Artikel yang dipilih yaitu artikel yang diterbitkan tahun 2017- 2024, tersedia dalam full-text, dan sumbernya mencakup jurnal nasional dan internasional. Hasil penelitian menunjukkan bahwa CRISPRCas efektif dalam mengurangi resistensi antibiotik melalui beberapa mekanisme, termasuk pemotongan plasmid pembawa gen resistensi, represi transkripsi gen, dan peningkatan sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa sistem ini mampu mencegah transfer gen horizontal, mengurangi ekspresi gen resistensi, dan menghilangkan plasmid dengan salinan tinggi pada bakteri patogen. Meskipun memiliki potensi besar, tantangan seperti efek off-target dan adaptasi genetik bakteri tetap memerlukan pengembangan lebih lanjut untuk aplikasi klinis yang optimal. Sebagai kesimpulan, teknologi CRISPR-Cas memiliki potensi besar untuk menjadi alternatif dalam terapi resistensi antibiotik, meskipun masih ada beberapa keterbatasan yang memerlukan pengembangan lebih lanjut, terutama terkait dengan tantangan *off-target*.

Kata kunci : antibiotik, CRISPR-Cas, resistensi

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a global health crisis with serious impacts, including increased morbidity, mortality, and economic burden. Conventional antibiotics are becoming less effective, making innovative solutions necessary. One promising technology to address this issue is the CRISPR-Cas system, a genome-editing tool that works by targeting and manipulating the genetic determinants of resistance in bacteria. This study aims to evaluate the effectiveness of CRISPR-Cas in reducing antibiotic resistance in various pathogenic bacteria. The design of this article is a systematic review, focusing on articles published between 2017 and 2024 that are available in full-text and sourced from both national and international journals. The findings show that CRISPR-Cas is effective in reducing antibiotic resistance through several mechanisms, including cutting plasmids carrying resistance genes, repressing gene transcription, and increasing bacterial sensitivity to antibiotics. The study also highlights CRISPR-Cas's ability to prevent horizontal gene transfer, reduce the expression of resistance genes, and eliminate high-copy plasmids in pathogenic bacteria. While this technology shows great potential, challenges such as off-target effects and bacterial genetic adaptations require further development for optimal clinical application. In conclusion, CRISPR-Cas technology has significant potential as an alternative in antibiotic resistance therapy, although some limitations, particularly off-target challenges, need further improvement.

Keywords : antibiotics, CRISPR-Cas, resistance

PENDAHULUAN

Antibiotik atau antibiotika merupakan salah satu golongan senyawa sintesis atau alami yang sering dimanfaatkan dalam menghentikan proses biokimia terhadap suatu organisme,

khususnya pada proses infeksi bakteri (Wulandari et al., 2023). Penggunaan antibiotik yang tidak rasional dapat menimbulkan efek samping dan membuat mikroorganisme menjadi resisten. Efek samping tersebut berupa toksisitas, efek biologis, alergi, dan bahkan kematian (Herawati et al., 2023). Resistensi antibiotik merupakan salah satu krisis global yang mengancam kesehatan masyarakat di seluruh dunia. Resistensi antibiotik ini menunjukkan kemampuan mikroorganisme untuk menghambat aksi dari agen antimikroba dan fenomena ini terjadi ketika antibiotik kehilangan efisiensinya untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Putri et al., 2023). Berdasarkan *World Health Organization* (WHO), sejumlah kematian yang disebabkan oleh resistensi antibiotik di dunia mencapai 1,27 juta kematian pada tahun 2019 dan diperkirakan akan meningkat sebesar 50% jika tidak ada penanganan yang tepat hingga tahun 2050 (Naghavi et al., 2024).

Resistensi antibiotik terus meningkat akibat penggunaan antibiotik secara luas, dengan gen resistansi antimikroba (ARGs) menyebar melalui kromosom bakteri dan elemen genetik bergerak (MGEs) seperti plasmid dan transposon. Mekanisme resistansi mencakup produksi enzim modifikasi, perubahan target obat, peningkatan pompa efluks, dan pembentukan biofilm yang menghambat efektivitas antibiotik. ARGs dapat ditransfer secara vertikal melalui mutasi kromosom atau secara horizontal melalui konjugasi, transduksi, dan transformasi alami yang dimediasi MGEs, menyebabkan penyebaran resistansi di bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Untuk mengatasi tantangan ini, diperlukan penelitian dan pengembangan agen terapi baru (Tao et al., 2022). Adapun dampak negatif yang ditimbulkan dari kejadian resistensi antibiotik yaitu angka morbiditas (angka kesakitan) dan mortalitas (angka kematian) yang semakin meningkat karena risiko penyebaran infeksi akibat bakteri yang resisten serta biaya pengobatan yang lebih mahal (Fidia et al., 2024).

Menurut Komite Pengendalian Resistensi Antimikroba pada tahun 2013, 2016, dan tahun 2019 mengatakan bahwa tingkat resistensi bakteri di Indonesia terus meningkat. Pada tahun 2019, resistensi bakteri menunjukkan kenaikan persentase dari 40 %, 60 %, dan 60,4 %. Peningkatan tersebut disebabkan karena penggunaan antibiotik yang tidak terkendali dan penyebab bakteri mengalami resistensi yaitu kesalahan penggunaan antibiotik (Marsudi, 2022). Munculnya strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik merupakan sumber masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia. Karena penemuan antibiotik konvensional baru telah terhenti secara signifikan selama dekade terakhir, ada urgensi untuk mengembangkan pendekatan baru untuk mengatasi resistensi obat pada penyakit menular (Mayorga-Ramos et al., 2023).

Berdasarkan studi epidemiologi di ICU menunjukkan bahwa 75% infeksi disebabkan oleh bakteri Gram-negatif, seperti *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*, dan *Escherichia coli*, sementara 25% lainnya oleh bakteri Gram-positif. *K. pneumoniae* sering menyebabkan infeksi saluran kemih akibat penggunaan kateter jangka panjang, sedangkan *Pseudomonas spp.* dan *E. coli* umumnya menyebabkan infeksi saluran pernapasan terkait ventilator serta infeksi pada luka operasi. Beberapa bakteri ini, termasuk *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*, dan *E. coli*, telah menunjukkan resistansi multidrug (MDR) dan resistansi terhadap sefalosporin spektrum luas (ESC). Antibiotik yang sering digunakan di ICU meliputi golongan beta-laktam (imipenem, sefalosporin generasi ketiga, piperasilin-tazobaktam, meropenem), fluorokuinolon (levofloksasin, siprofloksasin), aminoglikosida, dan liopeptida seperti vankomisin (Meriyani, et al., 2021).

