

**KARAKTERISTIK GENOM VIRUS SARS-COV-2
MELALUI ANALISA *NEXT GENERATION SEQUENCING*
PADA PASIEN TERKONFIRMASI COVID-19
PERIODE JANUARI-MARET 2021 DI RUMAH SAKIT
PENDIDIKAN UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR**

**CHARACTERISTICS OF THE SARS-COV-2 VIRUS GENOME
THROUGH NEXT GENERATION SEQUENCE ANALYSIS
IN CONFIRMED PATIENTS OF COVID-19
PERIOD JANUARY-MARCH 2021 IN EDUCATION HOSPITAL
HASANUDDIN UNIVERSITY MAKASSAR**

**ANDI NILAWATI
C195181002**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
MIKROBIOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**KARAKTERISTIK GENOM VIRUS SARS-COV-2
MELALUI ANALISA *NEXT GENERATION SEQUENCING*
PADA PASIEN TERKONFIRMASI COVID-19
PERIODE JANUARI-MARET 2021
DI RUMAH SAKIT PENDIDIKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Spesialis

Program Studi
Mikrobiologi Klinik

Disusun dan diajukan oleh

ANDI NILAWATI

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
MIKROBIOLOGI KLINIK FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**KARAKTERISTIK GENOM VIRUS SARS-COV-2
MELALUI ANALISA NEXT GENERATION SEQUENCING
PADA PASIEN TERKONFIRMASI COVID-19
PERIODE JANUARI-MARET 2021 DI RUMAH SAKIT PENDIDIKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR**

Disusun dan diajukan oleh

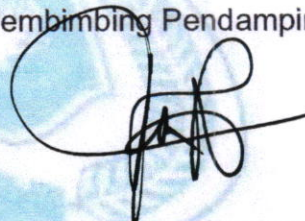
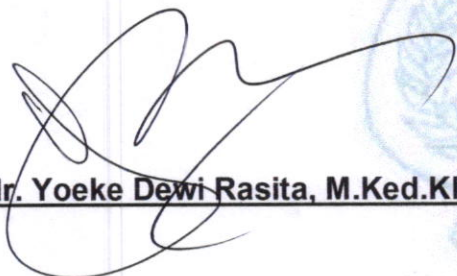
Andi Nilawati
C195181002

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis-1 Ilmu Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 28 Januari 2022 Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

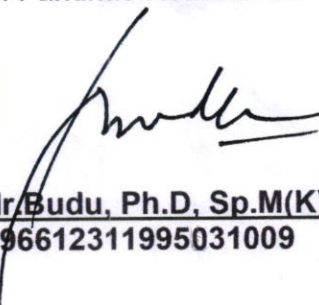
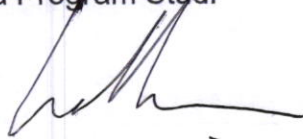


dr. Yoeke Dewi Rasita, M.Ked.Klin., Sp.MK

Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D., Sp.MK
NIP.196709101996031001

Ketua Program Studi

Dekan Fakultas Kedokteran



Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
NIP. 195704161985031001

Prof.dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
NIP. 196612311995031009

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Andi Nilawati
Nomor Pokok : C195181002
Program Studi : Mikrobiologi Klinik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 20 Januari 2022

Yang menyatakan,



Andi Nilawati

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah, SWT., karena berkat karunia, kasih sayang dan hidayah-Nya, tesis yang berjudul “Karakteristik Genom Virus Sars-Cov-2 Melalui Analisa *Next Generation Sequencing* Pada Pasien Terkonfirmasi Covid-19 Periode Januari-Maret 2021 Di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar”, dapat diselesaikan.

Tesis ini tidak mungkin dapat selesai dengan baik tanpa bimbingan dan bantuan dari banyak pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih setinggi-tingginya kepada:

1. dr. Yoeke Dewi Rasita, M. Ked.Klin., Sp.M.K. sebagai pembimbing utama yang telah memberi bimbingan, arahan, dan masukan yang sangat berharga kepada penulis dalam menyusun tesis ini.
2. Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, PhD, Sp.MK. sebagai pembimbing pendamping yang juga telah membimbing, memberi saran dan arahan yang sangat berarti dalam penyusunan tesis ini.
3. Prof. dr.Mochammad Hatta, Ph. D., Sp.M.K.(K). sebagai anggota penilai yang juga telah memberikan arahan dan saran, yang sangat bernilai dalam bidang mikrobiologi klinik, di sela-sela kepadatan waktunya.
4. dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., Ph. D., Sp.M.K sebagai anggota penilai yang juga telah memberikan arahan dan saran, yang sangat bernilai dalam bidang mikrobiologi klinik, di sela-sela kepadatan waktunya.

5. Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM. sebagai anggota penilai yang juga telah memberikan arahan dan saran, yang sangat bernilai dalam bidang metode penelitian dan statistik, di sela-sela kepadatan waktunya.

6. Dr. dr. Irawaty Djaharuddin, Sp.P(K) sebagai anggota penilai yang juga telah memberikan arahan dan saran, yang sangat bernilai dalam bidang ilmu penyakit paru, di sela-sela kepadatan waktunya.

Tak lupa, penulis menghaturkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Bapak dan Ibu penulis yaitu Drs. Andi Mahmuddin, M.Sc (Alm) dan Andi Darmawati Daud. Ucapan terima kasih pula untuk suami dan anak tercinta yaitu Syamsuar Manyullei, Arkana Syaikhhan Syamsuar, Arrazi Virendra Syamsuar yang telah memberi dorongan dan semangat kepada penulis dalam penyusunan tesis ini. Tak kalah penting, ucapan terima kasih penulis sampaikan dan apresiasi sebesar-besarnya kepada semua pihak yang namanya tidak tercantum tetapi telah banyak membantu, memberi semangat, dan mendorong penulis menyelesaikan tesis ini. Akhir kata, penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kata sempurna, sehingga dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak.

Makassar, 20 Januari 2022

Andi Nilawati

ABSTRAK

ANDI NILAWATI. Karakteristik Genom Virus Sars-Cov-2 Melalui Analisa *Next Generation Sequencing* Pada Pasien Terkonfirmasi Covid-19 Periode Januari-Maret 2021 Di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar (Dibimbing oleh **Yoeke Dewi Rasita** dan **Muh.Nasrum Massi**).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya mutasi asam amino D614G, E484K, N501Y virus SARS-CoV-2, yang berkontribusi dapat menyusun *Variant of Concern*, dengan membandingkan D614 sebagai *wildtype* virus SARS-CoV-2. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RS Pendidikan Universitas Hasanuddin selama periode Januari-Maret 2021.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan mengambil sampel terdeteksi RNA virus SARS-CoV-2 yang memiliki nilai *cycle threshold* (CT) kurang dari 30 untuk mendapatkan nilai RNA Integrity (RIN) agar dapat dilanjutkan proses *Next Generation Sequencing*. Hasil sekuensing akan terlihat urutan genom sepanjang 30ribu basa nukleotida virus SARS-CoV-2, dan dapat terlihat jelas ada tidaknya mutasi asam amino D614G, E484K, dan N501Y

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini adalah semua 41 total sampel sudah tidak memiliki *wildtype* D614 dan telah bermutasi menjadi mutasi D614G (100%), namun tidak ada mutasi E484K dan N501Y. Pada sampel yang memiliki mutasi D614G tidak didapatkan hubungan antara komorbid dan jenis kelamin, antara severitas dan jenis kelamin. Pada hubungan antara severitas dan komorbid didapatkan **hubungan antara status komorbid dengan severitas COVID-19 (OR^a 0,033 95% CI (0,004-0,264), p=0,001)**. dengan menyesuaikan faktor jenis kelamin dan kelompok usia, maka pasien dengan komorbid memiliki risiko bergejala sedang dan berat sebesar 3,3 kali dibanding yang tidak memiliki komorbid. Pada penelitian ini tidak didapatkan pula adanya susunan mutasi *Varian of Concern* pada semua sampel.

Kata Kunci : D614G, E484K, N501Y, D614, *Next Generation Sequencing*

ABSTRACT

ANDI NILAWATI. Characteristics Of The Sars-Cov-2 Virus Genome Through Next Generation Sequencing Analysis In Confirmed Patients Of Covid-19 Period January-March 2021 In Education Hospital Hasanuddin University Makassar (Supervised by **Yoeke Dewi Rasita** and **Muh.Nasrum Massi**).