Selain itu, kasus resistensi bakteri yang menyebabkan hilangnya efektivitas antibiotik semakin banyak sehingga dilakukan berbagai penelitian untuk mengatasi hal tersebut. Penelitian tersebut bertujuan untuk mencari terapi alternatif sebagai pengganti antibiotik yang resisten. Adapun beberapa terapi alternatif yang sudah banyak digunakan diberbagai penjuru dunia meliputi sistem imun dan penggunaan bakteriofag. Selain itu, kemajuan dalam bidang

bioteknologi, rekayasa genetika, dan kimia sintetik juga telah menghasilkan berbagai pendekatan baru, seperti probiotik, lisin, peptida antimikroba, serta teknologi CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). CRISPR, sebagai inovasi mutakhir, menjadi salah satu solusi menjanjikan dalam menghadapi masalah resistensi antimikroba, terutama mengingat penggunaan antibiotik yang sangat luas telah menyebabkan banyak jenis bakteri menjadi semakin kebal terhadap pengobatan tersebut (Soetedjo et al., 2021).

Teknologi berbasis rekayasa genetika seperti CRISPR-Cas dapat digunakan sebagai solusi yang potensial di tengah keterbatasan menggunakan terapi antibiotik konvensional yang menunjukkan peningkatan terhadap angka resistensi. CRISPR-Cas merupakan rekayasa genetik yang digunakan untuk mengedit genom dengan presisi yang tinggi dengan melibatkan pemotongan untai ganda DNA oleh Cas9 yang kemudian diperbaiki oleh mekanisme NHEJ atau HDR. Metode ini dapat digunakan untuk menargetkan bakteri yang resisten terhadap antibiotik dengan memodifikasi gen bakteri dan menyebabkan kematian pada bakteri yang resisten ataupun mengembalikan kepekaan bakteri terhadap antibiotik (Y. Xu & Li, 2020).

Mekanisme penyuntingan genom CRISPR/Cas-9 terdiri dari tiga langkah utama: pengenalan, pemotongan, dan perbaikan. sgRNA (single-guide RNA) mengarahkan Cas-9 untuk mengenali urutan target pada gen melalui pasangan basa komplementer di bagian 5'crRNA. Cas-9 tetap tidak aktif tanpa sgRNA. Enzim Cas-9 memotong DNA beruntai ganda (DSB) pada lokasi 3 basa sebelum urutan PAM, yang merupakan urutan pendek (2–5 basa) yang bervariasi antar spesies bakteri. Cas-9 biasanya mengenali PAM 5'-NGG-3'. Setelah menemukan situs target dengan PAM yang sesuai, Cas-9 memicu pencairan DNA lokal dan membentuk hibrida RNA-DNA, meskipun mekanisme pencairan ini belum sepenuhnya dipahami. Domain HNH memotong untai komplementer, sedangkan domain RuvC memotong untai non-komplementer, menghasilkan DSB dengan ujung tumpul. Pemotongan ini kemudian diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA sel inang (Mengstie & Wondimu, 2021).

Tujuan dari *systematic review* ini adalah untuk mengevaluasi dan mengidentifikasi efektivitas teknologi CRISPR-Cas sebagai alternatif untuk mengatasi resistensi antibiotik.

METODE

Metode yang diterapkan dalam penyusunan artikel ini adalah *systematic review*. Sumber literatur yang digunakan mencakup jurnal nasional dan internasional yang diambil dari *platform* ilmiah seperti *Google Scholar*, *Elsevier*, dan *PubMed*. Pencarian literatur dilakukan dengan menggunakan kata kunci: *Biotechnology*, *CRISPR-Cas*, *Antibiotic*, *Resistance*. Kemudian artikel yang diambil harus relevan dan sesuai kriteria inklusi yaitu artikel yang diterbitkan tahun 2017- 2024, tersedia dalam full-text dan membahas terkait kemampuan CRISPR-Cas dalam mengatasi resistensi antibiotik. Pencarian dilakukan pada bulan agustus- september 2024. Untuk menggabungkan kata kunci, operator Boolean “ AND” dan “OR” diterapkan dalam pencarian. Berdasarkan tiga *platform* ilmiah seperti *Google Scholar*, *Elsevier*, dan *PubMed*, pencarian awal menghasilkan 623 artikel. Dari artikel tersebut disaring mana artikel yang relevan sesuai dengan topik yang mau dibahas yaitu terkait kemampuan CRISPR-Cas dalam mengatasi resistensi antibiotik. Hasil akhirnya, dihasilkan 21 artikel yang relevan dan full text yang bisa dilakukan analisa melalui *systematic review*.

HASIL

Berdasarkan tabel 1, dari dua satu artikel yang telah direview CRISPR-Cas efektif dalam mengatasi resistensi antibiotik. Selain itu penggunaan CRISPR-Cas menunjukkan keberhasilan mengatasi berbagai jenis bakteri seperti *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus*

aureus, *Candida albicans*, dan *Pseudomonas aeruginosa*, serta spesies dari genus *Acinetobacte*. Kedua faktor tersebut memungkinkan metode CRISPR-Cas berpotensi sebagai antimikroba. Akan tetapi, walaupun CRISPR-Cas efektif mengatasi bakteri resisten ataupun resistensi antibiotik, metode ini memiliki keterbatasan yaitu keterbatasan dalam menargetkan gen spesifik pada bakteri multiresisten oleh karena itu walaupun CRISPR-Cas efektif dalam mengatasi resistensi antibiotik akan tetapi diperlukan pengembangan lebih lanjut agar kemampuannya dalam mengurangi resistensi antibiotik terhadap berbagai jenis bakteri lebih efisien.

Tabel 1. Hasil Review Artikel CRISPR-Cas

No	Judul Jurnal	Hasil
1	<i>Effectiveness of CRISPR-Cas in Sensitizing Bacterial Populations with Plasmid-Encoded Antimicrobial Resistance</i> (Kippnich et al., 2024)	pCRISPR yang memotong plasmid (pCleaving) paling efektif terhadap plasmid AMR dengan jumlah salinan rendah, pSilencing lebih efektif pada plasmid AMR dengan jumlah salinan tinggi.
2	<i>Efficient Suppression of Natural Plasmid-Borne Gene Expression in Carbapenem-Resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> Using a Compact CRISPR Interference System</i> (Yao et al., 2022)	CRISPRi mampu menurunkan ekspresi mRNA blaNDM-1 hingga 900 kali lipat. Selain itu, CRISPRi mampu menekan ekspresi gen BlaSHV-12 dan BlaNDM-1 secara simultan yang menyebabkan penurunan resistensi meropenem dan aztreonam.
3	<i>Exploring the Potential of CRISPR-Cas9 Under Challenging Conditions: Facing High-Copy Plasmids and Counteracting Beta-Lactam Resistance in Clinical Strains of Enterobacteriaceae</i> (Tagliaferri, et al., 2020)	Pada strain model <i>E. coli</i> , CRISPR-Cas9 berhasil mengurangi jumlah plasmid pSB1A2 dan mengurangi ekspresi gen blaTEM-1, Pada isolat klinis <i>E. coli</i> , CRISPR-Cas9 berhasil menghapus plasmid yang membawa gen blaTEM-1.
4	<i>CRISPR-Cas blocks antibiotic resistance plasmid transfer between <i>Enterococcus faecalis</i> strains in the gastrointestinal</i> (Price et al., 2018)	CRISPR-Cas efektif dalam mencegah akuisisi plasmid resistansi antibiotik sebesar 85%, efektivitas sistem CRISPR-Cas jauh lebih tinggi di dalam kondisi in vivo.
5	<i>Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance</i> (Kang et al., 2017)	(Nanokompleks CRISPR menunjukkan efisiensi pengeditan genom yang lebih tinggi dibandingkan dengan kompleks CRISPR konvensional, dengan penurunan pertumbuhan MRSA sebesar 32%
6	<i>Bacterial resistance to CRISPR-Cas antimicrobials</i> (Uribe et al., 2021)	Efektivitas CRISPR-Cas9 tidak berkorelasi dengan jumlah situs pemotongan. Mutasi yang paling umum ditemukan berada pada gen SpCas9 yang berasal dari plasmid. Resistensi ini dapat diatasi dengan memperkenalkan kembali salinan utuh dari SpCas9 ke dalam bakteri.
7	<i>Targeted elimination of Vancomycin resistance gene <i>vanA</i> by CRISPR-Cas9 system</i> (Tao et al., 2023)	CRISPR-Cas9 berhasil menghapus plasmid vanA secara efektif dalam bakteri. Resistensi bakteri terhadap vancomycin menurun secara signifikan setelah penghapusan plasmid vanA.

8	<i>Tailoring CRISPR-Cas Immunity for the Degradation of Antibiotic Resistance Genes</i> (Li et al., 2022)	Sistem VADER berhasil mengeliminasi 100% target ARG pada bakteri yang menerima plasmid VADER melalui proses konjugasi. VADER terbukti efektif menunjukkan potensi besar untuk mengatasi masalah resistensi antibiotik.
9	<i>Novel PCR detection of CRISPR/Cas systems in Pseudomonas aeruginosa and its correlation with antibiotic resistance</i> (Naghavi et al., 2024)	subtipe CRISPR I-C, I-E, dan I-F1 masing-masing terdeteksi pada 10, 9, dan 13 isolat. Selain itu, ada korelasi signifikan antara keberadaan/ketiadaan sistem CRISPR/Cas dengan kerentanan terhadap beberapa antibiotik dan kemampuan pembentukan biofilm pada isolat klinis <i>P. aeruginosa</i> .
10	<i>Native CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing Enables Dissecting and Sensitizing Clinical Multidrug-Resistant P. aeruginosa</i> (Z. Xu et al., 2019)	Editing genom menggunakan CRISPR-Cas endogen berhasil dikembangkan. Tiga determinan resistensi utama (<i>gyrA</i> , <i>mexR</i> , <i>mexT</i>) berperan sinergis dalam memberikan resistensi obat yang kuat pada PA154197. PA154197 memiliki sensitivitas silang terhadap senyawa peptidomimetic kecil yang dapat mensensitifasi antibiotik.
11	<i>Engineering a CRISPR Interference System To Repress a Class 1 Integron in Escherichia coli</i> (Li et al., 2020)	CRISPRi mampu menekan ekspresi gen <i>dfrB2</i> dan <i>sulI</i> hingga 97% dan 84%, menurunkan IC50 trimethoprim 8 kali lipat dan sulfamethoxazole 32 kali lipat, menekan ekspresi <i>intI1</i> 96% dan menurunkan laju HGT <i>aadA</i> dan <i>aadB</i> 1000 kali lipat. Sistem SRISPRi terbukti dapat diatur, reversibel, dan stabil.
12	<i>Reducing Staphylococcus aureus Resistance to Lysostaphin using CRISPR-dCas9</i> (Wu et al., 2019)	Penurunan sintesis serta eksposisi WTAs di permukaan sel dapat meningkatkan sensitivitas <i>S. aureus</i> terhadap Lst di dalam media tumbuh.
13	<i>In Vivo Targeting of Clostridioides difficile Using Phage-Delivered CRISPR-Cas3 Antimicro</i> (Selle et al., 2020)	Bakteriofag yang mengandung CRISPR yang menargetkan genom <i>C. difficile</i> (crPhage) lebih efektif membunuh <i>C. difficile</i> baik secara in vivo atau in vitro pada tikus. crPhage mampu menurunkan jumlah CFU dan gejala klinis penyakit pada tikus lebih baik dibanding bakteriofag liar.
14	<i>CRISPR-mediated Genome Editing of the Human Fungal Pathogen Candida albicans</i> (Evans et al., 2018)	Metode CRISPR-Cas9 efektif untuk mengedit genom <i>C. albicans</i> . Stop kodon berhasil diinkorporasikan ke gen target TPK2 sehingga menghasilkan mutan nul. Metode ini potensial untuk pengembangan screen genom skala besar.
15	<i>Associate toxin-antitoxin with CRISPR-Cas to kill multidrug-resistant pathogens</i> (Wang et al., 2023)	Ditemukan tiga modul CreTA berpotensi pada tiga spesies <i>Acinetobacter</i> . Hanya modul CreTA dari <i>Acinetobacter</i> sp. WCHA45 yang dapat direboot ke <i>A. baumannii</i> AYE dengan penggantian elemen ulang. Gen CreA secara transkripsional menekan ekspresi gen toksin CreT. Toksin CreT dapat mengganggu inisiasi translasi karena kandungan struktur rambut dan kodon awal AUG yang penting.
16	<i>CRISPR-Based Gene Editing in Acinetobacter baumannii to Combat Antimicrobial Resistance</i> (Junaid et al., 2023)	CRISPR-Cas berhasil digunakan untuk penyuntingan gen pada berbagai spesies bakteri, termasuk <i>Acinetobacter baumannii</i> . CRISPR-Cas berpotensi besar untuk mengatasi AMR, tetapi diperlukan eksplorasi lebih lanjut dan teknik manipulasi gen yang lebih tepat.