This study aims to determine whether or not mutations in the amino acid D614G, E484K, N501Y of the SARS-CoV-2 virus, which can contribute to constructing the Variant of Concern, by comparing D614 as a wildtype SARS-CoV-2 virus. The research was conducted at the Clinical Microbiology Laboratory of the Hasanuddin University Teaching Hospital during the period January-March 2021.

This research is a descriptive study by taking samples of detectable SARS-CoV-2 virus RNA which has a cycle threshold (CT) value of less than 30 to obtain RNA Integrity (RIN) values so that the Next Generation Sequencing process can be continued. The results of the sequencing will show the genomic sequence of 30 thousand nucleotide bases of the SARS-CoV-2 virus, and it can be clearly seen whether there are mutations in the amino acids D614G, E484K, and N501Y.

This study result found that all 41 total samples did not have the wildtype D614 and had mutated into the D614G mutation (100%), but there were no E484K and N501Y mutations. In samples that had the D614G mutation, there was no association between comorbidities and gender, between severity and gender. In the relationship between severity and comorbidity, there was a relationship between comorbid status and the severity of COVID-19 (OR^a 0,033 95% CI (0,004-0,264), p=0,001). By adjusting for gender and age group, patients with comorbidities had a risk of moderate and severe symptoms of 3.3 times compared to those without comorbidities. In this study, there was also no Varian of Concern mutation arrangement.

Key Words : D614G, E484K, N501Y, D614, *Next Generation Sequencing*

DAFTAR ISI

JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iv
PRAKATA.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
Bab I Pendahuluan	
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	5
C. Pertanyaan Penelitian	5
D. Tujuan Penelitian	7
E. Manfaat Penelitian	8
Bab II Tinjauan Pustaka	
A. Covid-19	10
1. Definisi Covid-19	10
2. Epidemiologi Covid-19	10
3. Diagnosis Covid-19	12
4. Gejala Klinis Covid-19	13
5. Faktor Risiko Terpapar Covid-19	14

B. Virus SARS-CoV-2	18
1. Struktur Virus SARS-CoV-2.....	20
2. Karakteristik Genom Virus SARS-CoV-2	23
3. Struktur Protein <i>Spike</i>	23
4. Patogenesis Infeksi Virus SARS-CoV-2	25
5. Pohon Filogenetik Virus SARS-CoV-2	28
6. Mutasi Virus SARS-CoV-2	31
7. Varian Virus SARS-CoV-2	39
C. Diagnosis Molekuler Covid-19.....	42
1. Pengambilan Sampel Virus SARS-CoV-2	42
2. Isolasi RNA	45
3. <i>Real Time PCR</i>	46
4. <i>Reverse Transcriptase Real Time PCR</i>	47
D. <i>Next Generation Sequencing</i>	49
1. <i>Next Generation Sequencing</i>	49
2. Kriteria Sampel untuk Dilakukan <i>Next Generation</i> <i>Sequencing</i>	51
E. Kerangka Teori	52
F. Definisi Operasional	53
 Bab III. Metode Penelitian	
A. Metode Penelitian	55
B. Lokasi dan Waktu Penelitian	55
C. Populasi dan Subjek Penelitian	56

D. Kriteria Subjek Penelitian	57
E. Teknik Pengambilan Sampel.....	58
F. Variabel Penelitian	58
G. Alur Penelitian	59
H. Kerangka Konsep.....	60
I. Izin Penelitian	61
J. Alat dan Bahan	61
K. Prosedur Penelitian	61
L. Teknik Pengolahan dan Analisis Data	72
Bab IV Hasil	73
Bab V Pembahasan	90
Bab VI Kesimpulan dan Saran.....	111
Daftar Pustaka.....	113
Lampiran	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Pembagian Gejala Klinis Covid-19	13

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Situasi Dunia Terkini Pandemi Covid-19	10
Gambar 2. Peta Sebaran Transmisi Lokal Indonesia	11
Gambar 3. Sebaran Covid-19 di Makassar	12
Gambar 4. Struktur Virus SARS-CoV-2	20
Gambar 5. Struktur Genom Virus SARS-CoV-2	21
Gambar 6. Struktur Protein <i>Spike</i>	24
Gambar 7. Siklus Virus	25
Gambar 8. Analisis Filogenetik	29
Gambar 9. Letak Mutasi Asam Amino D614G	34
Gambar 10. Perubahan karakteristik virus SARS-CoV-2 D614G	35
Gambar 11. Letak Mutasi Asam Amino N501Y dan E484K	36
Gambar 12. Mutasi N501Y di RBM	38
Gambar 13. Letak Mutasi E484K dan N501Y yang tidak berjauhan	38
Gambar 14. Target Gen SARS-CoV-2 pada Real Time PCR	47
Gambar 15. Pohon Filogenetik Sampel Penelitian Ini	88
Gambar 16. Jalur Filogenetik Sampel Penelitian pada Clade 20A	89
Gambar 17. D614 dan D614G di Amerika Serikat	92
Gambar 18. Daerah Asia Masih didominasi Varian Alpha Beta	95
Gambar 18. Letak E484 bermutasi ke A, Q, K di RBM	97

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Novel Human Coronavirus yang saat ini dinamakan sebagai *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)*, pertama kali muncul di Wuhan Cina, pada akhir 2019 (Docea *et al.*, 2020). Pada 30 Januari 2020, Direktur Jenderal *Public Health Emergency of International Concern (PHEIC)* menyatakan bahwa wabah *Coronavirus Disease 2019 (Covid-19)* disebabkan oleh virus SARS-CoV-2, lalu pada 11 Maret 2020 diumumkan sebagai pandemi (WHO, 2021a).

Virus SARS-CoV-2 suatu coronavirus yang lebih berdampak dibanding pendahulunya yaitu SARS-CoV dan MERS-CoV (Alsuliman *et al.*, 2020). Coronavirus memiliki *spike* yang tampak seperti *corona* (serupa mahkota dalam Bahasa latin) (Alsuliman *et al.*, 2020). *Spike* inilah yang memiliki peran utama dalam masuknya virus dan menginfeksi manusia (Zhou Wang *et al.*, 2020).

Hingga tanggal 26 Oktober 2021, menurut WHO di seluruh dunia kasus terkonfirmasi Covid-19 telah mencapai 243.857.028 pasien, dengan 4.953.246 kasus kematian. Ini telah menyebar ke 304 negara dengan *case fatality rate (CFR)* sebesar 2,03 % (WHO, 2021). Di Indonesia,

pengumuman secara resmi akan awal masuknya kasus Covid-19 dilakukan pada tanggal 2 Maret 2020, dengan kasus Covid-19 terkonfirmasi pertama terjadi pada dua wanita warga negara Indonesia yang positif setelah kontak erat dengan warga negara Jepang yang datang ke Indonesia (Nursofwa *et al.*, 2020).

Seperti pada beberapa penyakit pernapasan yang disebabkan oleh virus, diagnosa klinis ditegakkan atas dua hal yaitu manifestasi klinis seperti demam, kelelahan, batuk kering, sesak napas dan gejala gastrointestinal, dengan pemeriksaan penunjang *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan *Computed Tomography* (Alsuliman *et al.*, 2020). Hingga saat ini metode baku emas penegakan diagnosa adalah dengan pemeriksaan PCR (Sánchez-oro *et al.*, 2020).

Beberapa faktor risiko seseorang dapat tertular Covid-19 diantaranya usia tua lebih mudah terkena daripada usia muda, laki-laki lebih gampang terpapar daripada wanita (F. Zhou, 2020). Sementara anak-anak masih kontroversi, dimana beberapa data menunjukkan persentase lebih rendah pada anak usia kurang 10 tahun (Liu *et al.*, 2020). Berdasarkan pekerjaan maka tenaga kesehatan lebih gampang tertular Covid-19 dibanding jenis pekerjaan lain (Barrett *et al.*, 2020). Faktor berupa kontak erat dengan pasien yang sudah terkonfirmasi Covid-19, merupakan faktor risiko lain keterpaparan seseorang terhadap virus SARS-CoV-2 (Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 2020).

Laporan kasus terkonfirmasi Covid-19 masih terus ada, seiring dengan sifat alami virus untuk dapat bertahan hidup dalam inang manusia. Salah satu cara alami virus bertahan hidup adalah dengan melakukan mutasi yang menyebabkan munculnya varian baru dari virus SARS-CoV-2. Varian yang menjadi perhatian adalah varian-varian yang masuk dalam pengelompokan *Variant of Concern* oleh WHO, disebabkan oleh sifat transmisi virusnya, kemampuan virus meningkatkan daya invasi pada inangnya, kemampuan virus menghindari dari perlawanan antibodi alami inang setelah terinfeksi virus SARS-CoV-2 maupun setelah divaksinasi, serta kemampuan virus menurunkan efektivitas terapi (WHO, 2020f).

Varian *Wildtype Wuhan* dengan *lineage* D614 merupakan varian pertama yang ditemukan pada komunitas awal mula Covid-19 di akhir tahun 2019 (S.-Y. Huang *et al.*, 2021). D614 telah mengalami mutasi pada regio *spike protein* menjadi D614G, yang ditemukan sejak awal April 2020 (Korber *et al.*, 2020). Mutasi asam amino virus SARS-CoV-2 yang lain yang menjadi perhatian besar adalah adanya mutasi *spike protein receptor binding domain* N501Y dan E484K. Mutasi N501Y terdapat pada 3 *Variant of Concern*, sedangkan E484K terdapat pada 2 *Variant of Concern* (Health Ontario, 2021).

Mutasi D614G menyebabkan menurunnya S1 *shedding* pada *spike protein* sehingga meningkatkan kemampuan menginfeksi sel inang, terutama pada ACE2 *reseptor dependent* (Zhang *et al.*, 2020; Ogawa *et al.*, 2020). Mutasi N501Y meningkatkan transmisibilitas, meningkatkan

severitas penyakit, menurunkan antibodi alami setelah terinfeksi Covid-19 (Burki, 2021). Mutasi E484K mempengaruhi penurunan netralisasi virus oleh antibodi yang diperoleh secara alami setelah terinfeksi maupun karena vaksinasi (Gaebler, 2021; Greaney *et al.*, 2021).

Untuk mendeteksi adanya mutasi pada virus SARS-CoV-2 diperlukan pemeriksaan deteksi urutan genomik protein virus. Mutasi dapat dilihat dengan sekuensing/pengurutan basa nukleotida dari molekul DNA virus, dan metode *Next Generation Sequencing* merupakan salah satu metode lanjutan dari PCR untuk melihat sekuensing genomik dari virus SARS-CoV-2 (Cruz *et al.*, 2020; Shendure *et.al.*, 2008).

Pemerintah Indonesia melalui satgas covid RI terus menggiatkan sekuensing genom virus SARS-CoV-2 untuk dapat mengetahui distribusi secara tepat dan dapat menjadi dasar kebijakan pengendalian yang spesifik sesuai risiko per daerah (Satgas Covid, 2021). Studi karakteristik genom untuk melihat ada tidaknya varian baru serta letak mutasi genetik virus SARS-CoV-2 ini penting untuk menjadi masukan bagi *stake holder* dalam manajemen wabah, pengembangan alat diagnostik, pengembangan terapi antivirus, serta pemilihan vaksin maupun pengembangan vaksin untuk pencapaian *herd immunity*.

Berlandaskan latar belakang di atas maka penulis merasa tertarik untuk melakukan penelitian “Karakteristik genom virus SARS-CoV-2 melalui analisa *Next Generation Sequencing* pada pasien terkonfirmasi

Covid-19 Periode Januari-Maret 2021 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar”.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang ada bahwa virus SARS-CoV-2 merupakan mikroorganisme penyebab Covid-19, dan merupakan masalah pandemi saat ini, termasuk di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin, yang dapat disebabkan beberapa faktor risiko, serta beberapa mutasi gen asam amino pada *spike protein* yang cenderung terjadi dan dapat mempengaruhi keputusan kebijakan dalam penanganan wabah, maka dapat diperoleh rumusan masalah dalam bentuk pertanyaan sebagai berikut: Bagaimana karakteristik genom virus SARS-CoV-2 Laboratorium Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin yang terdeteksi RNA SARS-CoV-2?

C. Pertanyaan Penelitian

1. Bagaimana distribusi asam amino D614 pada sampel pasien terkonfirmasi Covid-19 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin?

2. Bagaimana distribusi asam amino D614G pada sampel pasien terkonfirmasi Covid-19 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin?
3. Bagaimana distribusi asam amino N501Y pada sampel pasien terkonfirmasi Covid-19 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin?
4. Bagaimana distribusi asam amino E484K pada sampel pasien terkonfirmasi Covid-19 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin?
5. Karakteristik pasien manakah yang memiliki varian berbeda dengan tipe *wildtype* Wuhan?
6. Apakah *Variant of Concern* terdapat pada sampel pasien terkonfirmasi Covid-19 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin?
7. Apakah ada hubungan bermakna antara komorbid dengan jenis kelamin, dan severitas dengan jenis kelamin pada pasien yang terdeteksi virus SARS-CoV-2 yang memiliki mutasi?
8. Apakah ada hubungan antara severitas dengan komorbid pada pasien yang terdeteksi virus SARS-CoV-2 yang memiliki mutasi?
9. Bagaimana pohon filogenetik dari sampel yang memiliki mutasi?

D. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Untuk mengidentifikasi adanya asam amino tipe awal *wildtype*, ada tidaknya mutasi D614G, N501Y, dan E484K pada sampel pasien Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin yang terdeteksi RNA virus SARS-CoV-2 selama periode Januari-Maret 2021, dengan analisa *Next Generation Sequencing*.

2. Tujuan Khusus

- a. Diketuainya distribusi asam amino D614 pada sampel pasien terkonfirmasi Covid-19 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.
- b. Diketuainya distribusi asam amino D614G pada sampel pasien terkonfirmasi Covid-19 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.
- c. Diketuainya distribusi asam amino N501Y pada sampel pasien terkonfirmasi Covid-19 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.
- d. Diketuainya distribusi asam amino E484K pada sampel pasien terkonfirmasi Covid-19 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.

- e. Diketuainya karakteristik pasien mana yang memiliki varian berbeda dengan tipe wildtype Wuhan.
- f. Diketuainya *Variant of Concern* apa yang terdapat pada sampel pasien terkonfirmasi Covid-19 di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.
- g. Diketahui ada tidaknya hubungan bermakna antara komorbid dengan jenis kelamin, dan severitas dengan jenis kelamin pada pasien yang terdeteksi virus SARS-CoV-2 yang memiliki mutasi.
- h. Diketuainya hubungan antara severitas dengan komorbid pada pasien yang terdeteksi virus SARS-CoV-2 yang memiliki mutasi.
- i. Diketuainya pohon filogenetik dari sampel yang memiliki mutasi.

E. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

a. Untuk peneliti

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan, dan informasi untuk peneliti, klinisi, ilmuan lain, serta sivitas akademika mengenai varian genom COVID-19.

b. Untuk Penelitian Selanjutnya

Hasil penelitian dapat dijadikan referensi penelitian selanjutnya apabila meneliti topik yang sama.

2. Manfaat Aplikatif

- a. Menambah pengetahuan peneliti dalam identifikasi virus SARS-CoV-2 dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* dan mengetahui *Analisa Next Generation Sequencing*.
- b. Memberi tambahan informasi kepada klinisi tentang dampak mutasi genom virus SARS-CoV-2, sehingga dapat memberi masukan dalam tindakan preventif maupun kuratif dalam penanganan pasien terkonfirmasi Covid-19
- c. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan masukan serta mendukung visi misi Pemerintahan Indonesia dalam pencegahan penyebaran virus SARS-CoV-2 dalam pengembangan kandidat vaksin berdasarkan pengetahuan tentang titik mutasi pada protein *spike* virus SARS-CoV-2 di Makassar

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Covid-19

1. Definisi Covid-19

Covid-19 adalah singkatan dari *Coronavirus Disease-19*, merupakan suatu penyakit yang dideklarasikan oleh WHO pada tanggal 11 Maret 2020 sebagai penyakit pandemik yang disebabkan oleh virus SARS-CoV-2. Penamaan virus ini ditetapkan oleh *The International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), dimana nama virus ini sebelumnya adalah 2019-nCoV (Jin *et al.*, 2020).

2. Epidemiologi Covid-19

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) atau sering disebut juga sebagai *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) pertama kali dideklarasikan sebagai pandemi global pada 11 Maret 2020, dimana sebelumnya WHO menetapkan COVID-19 sebagai “*global health emergency*” pada 30 Januari 2020 (WHO, 2020b).