17	<i>Insert sequences of CRISPR/Cas system regulate horizontal antibiotic gene transfer in Shigella</i> (Chen et al., 2019)	Penyisipan IS, seperti IS600 pada gen <i>cse2</i> , mengakibatkan penurunan ekspresi gen CRISPR terkait protein Cse2 hingga 5 kali lipat. Hal ini menyebabkan penurunan aktivitas sistem CRISPR/Cas, sehingga memungkinkan <i>Shigella</i> memperoleh gen resistensi melalui transfer gen horizontal.
18	<i>A dual-plasmid CRISPR/Cas9-based method for rapid and efficient genetic disruption in Mycobacterium abscessus</i> (Neo et al., 2024)	Metode ini lebih efisien dalam menghasilkan gangguan genetik dengan frekuensi mutasi yang jauh lebih tinggi dibandingkan metode berbasis rekombinasi homolog. Metode ini menciptakan gangguan pada beberapa gen secara simultan dan menyebabkan peningkatan sensitivitas terhadap antibiotik tertentu.
19	<i>Elimination of blaKPC-2-mediated carbapenem resistance in Escherichia coli by CRISPR-Cas9 system</i> (Tao, Chen, et al., 2023)	CRISPR-Cas9 mampu menghilangkan plasmid blaKPC-2 dengan efisiensi tinggi. Bakteri yang sebelumnya resisten menunjukkan penurunan resistensi yang signifikan setelah plasmid blaKPC-2 berhasil dipotong menyebabkan penurunan nilai MIC
20	<i>Novel PCR detection of CRISPR/Cas systems in Pseudomonas aeruginosa and its correlation with antibiotic resistance</i> (Soliman et al., 2022)	Terdapat korelasi signifikan antara keberadaan sistem CRISPR/Cas dengan sensitivitas terhadap piperasilin dan kapasitas pembentukan biofilm. Isolat yang positif CRISPR/Cas lebih sensitif terhadap piperasilin dan memiliki kapasitas pembentukan biofilm yang lebih tinggi dibandingkan isolat yang negatif.
21	<i>Engineering conjugative CRISPR-Cas9 systems for the targeted control of enteric pathogens and antibiotic resistance</i> (Sheng et al., 2023)	Plasmid konjugatif pRK24-CRISPR-Cas9 mampu mengeliminasi strain <i>E. coli</i> O157 yang membawa gen <i>eae</i> secara spesifik, tanpa mempengaruhi mutan Δeae yang tidak membawa target tersebut. Plasmid pTF18 mampu mengeliminasi plasmid resisten antibiotik blaCMY-2 dari bakteri yang ditargetkan dengan efisiensi eliminasi sebesar 53%.

PEMBAHASAN

Efektivitas Metode CRISPR-Cas Dalam Mengatasi Resistensi Antibiotik

Sistem CRISPR-Cas telah menunjukkan efektivitas yang menjanjikan dalam menurunkan resistensi antibiotik pada berbagai bakteri patogen. Beberapa metode yang digunakan dalam sistem CRISPR-Cas untuk mengurangi resistensi antibiotik diantaranya, meningkatkan sensitivitas bakteri, menekan ekspresi gen pada plasmid resistensi, menekan salinan tinggi gen resistensi, mencegah transfer plasmid resistensi dan sistem pengiriman nonviral. CRISPR-Cas dapat menargetkan gen resistensi pada plasmid melalui metode *pCleaving* (pemotongan DNA) dan *pSilencing* (represi gen transkripsi). Metode *pCleaving* menggunakan CRISPR untuk memotong gen resistensi, secara langsung menghilangkan resistensi di sel yang terinfeksi. Metode ini efektif terutama pada plasmid dengan *copy number* rendah. Namun, plasmid yang bermutasi atau plasmid dengan *copy number* tinggi lebih sulit diatasi dengan metode ini. Sementara itu, *pSilencing* menonaktifkan gen resistensi tanpa memotongnya. Metode ini efektif untuk plasmid dengan *copy number* tinggi, karena plasmid tetap ada tetapi tidak fungsional dalam menghasilkan resistensi (Kippnich et al., 2024).

Metode peningkatan sensitivitas bakteri melalui penggunaan sistem CRISPR *interference* (CRISPRi) bertujuan untuk menekan ekspresi gen-gen resistensi antibiotik yang terdapat pada *multidrug-resistant plasmid* (MDR). Metode CRISPRi berperan dalam menurunkan resistensi antibiotik dengan menonaktifkan gen-gen yang bertanggung jawab atas resistensi. Dalam hal

ini, sistem CRISPRi menargetkan gen resistensi secara spesifik, menghambat transkripsi gen tersebut tanpa merusak DNA, sehingga bakteri kehilangan mekanisme pertahanan terhadap antibiotik. Metode ini menyebabkan penurunan yang signifikan dalam MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) antibiotik, yang berarti bakteri menjadi lebih sensitif terhadap antibiotik (Yao et al., 2022). Selain itu, sistem CRISPR-Cas juga berfungsi sebagai pertahanan genom yang menghalangi perpindahan gen melalui transfer plasmid antar bakteri, yang merupakan mekanisme utama dalam penyebaran resistensi antibiotik. Plasmid yang membawa gen resistensi antibiotik ditransfer melalui mekanisme horizontal seperti konjugasi. CRISPRCas mencegah akuisisi plasmid tersebut dengan mengenali DNA asing dari plasmid dan memotongnya, sehingga mencegah plasmid berintegrasi ke dalam genom bakteri penerima (Price et al., 2018).

Metode CRISPR dengan pengiriman nonviral menggunakan kompleks nanokristal CRISPR yang dimodifikasi dengan polimer (*Cr-Nanocomplex*) dapat digunakan untuk mengurangi resistensi antibiotik karena kompleks nanokristal yang dimodifikasi dengan polimer (SpCas9-bPEI) memiliki kemampuan pengiriman yang lebih baik ke dalam sel bakteri dibandingkan dengan metode pengiriman CRISPR konvensional. Metode ini penting karena dinding sel bakteri yang tebal menjadi penghalang bagi pengiriman terapi gen. Penggunaan *Cr-Nanocomplex* dapat lebih efektif dalam mengedit gen dan mengurangi resistensi (Kang et al., 2017).

Metode CRISPR-Cas9 juga dapat digunakan untuk mengurangi resistensi antibiotik melalui penekanan *copy number* tinggi pada gen resistensi. Metode ini akan menargetkan gen yang mengalami resistensi lalu mengintroduksi pemotongan DNA pada gen tersebut yang akan menyebabkan terganggunya fungsi gen. Hal ini akan menyebabkan penurunan signifikan dalam jumlah salinan plasmid dan ekspresi gen resistensi sehingga terjadi pemulihan sensitivitas terhadap antibiotik. Melalui metode ini, CRISPRCAS berpotensi untuk mencegah penyebaran gen resistensi ke bakteri lain, baik secara vertikal (melalui pembelahan sel) maupun horizontal (melalui transfer plasmid) (Tagliaferri et al., 2020).

Keberhasilan Penggunaan CRISPR-Cas terhadap Berbagai Jenis Bakteri

Penggunaan teknologi CRISPR-Cas dalam penelitian bakteri patogen telah menunjukkan hasil yang signifikan, menegaskan potensinya dalam mengatasi resistensi antibiotik dan memanipulasi genetika bakteri. Berbagai studi menunjukkan efektivitas sistem ini pada beberapa spesies, termasuk *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, dan *Pseudomonas aeruginosa*, serta spesies dari genus *Acinetobacter*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sistem CRISPRCas, khususnya CRISPRi, efektif dalam mengurangi resistensi antibiotik pada *E. coli*.

Penelitian oleh Yao et al (2022) menunjukkan bahwa sistem CRISPR *interference* (CRISPRi) dapat secara efektif menekan ekspresi gen resistensi antibiotik yang terdapat pada plasmid alami dalam *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap karbapenem. Dalam penelitian ini, CRISPRi digunakan untuk menargetkan gen blaSHV-12 dan blaNDM-1, yang diketahui bertanggung jawab terhadap resistensi antibiotik seperti meropenem dan aztreonam. Melalui penekanan ekspresi kedua gen ini secara simultan, CRISPRi berhasil mengurangi tingkat resistensi bakteri *E. coli* terhadap antibiotik tersebut. Selain itu, sistem CRISPR *interference* (CRISPRi) berhasil menekan ekspresi gen pada *E. coli* yang membawa integron kelas 1, yang ditandai dengan CRISPRi berhasil menekan ekspresi gen dfrB2 dan sul1, yang masing-masing terkait dengan resistensi terhadap trimetoprim dan sulfametoksazol. Penekanan ekspresi kedua gen ini mengakibatkan penurunan signifikan dalam nilai IC₅₀ untuk kedua antibiotik tersebut, menunjukkan bahwa bakteri menjadi lebih rentan terhadap pengobatan. Penelitian ini menunjukkan potensi CRISPRi sebagai pendekatan yang efektif untuk mengurangi resistensi antibiotik dengan menargetkan elemen genetik yang terlibat dalam

penyebaran resistensi, seperti integron kelas 1 (Li et al., 2020). Adapun efektivitas sistem CRISPR-Cas9 dalam mengatasi resistensi antibiotik pada strain klinis *Enterobacteriaceae*, terutama dalam kondisi yang menantang seperti adanya plasmid dengan jumlah salinan tinggi, menunjukkan bahwa CRISPR-Cas9 berhasil mengurangi jumlah plasmid pSB1A2 yang membawa gen blaTEM-1, yang berperan dalam resistensi terhadap antibiotik beta-laktam. Hal ini menunjukkan bahwa CRISPR-Cas9 dapat secara signifikan menurunkan resistensi antibiotik pada *E. coli*. Sedangkan plasmid pTF18 mampu mengeliminasi plasmid resisten antibiotik blaCMY-2 dari bakteri yang ditargetkan (*E.coli* & *S.enterica*) dengan efisiensi eliminasi sebesar 53%. Selain itu sistem ini juga efektif dalam menargetkan dan menghilangkan gen resistensi vancomycin (*vanA*) dengan menghapus plasmid yang mengandung gen tersebut. Teknik ini berhasil mengurangi jumlah bakteri yang membawa gen *vanA*, sehingga menurunkan penyebaran resistensi antibiotik (Tagliaferri et al., 2020; Tao et al., 2023; Sheng et al., 2023).

Sistem CRISPR-dCas9 digunakan untuk meningkatkan sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap lisostafin, enzim lisis yang efektif melawan bakteri ini sehingga tingkat resistensi *S. aureus*. Menurun (Wu et al., 2019). Selain itu, telah dikembangkan metode CRISPR/Cas9 berbasis dual-plasmid yang terbukti sangat efisien dalam menghasilkan gangguan genetik pada *Mycobacterium abscessus*. Metode ini menghasilkan frekuensi mutasi yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan pendekatan berbasis rekombinasi homolog, serta mampu menciptakan gangguan pada beberapa gen secara simultan atau berurutan. Uji lebih lanjut menunjukkan bahwa mutasi yang dihasilkan meningkatkan sensitivitas *M. abscessus* terhadap antibiotik tertentu, menegaskan keberhasilan metode ini dalam memanipulasi genetika patogen resisten antibiotik yang sering menyebabkan infeksi serius (Neo et al., 2024).