Gambar 1. Situasi Dunia Terkini Pandemi Covid-19
(Sumber : WHO, 2021b)

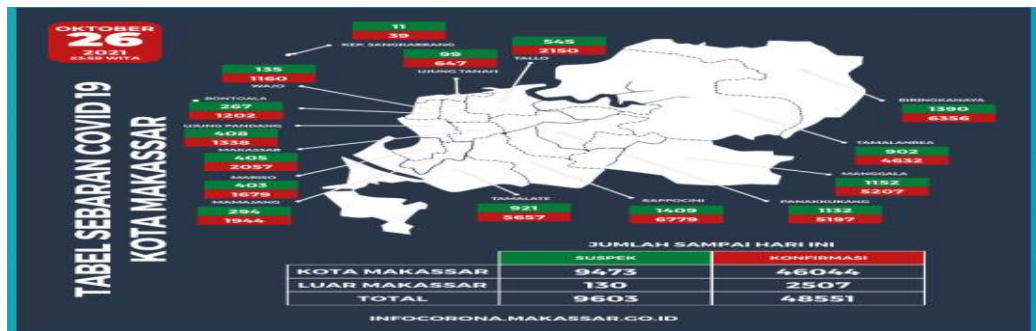
Hingga tanggal 26 Oktober 2021, WHO mencatat bahwa 243.857.028 pasien terkonfirmasi Covid-19, dengan 4.953.246 kasus kematian (Gambar 1) (WHO, 2021d). Pertama kali COVID-19 masuk ke Indonesia dengan dua individu terbukti hasil positif COVID-19 melalui pernyataan pemerintah pada 2 Maret 2020 yang dilanjutkan dengan dikeluarkannya regulasi pemerintah Indonesia dalam meningkatkan cakupan *screening* dan pemeriksaan COVID-19, untuk meminimalisir transmisi COVID-19 (WHO, 2020d).



Gambar 2. Peta Sebaran Transmisi Lokal dan Wilayah Terkonfirmasi di Indonesia

(Sumber: Kemenkes, 2021)

Hingga kini COVID-19 telah menyebar dan memberi dampak pada ratusan kabupaten dan kota di Indonesia dengan terkumpulnya data spesimen yang diperiksa, kasus negatif, kasus konfirmasi, kasus meninggal, kasus sembuh dan kasus aktif. Situasi terkini pada tanggal 26 Oktober 2021, tercatat data 4.241.090 kasus terkonfirmasi, dengan 143.270 angka kematian dan kasus aktif 12.989. Kasus ini berdasarkan rekapitan dari seluruh provinsi di Indonesia (Kemenkes, 2021).



Gambar 3 Sebaran Covid-19 di Makassar

(Sumber : Pemkot Makassar, 2021)

Berdasarkan data dari Info Penanggulangan Covid-19 Makassar per tanggal 26 Oktober 2021, didapatkan data pasien terkonfirmasi Covid-19 sebanyak 46.044 kasus. Data tersebut diambil dari jumlah pasien terkonfirmasi di 15 kecamatan yang ada di Makassar (Pemkot Makassar, 2021).

3. Diagnosis Covid 19

Diagnosis Covid-19 ditegakkan dengan pemeriksaan RT-PCR hari pertama dan hari kedua. Jika pemeriksaan pada hari pertama sudah positif terdeteksi RNA virus SARS-CoV-2 maka tidak perlu dilanjutkan pemeriksaan hari kedua. Jika pada hari pertama pemeriksaannya tidak terdeteksi RNA virus SARS-CoV-2 maka perlu dilanjutkan pemeriksaan hari selanjutnya yaitu hari kedua (PDPI *et al.*, 2021). RT-PCR sebagai alat diagnostik pada penegakan diagnosis Covid-19 merupakan baku emas deteksi virus SARS CoV-2 (Sánchez-oro *et al.*, 2020).

4. Gejala Klinis Covid-19

Klasifikasi	Definisi
Tanpa gejala	Hasil uji SARS-CoV-2 positif tanpa ada tanda dan gejala klinis.
Ringan	Gejala infeksi saluran napas atas seperti demam, <i>fatigue</i> , mialgia, batuk, nyeri tenggorokan, pilek, dan bersin. Beberapa kasus mungkin tidak disertai demam, dan lainnya mengalami gejala saluran pencernaan seperti mual, muntah, nyeri perut, diare, atau gejala non-respiratori lainnya.
Sedang	Gejala dan tanda klinis pneumonia. Demam, batuk, takipnu*, dapat disertai ronki atau <i>wheezing</i> pada auskultasi paru tanpa distres napas dan hipoksemia. *Takipnu= Frekuensi napas <2 bulan: ≥ 60 x/menit, 2-11 bulan: ≥ 50 x/menit, 1-5 tahun: ≥ 40 x/menit, >5 tahun: ≥ 30 x/menit
Berat	<ul style="list-style-type: none"> Gejala dan tanda klinis pneumonia berat berupa napas cuping hidung, sianosis, retraksi subkostal, desaturasi (saturasi oksigen <95%). Adanya tanda dan gejala bahaya umum seperti kejang, penurunan kesadaran, muntah <i>profuse</i>, tidak dapat minum, dengan atau tanpa gejala respiratori.
Kritis	Pasien mengalami perburukan dengan cepat menjadi <i>acute respiratory distress syndrome</i> (ARDS) atau gagal napas atau terjadi syok, ensefalopati, kerusakan miokard atau gagal jantung, koagulopati, gangguan ginjal akut, dan disfungsi organ multipel atau manifestasi sepsis lainnya. Kriteria gagal napas dengan <i>pediatric acute respiratory distress syndrome</i> (PARDS) dapat dilihat pada gambar di bawah

Tabel 1. Pembagian Gejala Klinis Covid-19

(Sumber : PDPI *et.al.*, 2021)

Pembagian gejala klinis pada penderita yang terkonfirmasi positif Covid-19, berdasarkan berat tidaknya kasus maka dapat dibagi menjadi tanpa gejala (asimtomatis), derajat ringan, derajat sedang, dan derajat berat atau kritis. Kasus paling ringan tentunya yang asimtomatis, sedangkan yang bergejala ringan dapat dengan adanya gejala walaupun tidak ada pneumonia virus ataupun tidak ada hipoksia, gejala sedang dengan tanda-tanda klinis pneumonia tanpa ada tanda pneumonia berat, gejala berat ditandai dengan adanya tanda klinis pneumonia berat ditambah adanya gejala atau bahaya umum seperti kejang, penurunan kesadaran, muntah, tidak dapat minum, dengan atau tanpa gejala respiratori dengan SpO₂ < 95%, dan untuk gejala kritis dengan *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), sepsis dan syok sepsis (PDPI *et al.*, 2021).

5. Faktor Risiko Terpapar Covid-19

Beberapa faktor risiko seseorang dapat tertular Covid-19 diantaranya usia tua lebih mudah terkena daripada usia muda, laki-laki lebih gampang terpapar daripada wanita (F. Zhou, 2020). Sementara anak-anak masih kontroversi, dimana beberapa data menunjukkan persentase lebih rendah pada anak usia kurang 10 tahun (Liu *et al.*, 2020). Berdasarkan pekerjaan maka tenaga kesehatan lebih gampang tertular Covid-19 dibanding jenis pekerjaan lain. Sebagai *frontliner* menghadapi pandemi Covid-19, tenaga kesehatan lebih rentan terpapar virus SARS-CoV-2 (Barrett *et al.*, 2020). Faktor berupa kontak erat dengan pasien yang sudah terkonfirmasi Covid-19, merupakan faktor risiko lain keterpaparan seseorang terhadap virus SARS-CoV-2 (Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 2020).

Pada faktor risiko berdasarkan jenis kelamin, studi memperlihatkan bahwa banyak perbedaan dalam respon imun antara pria dan wanita dalam menghadapi infeksi Covid-19 dan penyakit-penyakit inflamasi. Pria lebih rentan terhadap infeksi virus dibandingkan wanita dengan berdasarkan kekebalan bawaan yang berbeda, hormon steroid dan faktor yang berhubungan dengan kromosom sex. Gen pengatur kekebalan yang dikodekan oleh kromosom X pada jenis kelamin wanita menyebabkan tingkat viral load yang lebih rendah, pembersihan virus yang lebih cepat dan peradangan yang lebih sedikit daripada pria. Selain itu wanita menghasilkan antibodi yang lebih tinggi dan banyak, serta bertahan dalam sirkulasi lebih

lama (Conti, 2020; Raza *et al.*, 2021). Pada *outcome* pasien pun, terjadi perbedaan berdasarkan sex dan gender pasien (Falahi, 2020).