Sistem CRISPR-Cas dapat digunakan juga dalam mengatasi resistensi antibiotik pada *Acinetobacter baumannii*, salah satu patogen yang sering menunjukkan resistensi *multidrug*. Penyuntingan gen menggunakan CRISPR-Cas dapat meningkatkan sensitivitas *A. baumannii* terhadap antibiotik, sedangkan modul CreTA dari *Acinetobacter sp.* WCHA45 berhasil diintegrasikan ke dalam *A. baumannii* AYE setelah modifikasi elemen ulang. Hal ini mengindikasikan bahwa sistem CRISPR-Cas dapat digunakan untuk menargetkan patogen MDR secara lebih efisien dengan memanfaatkan mekanisme toxin-antitoxin (TA) (Junaid et al., 2023; Wang et al., 2023). Selain itu, sistem ini juga berperan penting dalam karakteristik biologis *Pseudomonas aeruginosa*, terutama terkait resistensi antibiotik. Melalui penggunaan metode *novelPCR*, mereka menemukan korelasi signifikan antara keberadaan sistem CRISPR-Cas dan tingkat resistensi terhadap antibiotik, menunjukkan kontribusinya dalam evolusi resistensi pada patogen ini.

Teknologi CRISPR-Cas tidak hanya dapat diterapkan pada bakteri, namun pada jamur patogen juga, sehingga memperluas potensi penggunaannya dalam penelitian biomedis. Metode CRISPR-Cas terbukti efektif untuk mengedit genom dari patogen jamur, *Candida albicans*. Dengan kemampuan untuk melakukan modifikasi genetik pada *C. albicans*, penelitian ini membuka peluang baru untuk memahami mekanisme patogenisitas dan mengembangkan strategi terapeutik yang lebih efektif dalam menghadapi infeksi jamur yang resisten (Evans et al., 2018; Soliman et al., 2022).

Keterbatasan Dalam Terapi CRISPR-Cas dan Potensi CRISPR-Cas Sebagai Terapi Antimikroba

Sistem CRISPR-Cas menunjukkan efektivitas tinggi dalam mengurangi resistensi antibiotik, akan tetapi dalam aplikasinya ditemukan beberapa keterbatasan yang menyebabkan sistem ini masih memerlukan pengembangan lebih lanjut agar kemampuannya dalam mengurangi resistensi antibiotik terhadap berbagai jenis bakteri atau jamur lebih efisien. *Off-target* merupakan salah satu tantangan dalam penggunaan CRISPR-Cas. Pada tubuh manusia

terdapat rantai DNA yang sangat panjang dan basa nitrogennya berjumlah triliunan, sehingga membuat sistem CRISPR-Cas kesusahan dalam menargetkan gen yang spesifik. Hal ini mengakibatkan sistem ini hanya akan mengubah lokasi spesifik lokus gen yang diinginkan dan tidak mengganggu lokus lainnya. Jika *off-target* terjadi, susunan kode genetiknya akan berubah dan mengakibatkan mutasi onkogenik (Mahendra, 2021). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sistem ini seringkali tidak mampu mengatasi semua gen resistensi, terutama jika ada gen tambahan yang tidak ditargetkan. Hal ini membuat terapi menjadi kurang efektif, terutama pada strain klinis yang memiliki lebih dari satu gen resistensi karena banyak bakteri patogen yang membawa plasmid dengan jumlah salinan tinggi susah untuk dihapus (Tagliaferri et al., 2020).

Penelitian tersebut sejalan dengan hasil penelitian Wang *et al* (2023), yang menyatakan bahwa sistem tersebut memiliki keterbatasan dalam menargetkan gen spesifik pada bakteri multiresisten sehingga membutuhkan desain kompleks meskipun tidak selalu berhasil. Identifikasi dan validasi target gen resistensi yang tepat juga sering kali sulit dilakukan, meskipun sangat penting untuk keberhasilan terapi (Li et al., 2022). Kesalahan CRISPR-Cas dalam penargetan gen yang spesifik, mengakibatkan munculnya mutasi pada plasmid AMR dan adaptasi bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri memiliki kemampuan dalam menghindari efek terapi melalui mutasi gen. Kemampuan bakteri dalam mengembangkan mutasi pada gen target CRISPR-Cas menyebabkan terapi menjadi tidak efektif. Selain itu, mutasi pada plasmid yang membawa gen resistensi juga dapat menghambat efektivitas CRISPRi karena bakteri menghindari sistem tersebut. Hal ini menegaskan bahwa perlunya pemahaman mendalam terkait genom bakteri dan potensi gen resistensi yang belum ditargetkan dalam pengembangan terapi berbasis CRISPR. Selain itu, penyisipan *ls* pada gen *Cse2* menyebabkan pengurangan ekspresi protein *Cse2* hingga lima kali lipat, menyebabkan patogen seperti *Shigella* untuk memperoleh gen resistensi melalui transfer gen horizontal, menyoroti kerentanan sistem CRISPR-Cas terhadap perubahan genetik yang terjadi pada bakteri (Chen et al., 2019; Junaid et al., 2023; Kippnich et al., 2024; Uribe et al., 2021).

Sistem CRISPR-Cas telah menarik perhatian besar dalam penelitian medis, terutama sebagai solusi potensial untuk mengatasi tantangan yang disebabkan oleh bakteri yang resisten terhadap antibiotik (AMR). Resistensi antimikroba merupakan masalah global yang disebabkan oleh penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak tepat sehingga mengeliminasi bakteri patogen dan flora normal dalam tubuh (Soetedjo et al., 2021). Selain itu dapat menyebabkan infeksi yang awalnya dapat diterapi menjadi sukar dikendalikan dengan obat antibiotik standar. Oleh sebab itu, pendekatan baru seperti CRISPR-Cas dipandang sebagai salah satu alternatif yang menjanjikan untuk terapi antibakteri konvensional.

Beberapa penelitian menyatakan bahwa CRISPR -Cas berpotensi sebagai terapi antimikroba. Sistem CRISPR-Cas9 dapat digunakan sebagai terapi adjuvan karena memperkuat efektivitas antibiotik dengan menyerang bakteri resisten secara langsung melalui pengeditan genom. Selain itu kombinasi dengan *reTa* (*regulated toxin-antitoxin*) membuat sistem ini efektif dalam membunuh patogen *multi-drug resistant* (MDR) dan penggunaannya lebih aman jika digunakan dalam jangka panjang (Tao et al., 2023; Wang et al., 2023). Selain itu, CRISPR juga dapat berbasis bakteriofag yang memiliki potensi sebagai antimikroba yang presisi, terutama dalam mengatasi infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen seperti *Clostridioides difficile* (*C. difficile*). Sistem ini bekerja dengan mengarahkan kompleks CRISPR-Cas untuk menargetkan dan memotong DNA spesifik, menyebabkan kerusakan fatal pada bakteri target. Dalam studi yang dilakukan, penggunaan fag yang dimodifikasi dengan CRISPR-Cas3 menunjukkan hasil yang menjanjikan. CRISPR-Cas3 memanfaatkan mekanisme pemotongan DNA yang melibatkan degradasi eksonukleolitik, sehingga memberikan efek membunuh yang kuat dan tidak tergantung pada jenis bakteri atau sekuens spesifik tertentu. Selain itu, sistem ini juga memiliki keunggulan yaitu kemampuannya yang

spesifik dalam menargetkan bakteri patogen tanpa merusak mikrobiota non-patogen. Dalam kasus *C. difficile*, yang merupakan penyebab utama infeksi nosokomial dengan tingkat kambuhan yang tinggi, terapi berbasis CRISPR menunjukkan keunggulan dibandingkan antibiotik konvensional. Antibiotik cenderung mengganggu keseimbangan mikrobiota usus, yang justru meningkatkan risiko kekambuhan infeksi. Sebaliknya, fag dengan CRISPR-Cas dapat diarahkan secara spesifik untuk membunuh *C. difficile*, sekaligus meminimalkan dampak terhadap mikrobiota lainnya (Selle et al., 2020).

KESIMPULAN

Menunjukkan bahwa teknologi CRISPR-Cas memiliki efektivitas yang tinggi dalam mengurangi resistensi antibiotik pada berbagai bakteri patogen. Beberapa metode yang digunakan, seperti pemotongan DNA dan represi gen, telah terbukti efektif dalam menargetkan gen resistensi dan meningkatkan sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Namun, tantangan seperti efek *off-target* dan resistensi bakteri terhadap CRISPR-Cas perlu diperhatikan dalam pengembangan lebih lanjut. Meskipun demikian, CRISPR-Cas menunjukkan potensi besar sebagai terapi antimikroba baru yang dapat diintegrasikan dengan terapi antibiotik konvensional untuk mengatasi krisis resistensi antibiotik secara global.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pembimbing yang telah membimbing kami dan terimakasih kepada seluruh tim atas kerjasama yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, S., Liu, H., Liang, W., Hong, L., Zhang, B., Huang, L., Guo, X., & Duan, G. (2019). Insertion sequences in the CRISPR-Cas system regulate horizontal antimicrobial resistance gene transfer in *Shigella* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(2), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.020>
- Evans, B. A., Pickerill, E. S., Vyas, V. K., & Bernstein, D. A. (2018). Crispr-mediated genome editing of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(141). <https://doi.org/10.3791/58764>
- Fidia, F., Aisyah, S., Halim, M., & Hasanah, D. U. (2024). *Analisa Pengetahuan Pengunjung Tentang Antibiotik Oral Tanpa Resep Dokter di Apotek X Jakarta Timur Fachdiana*. 3(2), 147–160.
- Herawati, D., Nazwa Azzahra, D., Dian Farhah, H., Catleya Hadi, J., Theresia Sagala, J., Catharina Rosadi, N., Ishabela Romaulytua Rajagukguk, V., Putri Ramadhani, Z., Sopia, P., & Ridwan, H. (2023). Efek Samping Penggunaan Antibiotik Irasional Pada Gangguan Pernafasan Infeksi Saluran Pernafasan Akut. *Jurnal Ilmiah Keperawatan*, 9(2), 464–471.
- Junaid, M., Thirapanmethee, K., Khuntayaporn, P., & Chomnawang, M. T. (2023). CRISPR-Based Gene Editing in *Acinetobacter baumannii* to Combat Antimicrobial Resistance. *Pharmaceuticals*, 16(7), 1–32. <https://doi.org/10.3390/ph16070920>
- Kang, Y. K., Kwon, K., Ryu, J. S., Lee, H. N., Park, C., & Chung, H. J. (2017). Nonviral Genome Editing Based on a Polymer-Derivatized CRISPR Nanocomplex for Targeting Bacterial Pathogens and Antibiotic Resistance. *Bioconjugate Chemistry*, 28(4), 957–967. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00676>
- Kippnich, J., Benz, F., Uecker, H., & Baumdicker, F. (2024). *Effectiveness of CRISPR-Cas in Sensitizing Bacterial Populations with Plasmid-Encoded Antimicrobial Resistance*. 1–14.