Pada faktor risiko berdasarkan usia, sebuah penelitian telah menunjukkan bahwa insiden COVID-19 parah dan fatal yang lebih tinggi diamati dengan bertambahnya usia dan berspekulasi bahwa fenomena ini sebagian dikaitkan dengan kondisi komorbiditas yang sudah ada sebelumnya (Ng *et al.*, 2021). Sementara anak-anak dapat terinfeksi virus SARS-CoV-2 dan dapat sakit akibat Covid-19. Namun demikian, sebagian besar anak dengan Covid-19 memiliki gejala ringan atau mungkin tidak memiliki gejala sama sekali atau asimtomatik. Faktor risiko pada anak-anak untuk menderita Covid-19 lebih sedikit dibandingkan orang dewasa. Bayi di bawah usia 1 tahun dan anak-anak dengan kondisi medis tertentu dapat mendasari kemungkinan memiliki penyakit serius dari Covid-19 (CDC, 2021a). Lansia dapat mewakili sekelompok pasien berisiko tinggi tertentu sehingga COVID-19 dapat berkembang dengan perburukan klinis yang progresif. Memang, pada individu yang lebih tua, immunosenescence dan gangguan komorbiditas lebih mungkin untuk terjadinya badai sitokin yang diinduksi virus dan dapat mengakibatkan kegagalan pernapasan yang mengancam jiwa dan terjadi keterlibatan multisistemik (Perrotta *et al.*, 2020). Seiring dengan bertambahnya usia, telah diketahui adanya gangguan pada komponen sistem imun baik alami maupun adaptif, sehingga pada lansia terjadi produksi mediator inflamasi dan sitokin yang berkelanjutan dan potensi inflamasi kronik ringan sistemik dapat terjadi

secara fisiologi akibat penuaan. TLR (*Toll-like receptor*) yang membantu APC (*Antigen Presenting Cell*) dan PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) untuk mengenali mekanisme bakteri menginvasi inang, ditemukan tidak seimbang pada orang lanjut usia sehingga memberikan respons imun yang tidak sesuai. Sistem imun yang berlebihan mampu menjelaskan keterlibatan lebih dari hipertensi terhadap infeksi SARS-CoV-2 bahwa ekspresi TLR4 yang ditemukan pada orang lanjut usia didapatkan lebih tinggi pada kondisi hipertensi dengan fungsi sel T yang menurun. Pasien lanjut usia cenderung untuk mengalami disfungsi organ multi-sistem (Liu *et al.*, 2020)

Dalam hal kondisi medis yang sudah ada sebelumnya, penyakit kardiovaskular memiliki prevalensi tertinggi di antara penyakit yang dapat menempatkan pasien pada risiko lebih tinggi terhadap ancaman SARS-CoV-2. Hal ini dapat disebabkan oleh penurunan sitokin proinflamasi, yang dapat mengarah ke fungsi kekebalan yang lebih lemah pada pasien dengan penyakit penyerta. (Amir *et al.*, 2020). Faktor komorbid juga berhubungan dengan insidens terpapar covid-19, karena sistem imun dan sistem metabolik sangat berhubungan dengan kondisi komorbid pasien. Sebagai contoh, penyakit diabetes lebih rentan terhadap penyakit menular karena gangguan kontrol glikemik, yang mana hal ini dapat membatasi kekebalan humoral dari penderita diabetes mellitus. Ekspresi dari *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) meningkat pada diabetes mellitus tipe 1 dan tipe 2 seperti halnya pada hipertensi, coronavirus berikatan

dengan reseptor ACE2 (Alam *et al.*, 2021). SARS-CoV-2 menggunakan reseptor ACE-2 yang ditemukan di permukaan sel inang untuk masuk ke dalam sel. Komorbiditas tertentu dikaitkan dengan ekspresi reseptor ACE-2 yang kuat dan pelepasan proprotein *convertase* yang lebih tinggi yang meningkatkan masuknya virus ke dalam sel inang (Ejaz *et al.*, 2020). Persentase pasien COVID-19 yang memerlukan rawat inap enam kali lebih tinggi pada mereka yang memiliki kondisi medis sebelumnya dibandingkan mereka yang tidak memiliki kondisi medis (45,4% versus 7,6%) berdasarkan analisis Stokes *et al.* kasus yang dikonfirmasi dilaporkan ke CDC selama 22 Januari hingga 30 Mei 2020. Khususnya, penelitian ini juga melaporkan bahwa persentase pasien yang meninggal karena penyakit ini adalah 12 kali lebih tinggi pada mereka yang memiliki kondisi medis sebelumnya dibandingkan mereka yang tidak memiliki kondisi medis (19.5% vs. 1.6%) (Stokes *et al.*, 2020).

Faktor komorbid lain adalah adanya alergi pada saluran pernapasan. Alergi dapat meningkatkan risiko eksaserbasi yang diinduksi virus penyakit alergi, seperti asma. Predisposisi genetik, respon antivirus yang kurang, gangguan kekebalan fungsi sel, kerusakan epitel, respon sitokin dan kemokin dapat berkontribusi pada sinergisitas penyakit alergi yang dieksaserbasi oleh alergen dan virus, terutama pada penyakit alergi di saluran pernapasan (Dong *et al.*, 2020). Pasien dengan *immunocompromised* dapat mudah terpapar Covid-19 dan dapat menjadi berat (Tassone *et al.*, 2021; Baek *et al.*, 2021)

Faktor risiko berupa penyakit ginjal, penyakit cerebrovaskuler, penyakit kardiovaskuler, penyakit pada saluran pernapasan, diabetes, hipertensi, kanker, diluar penyakit gangguan hepar, secara signifikan dapat meningkatkan risiko kematian. Namun pada penyakit autoimun, tidak jelas apakah merupakan komorbid yang rentan terinfeksi SARS-CoV-2 dan bagaimana severitasnya, karena studi pada pandemi coronavirus sebelumnya tidak memperlihatkan secara jelas terhadap hal ini, tetapi jika dikorelasikan dengan faktor usia, autoimun dapat meningkatkan risiko untuk di rawat di rumah sakit. Virus SARS-CoV-2 terus mengalami evolusi dengan perkembangan jumlah penderita Covid-19 yang dapat semakin besar, maka sangat beralasan bahwa komorbiditas dapat menjadi penyebab kematian terbesar di seluruh dunia (Nuñez *et al.*, 2020; Biswas *et al.*, 2021).

B. Virus SARS CoV-2

1. Struktur Virus SARS-CoV-2

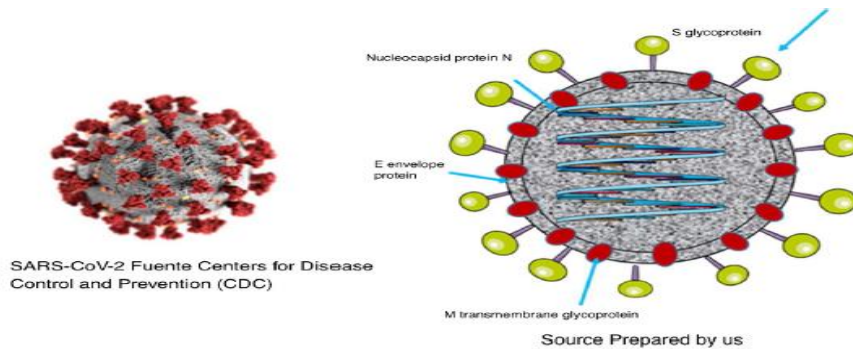
Virus SARS-CoV-2 adalah virus *Ribonucleic Acid* (RNA) yang memiliki strain tunggal positif, nonsegmen dan memiliki kapsul, dengan genom virus pada ukuran 29,9 kb (Jin *et al.*, 2020). *Coronaviruses* (CoVs) merupakan genom terbesar dari virus RNA yang merupakan keluarga dari *Coronaviridae*. *Coronaviruses* (CoVs) merupakan virus ber-*enveloped* dengan rantai tunggal, *positif sense genome* RNA nya berada pada ukuran 26-32 kilobase (Su *et al.*, 2016).

Secara global ada dua jenis coronavirus yang menyebabkan pandemi yang bersifat patogen pada manusia sebelum SARS-CoV-2 yaitu *Severe Acute Respiratory Syndrome CoV* atau disingkat SARS-CoV yang merupakan pandemi pertama dan terjadi di tahun 2002 yang mula terjadinya adalah di Guangdong Cina (Peretto *et al.*, 2020; Cui *et al.*, 2019). Dan diikuti oleh *Middle East Respiratory Syndrome CoV* atau disingkat MERS-CoV di tahun 2012, yang pertama kalinya ditemukan pada seorang pria di Arab Saudi dari spesimen sputumnya (Wit *et al.*, 2016)

Coronavirus (CoV) merupakan famili besar dari virus RNA yang menginfeksi manusia dan berbagai spesies binatang, termasuk kelelawar, babi, unta, kucing, anjing, dan binatang liar lainnya. Pada binatang, coronavirus dapat menyebabkan berbagai gejala respirasi, gastrointestinal, hepatic, dan infeksi neurologi dengan berbagai tingkat keparahan gejala klinik yang berbeda-beda. Selama periode yang lama, telah teridentifikasi empat strain dari coronavirus pada manusia (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, and HKU1) yang mana dapat menyebabkan infeksi saluran napas atas dengan keparahan sedang pada individu yang immunokompeten dengan fatalitas yang tidak diketahui (Wit *et al.*, 2016).