- Li, Q., Zhao, P., Li, L., Zhao, H., Shi, L., & Tian, P. (2020). *Engineering a CRISPR Interference System To Repress a Class I Integron in Escherichia coli*. 64(3), 1–15.
- Li, X., Bao, N., Yan, Z., Yuan, X.-Z., Wang, S.-G., & Xia, P.-F. (2022). Tailoring CRISPR-Cas Immunity for the Degradation of Antibiotic Resistance Genes. *BioRxiv*, 2022.03.09.483686. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.03.09.483686v1>
- Mahendra, C. (2021). Terapi CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): Pengenalan untuk Penggunaan Klinis. *Cermin Dunia Kedokteran*, 48(11), 369. <https://doi.org/10.55175/cdk.v48i11.1560>
- Marsudi, A. (2022). Tingkat Pengetahuan Dan Perilaku Masyarakat Terhadap Penggunaan Antibiotik Di Beberapa Apotek Di Kota Ternate. *Jurnal Farmasi Medica/Pharmacy Medical Journal (PMJ)*, 4(2), 54. <https://doi.org/10.35799/pmj.v4i2.34766>
- Mayorga-Ramos, A., Zúñiga-Miranda, J., Carrera-Pacheco, S. E., Barba-Ostria, C., & Guamán, L. P. (2023). CRISPR-Cas-Based Antimicrobials: Design, Challenges, and Bacterial Mechanisms of Resistance. *ACS Infectious Diseases*, 9(7), 1283–1302. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00649>
- Mengstie, M. A., & Wondimu, B. Z. (2021). Biologics: Targets and Therapy Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics: Targets and Therapy*, 15, 353–361.
- Meriyani, H., Sanjaya, D. A., Sutariani, N. W., Juanita, R. A., & Siada, N. B. (2021). Antibiotic Use and Resistance at Intensive Care Unit of a Regional Public Hospital in Bali: A 3-Year Ecological Study. *Indonesian Journal of Clinical Pharmacy*, 10(3), 180–189. <https://doi.org/10.15416/ijcp.2021.10.3.180>
- Naghavi, M., Emil Vollset, S., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Robles Aguilar, G., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., ... Resistance Collaborators, A. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 1–28. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)
- Neo, D. M., Clatworthy, A. E., Hung, D. T., Neo, D. M., Clatworthy, A. E., & Hung, D. T. (2024). A dual-plasmid CRISPR/Cas9-based method for rapid and efficient genetic disruption in *Mycobacterium abscessus* Donovan. 206(3), 1–16.
- Price, V. J., McBride, S. W., Duerkop, B. A., & Palmer, K. L. (2018). CRISPR-Cas blocks antibiotic resistance plasmid transfer between *Enterococcus faecalis* strains in the gastrointestinal tract. *Клиническая Микробиология \Ldots*, 28(2), 14–17. <https://elibrary.ru/item.asp?id=35619135>
- Putri, C. I., Wardhana, M. F., Andrifanie, F., & Iqbal, M. (2023). Kejadian Resistensi Pada Penggunaan Antibiotik. *Medula*, 13(3), 219–225.
- Selle, K., Fletcher, J. R., Tuson, H., Schmitt, D. S., Mcmillan, L., Vridhambal, G. S., Rivera, A. J., Montgomery, S. A., Fortier, L., Barrangou, R., Theriot, C. M., & Ousterout, D. G. (2020). In Vivo Targeting of *Clostridioides difficile* Using Phage-Delivered CRISPR-Cas3 Antimicrobials. *American Society For Microbiology*, 11(2), 1–12.
- Sheng, H., Wu, S., Xue, Y., Zhao, W., Caplan, A. B., Hovde, C. J., & Minnich, S. A. (2023). Engineering conjugative CRISPR-Cas9 systems for the targeted control of enteric pathogens and antibiotic resistance. *PLoS ONE*, 18(9 September), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0291520>
- Soetedjo, R., Alexander, L., & Tobian, N. (2021). Penggunaan Crispr-Cas System Sebagai Solusi Menghadapi Resistensi Antimikroba Pada Bakteri. *Essential: Essence of Scientific Medical Journal*, 18(2), 33. <https://doi.org/10.24843/estl.2020.v18.i02.p05>
- Soliman, M., Said, H. S., El-Mowafy, M., & Barwa, R. (2022). Novel PCR detection of CRISPR/Cas systems in *Pseudomonas aeruginosa* and its correlation with antibiotic

- resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(21), 7223–7234. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12144-1>
- Tao, S., Chen, H., Li, N., Fang, Y., Zhang, H., Xu, Y., Chen, L., & Liang, W. (2023). Elimination of bla KPC-2-mediated carbapenem resistance in *Escherichia coli* by CRISPR-Cas9 system. *BMC Microbiology*, 23(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03058-7>
- Tao, S., Chen, H., Li, N., & Liang, W. (2022). The Application of the CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance. *Infection and Drug Resistance, Volume 15*(June), 4155–4168. <https://doi.org/10.2147/idr.s370869>
- Tao, S., Hu, C., Fang, Y., Zhang, H., Xu, Y., Zheng, L., Chen, L., & Liang, W. (2023). Targeted elimination of Vancomycin resistance gene vanA by CRISPR-Cas9 system. *BMC Microbiology*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03136-w>
- Uribe, R. V., Rathmer, C., Jahn, L. J., Ellabaan, M. M. H., Li, S. S., & Sommer, M. O. A. (2021). Bacterial resistance to CRISPR-Cas antimicrobials. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96735-4>
- Wang, R., Shu, X., Zhao, H., Xue, Q., Liu, C., Wu, A., Cheng, F., Wang, L., Zhang, Y., Feng, J., Wu, N., & Li, M. (2023). Associate toxin-antitoxin with CRISPR-Cas to kill multidrug-resistant pathogens. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37789-y>
- Wu, X., Zha, J., Koffas, M. A. G., & Dordick, J. S. (2019). Reducing *Staphylococcus aureus* resistance to lysostaphin using CRISPR-dCas9. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(12), 3149–3159. <https://doi.org/10.1002/bit.27143>
- Wulandari, S., Komala Sari, D., Handayani, D., Pertiwi, R., Rahmawati, R., & Yona Harianti Putri. (2023). Pencegahan Resistensi Melalui Sosialisasi Bijak Menggunakan Antibiotik Pada Masyarakat Di Kawasan Wisata Pantai Panjang. *Journal of Community Empowerment*, 1(1), 1–5. <https://doi.org/10.33369/jacom.v1i1.26780>
- Xu, Y., & Li, Z. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2401–2415. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>
- Xu, Z., Li, M., Li, Y., Cao, H., Miao, L., Xu, Z., Higuchi, Y., Yamasaki, S., Nishino, K., Woo, P. C. Y., Xiang, H., & Yan, A. (2019). Native CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing Enables Dissecting and Sensitizing Clinical Multidrug-Resistant *P. aeruginosa*. *Cell Reports*, 29(6), 1707–1717.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.006>
- Yao, S., Wei, D., Tang, N., Song, Y., Wang, C., Feng, J., & Zhang, G. (2022). Efficient Suppression of Natural Plasmid-Borne Gene Expression in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Using a Compact CRISPR Interference System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(11), 1–9. <https://doi.org/10.1128/aac.00890-22>