Virus SARS-CoV-2 dengan ordo *Nidovirales*, memiliki famili yaitu *Coronaviridae*, subfamili *Coronavirinae*, genus *Betacoronavirus*, dan subgenus *Sarbecovirus* (WHO, 2020c; Gorbalenya *et al.*, 2020). Virus ini dapat ditransmisikan dari manusia ke manusia lewat droplet *airborne* dan

aerosol, walaupun sebenarnya virus zoonotik ini dapat pula ditransmisikan dari hewan ke manusia (Groot RJ, *et al.*, 2012; Doremalen, 2020).



Gambar 4. Struktur virus SARS-CoV-2

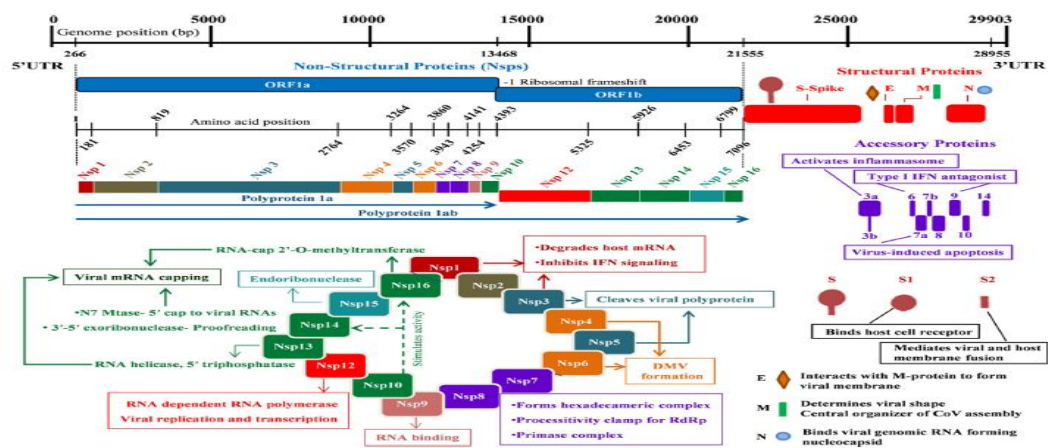
(Sumber: Fernández-Rodríguez *et al.*, 2020)

Struktur virus utama adalah protein *Spike* (S), Nukleokapsid (N), *Envelope* (E), dan membran (M). Struktur ini dikodekan oleh sepertiga genom pada virus SARS-CoV-2 (Gambar 4) (Fernández-Rodríguez *et al.*, 2020)

2. Karakteristik Genom Virus SARS-CoV-2

Coronavirus adalah virus yang struktur genomnya paling baik dikenal di antara semua virus RNA. Dua pertiga dari RNA yang mereka miliki mengkode polimerase virus (RdRp), bahan sintesis RNA, dan dua poliprotein nonstruktural besar yang tidak terlibat dalam modulasi respon host (ORF1a-ORF1b). Sementara sepertiga lainnya dari genom mengkodekan empat struktur protein terutama protein struktural yaitu (*spike* (S), *envelope* (E), membran (M), nukleokapsid (N), dan protein pembantu lainnya. Protein S sendiri berfungsi dalam perlekatan virus, fungsi fusi ke inangnya, serta proses perakitan virus untuk memperbanyak diri dalam sel

inang. Protein E dan protein M berperan dalam proses perakitan virus dan permulaan proses memperbanyak diri dalam sel inang. Protein N memiliki peran penting dalam membungkus dan melindungi RNA virus, sangat berfungsi dalam proses transkripsi dan replikasi virus, serta berperan dalam regulasi interaksi virus dan inangnya. Panjang genom coronavirus menunjukkan variabilitas yang tinggi untuk ORF1a/ORF1b dan empat protein struktural, sebagian besar terkait dengan jumlah dan ukuran protein aksesori (Sahin, 2020; Fadl *et al.*, 2021)



Gambar 5. Struktur Genom Virus SARS-CoV-2

(Sumber : Arya *et al.*, 2021)

Sekuensing genom virus SARS-CoV-2 dimulai dipublikasikan pada Januari 2020. Dari publikasi diperlihatkan bagaimana struktur genomik virus SARS-CoV-2. Struktur genomik itu mencakup RNA genomik (gRNA) terdiri dari 14 *Open Reading Frame* (ORF), dua ORF utama, yaitu ORF1a dan ORF1b, tumpang tindih dengan bingkai ribosom, meliputi dua pertiga dari genom dan diterjemahkan masing-masing ke poliprotein pp1a dan pp1ab. Poliprotein ini diproses oleh protease virus untuk menghasilkan protein non

struktural (Nsp), Nsp1 hingga Nsp16. Masing-masing Nsp ini memiliki fungsi, sebagai contoh Nsp3 mengkodekan untuk *Papain-like Protease* (PLP) dan Nsp5 mengkodekan 3CL-*protease*. Kedua protein berfungsi dalam pembelahan polipeptida dan memblokir respons imun bawaan inang. Nsp12 mengkodekan untuk RNA-*dependent* RNA *polimerase* (RdRp). Nsp 14 Nsp15 mengkodekan untuk RNA *helicase*. Beberapa dari nsp-nsp itu bersama dengan beberapa faktor inang membentuk kompleks transkripsi replikasi (RTC) di dalam *double-membrane vesicles* (DMV). Sepertiga sisa dari genom memiliki ORF yang tumpang tindih, mengkodekan empat protein struktural utama yaitu *spike* (S), membran (M), amplop (E) dan nukleokapsid (N), dan beberapa aksesori protein termasuk ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9 dan ORF10 (Arya *et al.*, 2021; Alanagreh *et al.*, 2020)

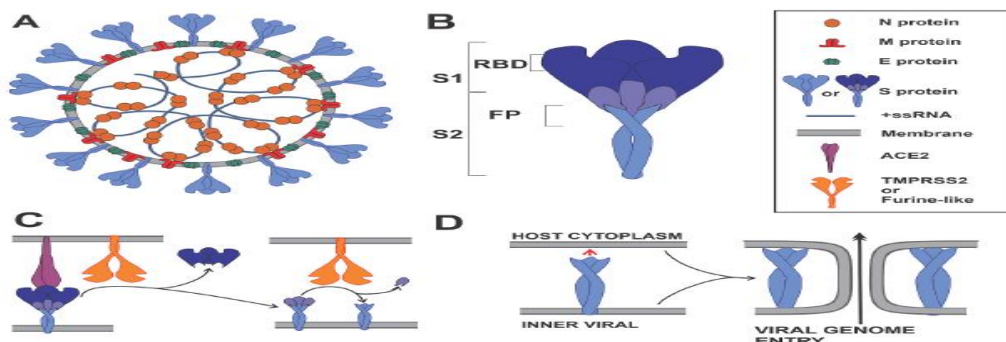
Seperti dengan coronavirus lainnya, virion SARS-CoV-2 yang ukuran genomnya adalah 29,9 kb mempunyai nukleokapsid yang terdiri dari RNA genomik dan nukleokapsid terfosforilasi (N) protein. Nukleokapsid berada di lapisan bilayer fosfolipid dan ditutupi oleh dua jenis protein spike yang berbeda yaitu *the spike glycoprotein trimmer* (S) yang ada pada semua coronavirus, dan *hemagglutinin-esterase* (HE) yang hanya pada beberapa coronavirus. Protein membran (M) dan protein pada “*envelope*” (E), dimana kedua protein ini letaknya berada di antara protein S dalam “*envelope*” virus. Genom SARS-CoV-2 memiliki urutan pada 5' dan 3' (265 nt di wilayah 5' dan 229 nt di wilayah 3'), urutan ini merupakan

urutan yang biasa pada coronavirus. Urutan gen pada coronavirus yaitu 5'- replika *open reading frame* (ORF) 1ab-S-amplop(E)-membran(M)-N-3'. Ukuran panjang genom S, ORF3a, E, M, dan N SARS-CoV-2 adalah pada 3822, 828, 228, 669, dan 1260 nt. Serupa dengan SARS-CoV, SARS-CoV-2 membawa gen ORF8 yang diperkirakan terletak di antara gen M dan N ORF dengan panjang genom 366 nt (Jin *et al.*, 2020).

3. Struktur Protein *Spike*

Protein *spike* adalah mesin molekuler multifungsi yang memediasi masuknya coronavirus ke dalam sel inang. Mula-mula dengan mengikat reseptor pada permukaan sel inang melalui subunit S1 dan kemudian menggabungkan virus dan inang membran melalui subunit S2-nya (F. Li, 2016). Protein *spike* dalam coronavirus merupakan salah satu protein struktural utama. Hal ini penting untuk interaksi viron dengan reseptor sel inang dan fusi selanjutnya antara selubung virus dengan sel inang membran untuk memungkinkan proses invasi dalam menginfeksi inang. (J. R. Wu *et al.*, 2004) . Protein *spike* dari virus SARS-CoV-2 dipecah menjadi subunit S1 dan S2, dimana S1 berfungsi dalam pengikatan reseptor dan S2 memiliki fungsi fusi terhadap membran inang. SARS-CoV-2 menggunakan protein *spike* trimeriknya untuk mengikat reseptor *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) dari inang, dan untuk menyatu dengan membran sel agar bisa masuk menginvasi sel inang. Ini adalah proses dari berbagai langkah dalam pemisahan S1 dan S2 pada protein S berupa interaksi dengan ACE2 dilanjutkan fusi membran

berikutnya dan masuknya virus ke dalam sel. Proses ini melibatkan domain berbeda dari protein S yang berinteraksi dengan sel inang dan komponen intraseluler dan ekstraseluler lainnya. Efisiensi dalam setiap langkah dapat berkontribusi pada virulensi dan infektivitas. Ujicoba terapi terhadap Covid-19 adalah dengan melakukan interupsi terhadap salah satu langkah masuknya virus ke dalam sel inang. S1 melayani fungsi pengikatan reseptor dan mengandung *signal peptide* (SP) pada ujung N, domain terminal-N (NTD), dan domain pengikatan reseptor (RBD). S2 berfungsi dalam fusi membran untuk memfasilitasi masuknya sel, dan mengandung domain *fusion peptide* (FP), *internal fusion peptide* (IFP), dua domain pengulangan *heptad* (HR1 dan HR2), domain transmembran, dan *C- domain terminal* (Xia, 2021).

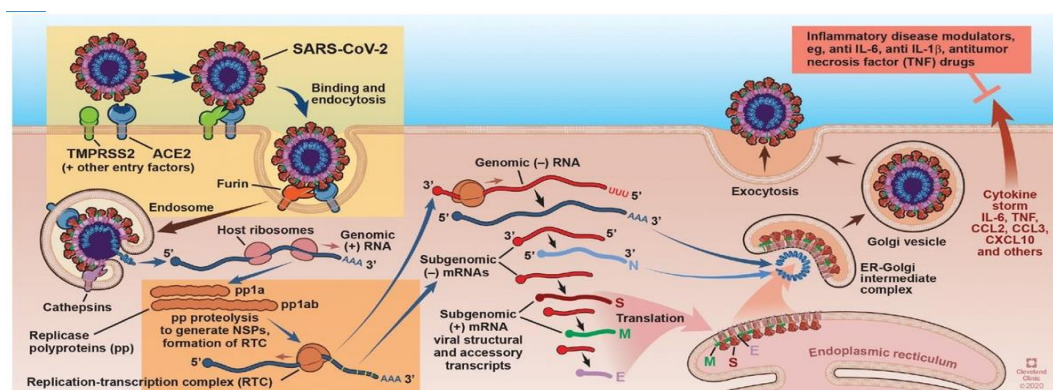


Gambar 6. Struktur Protein Spike
(Sumber : Cavasotto *et al.*, 2020)

Selama proses masuknya virus, protein S multidomain berikatan dengan reseptor inang ACE2, ini diproteolisis oleh protease inang dan akan diaktifkan, dengan demikian memicu serangkaian peristiwa yang menyebabkan terjadinya fusi membran virus dengan membran inang, dan

pelepasan berikutnya dari genom virus ke dalam sitoplasma inang. Pada gambar 6 lokalisasi domain protein S, terdiri dari fragmen S1 dan S2, dimana S1 berisi *Reseptor Binding Domain* (RBD), dan S2 mengandung *fusion peptide* (FP). ACE2 dikenali oleh RBD, dan aktivasi proteolitik bagian protein S oleh *furine-like protease* atau oleh TMPRSS2 (Cavasotto, 2020).

4. Patogenesis Infeksi Virus SARS-CoV-2



Gambar 7. Siklus Virus

(Sumber : Bergmann, 2020)

Siklus hidup virus saat berada di inang yang baru, pada dasarnya terdiri dari empat tahapan: masuknya virus ke dalam sel inang (endositosis), transkripsi /replikasi RNA, translasi/perakitan, dan terakhir adalah pelepasan partikel virus (eksositosis) (Cavasotto, 2020). Protein S multidomain, suatu glikoprotein yang merupakan *spike* protein, membentuk permukaan luar coronavirus, dan glikoprotein inilah yang merupakan awal langkah masuknya virus untuk menginfeksi inang (Sahin, 2020), dengan cara berikatan dengan sel manusia yang sensitif terhadap *spike* protein tersebut, yaitu reseptor inang ACE2, dan akan diproteolisis oleh protease inang TMPRSS2 (transmembran protein serin protease 2) (berwarna hijau)

dan diaktifkan, dan dengan demikian memicu serangkaian peristiwa yang menghasilkan fusi membran virus dengan membran inang. Protease seluler lainnya, misalnya furin (berwarna jingga), memfasilitasi proses masuknya virus melalui jalur endositosis (Bergmann, 2020). (Gambar 7). coronavirus lain kebanyakan mengenali aminopeptidase atau karbohidrat sebagai kunci reseptor untuk masuk ke dalam sel tubuh manusia, selain SARS-CoV dan MERS-CoV yang mengenali eksopeptidase sebagai kunci reseptornya. Proses atau mekanisme dari masuknya virus pada sel manusia bergantung pada protease seluler yang mana diantaranya yaitu *human airway trypsin-like protease* (HAT), *cathepsin*, dan *transmembrane protease serine 2* (TMPRSS2) yang memisahkan *spike* protein virus dan menjaga perubahan penetrasi virus yang lebih lanjut (Shereen *et al.*, 2020), lalu terjadi pelepasan berikutnya dari genom virus ke dalam sitoplasma inang (Cavasotto, 2020)

Jika sel host telah dapat dimasuki virus, maka terjadilah proses kode genom sehingga terjadi ekspresi gen yang membantu terjadinya adaptasi coronavirus pada *host* manusia. Perubahan genom dapat disebabkan oleh rekombinasi, pertukaran gen, insersi gen, atau delesi, yang menyebabkan *outbreak* di kemudian hari (Sahin, 2020; Guo Y.R. *et al.*, 2020).

Setelah *uncoating* dan pelepasan RNA virus ke dalam sitoplasma, langkah kedua dalam siklus virus adalah translasi struktur virus, non-struktural, dan protein aksesori. Karena partikel coronavirus tidak mengandung protein replikasi, maka terjemahan protein virus adalah

langkah penting dalam memproduksi semua mesin yang diperlukan untuk replikasi dan perakitan RNA virus (Cavasotto, 2020). Nsp (Protein Non Struktural) *Open Reading Frame* 1a (ORF1a) dan ORF1ab diterjemahkan sebagai poliprotein pp1a dan pp1ab . Ini pada gilirannya diproses oleh protease virus (dikodekan oleh ORF1a) untuk menghasilkan 16 protein non struktural (Bergmann, 2020) (Gambar 7). Coronavirus memiliki *papain-like protease* (PLpro), dan *3-chymotrypsin-like protease* (3CLpro) atau *main protease* (Mpro). PLpro (domain nsp3) membelah nsp1, nsp2 dan dirinya sendiri; sedangkan Mpro (nsp5) membelah nsp yang tersisa, termasuk dirinya sendiri, sehingga total 16 protein non struktural dapat dihasilkan (Cavasotto, 2020).

Langkah ketiga dalam siklus virus adalah replikasi RNA virus. Dimulai dengan pembentukan kompleks RNA replikasi-transkriptase (RTC) menggunakan retikulum endoplasma kasar (ER). RTC mendorong sintesis *single stranded* (-) RNA (Bergmann, 2020). Sebagaimana semua virus *single stranded* (+) RNA, genom disalin menjadi *reverse* dan *complementary intermediate single stranded* (-) RNA, yang akan disalin balik kembali ke *complete single stranded* (+) RNA *genome* dan beberapa *single stranded* (+) RNA sub-genomik yang lebih pendek, yang digunakan sebagai templat tambahan untuk menerjemahkan sejumlah besar struktur tertentu dan protein aksesori, yang diperlukan selama perakitan virus (Cavasotto, 2020). RTC adalah sentral replikasi genom virus dan transkripsi. Penambatan RTC ke membran dimediasi oleh domain

transmembran nsp3 bersama-sama dengan transmembran protein nsp4 dan nsp6 (Robson et al., 2020).

Langkah terakhir dalam siklus virus adalah perakitan partikel virus dan pelepasan anakan virus. Akhirnya, partikel anakan virus atau virion dilepaskan melalui jalur eksositosis dan siklus virus pun selesai (Cavasotto, 2020). Virus-virus yang dikeluarkan kemudian akan menginfeksi sel ginjal, hati, intestinal, dan limfosit T, dan traktus respiratorius bawah, yang kemudian menyebabkan gejala pada pasien. (Sahin, 2020; Guo, Y.R, *et al.*, 2020)

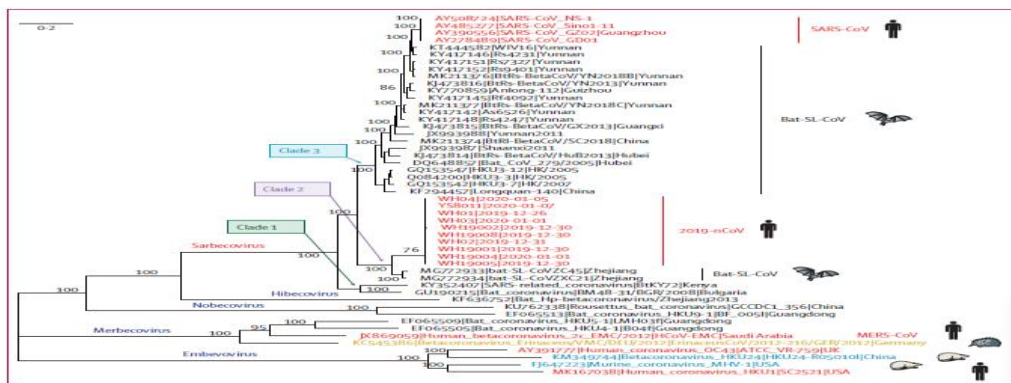
5. Pohon Filogenetik Virus SARS-CoV-2

Dengan perkembangan dan penyebaran Covid-19 yang telah meningkat dan mengalami penyebarluasan, maka kemungkinan mutasi saat proses transmisi dari satu wilayah ke wilayah yang lain. Bentuk genetik dari virus sedikit demi sedikit meningkat seiring dengan penyebaran virusnya sendiri, varian genome tertentu telah berkali-kali disekuens pada lokasi geografik berbeda dan waktu yang berbeda pula. Pohon filogenetik biasanya dibuat untuk membedakan hubungan evolusi antara spesies. Hal ini penting untuk mencocokkan molekul yang sesuai untuk analisis filogenetik dari jalurnya (Turista *et al.*, 2020).

Virus SARS-CoV-2 dalam analisis pohon filogenetik termasuk dalam subgenus *Sarbecovirus* dari genus *Betacoronavirus*. Pada pemodelan homologi terungkap bahwa struktur *Receptor Binding Domain* pada virus SARS-CoV-2 sama dengan virus SARS-CoV, spesies SARS yang menjadi

outbreak pada manusia di tahun 2002/2003 (Peiris *et al.*, 2004; Victor Corman *et al.*, 2020), namun terdapat variasi struktur asam amino pada beberapa residu utama. Walaupun virus SARS-CoV-2 lebih dekat ke *bat-SL-CoVZC45* dan *bat-SLCoVZXC21* di tingkat genom keseluruhan, namun berdasarkan analisis filogenetik dari *Receptor Binding Domain* (RBD) ditemukan bahwa virus SARS-CoV-2 lebih dekat dengan garis keturunan SARS-CoV (Parwanto, 2020).

Pada uji seluruh genom, 2019-nCoV terdapat sekitar ~80% nukleotida yang bertahan homolog sesuai identitas dari virus SARS asli. Hal ini sangat erat kaitannya dengan genom dari dua kelelawar SARS-like CoVs (ZC45 and ZXC21) yang mana berbagi ~89% identitas sekuensing dengan 2019-nCoV (Gralinski & Menachery, 2020). Diperbandingkan dengan SARS-CoV, maka virus SARS-CoV-2 memiliki persentasi homologi sekuens sebesar 79% dan dengan MERS-CoV sebesar 50%. Variasi protein antara virus SARS-CoV dan SARS-CoV-2 juga telah dipelajari. Pada virus SARS-CoV-2, tidak ada protein 8a dan ada fluktuasi jumlah asam amino pada protein 8b dan 3c (Prastyowati, 2020).



Gambar 8. Analisis Filogenetik Rekombinasi dari SARS-CoV-2
(Sumber : Lu *et al.*, 2020)

Berdasarkan hasil analisis terhadap rekombinasi serta pohon filogenetik, didapatkan bahwa Sars-CoV-2 berbagi pohon filogenetik dengan BetaCoV/RaTG13/2013 (EPI_ISL_402131), dikarenakan virus-virus ini ada pada klaster yang sama. Delapan belas laporan lain memperlihatkan, bahwa sebanyak 92 persen sekuens serupa dengan 2019-nCoV yang memperkuat SARS-Like CoV memiliki asal yang sama dengan 2019-nCoV (Gralinski, 2020; Lu *et al.*, 2020) (Gambar 8). Dari analisis ini terindikasi bahwa klaster ini kemungkinan adalah hasil dari evolusi konvergen atau peristiwa rekombinasi kompleks, dimana melibatkan setidaknya dua spesies virus dengan histori evolusi yang berbeda. Pada genom klaster virus ini, terdapat dua segmen eksternal genom virus, dimana didalamnya terdapat nukleotida (nt) 1 hingga nt 13.221 dan nt 23.687 hingga nt 30.079, yang serupa dengan kelelawar CoVs ZC45 dan ZXC21. Segmen pertamanya adalah ORF1a dan segmen keduanya adalah terminal C protein S, ORF3, E, M, ORF6, ORF7a, ORF8, N, dan ORF10. Penemuan ini dapat disebabkan oleh rekonstruksi dari kemungkinan maksimum pada pohon filogenetik, dimana segmen dari nt 1 ke nt 13.521 dan dari nt 23.687 ke nt 30.079 merupakan klaster *Sarbecovirus*. Berdasarkan hasil pohon filogenetik rekonstruksi kemungkinan maksimum tersebut, segmen dari nt 13.522 ke nt 23.686 dari 2019nCoV genom dan RaTG13 tidak dapat diklasterkan sama dengan *Sarbecovirus*. Terlihat terbentuknya cabang baru pada pohon filogenetik,

dimana letaknya berada di antara cabang *Sarbecovirus* dan cabang *Unclassified CoV* (Sun *et al.*, 2020).

6. Mutasi Virus SARS-CoV-2

Mutasi dapat disebabkan oleh karena adanya seleksi alam, dimana terjadi suatu perubahan materi genetik dalam jumlah kecil. Mutasi dapat terjadi pada semua virus, tidak terkecuali virus SARS-CoV-2. Varian baru terjadi jika virus dengan satu atau lebih mutasi dengan sifat fenotif berbeda dari virus aslinya (WHO, 2021c), dimana mutasi itu terletak pada kode genetik dari virus (CDC, 2021b).

Virus SARS-CoV-2 merupakan virus RNA positif rantai tunggal, menjadikannya struktur yang rapuh dan kurang stabil sehingga mudah untuk mengalami mutasi (Sanjuán, 2016). Dibandingkan dengan virus DNA, dan bakteri, maka virus RNA secara *in vitro* memiliki kemampuan bermutasi lebih besar (Gago *et al.*, 2009). Namun, dengan mekanisme *proofreading*, nsp14 dari virus SARS-CoV-2 mengkodekan exonuclease (ExoN) (Robson *et al.*, 2020) yang berpartisipasi dalam mekanisme koreksi kesalahan genom, sebagai fungsi perbaikan virus, menghasilkan penurunan tingkat mutasi ($\sim 10^{-6}$ per situs per siklus) dibandingkan dengan influenza ($\sim 3 \times 10^{-5}$ per situs per siklus), yang tidak memiliki mekanisme ini (Manzanares-Meza & Medina-Contreras, 2020; Domingo *et al.*, 2021)

Glikoprotein spike virus SARS-CoV-2 ini beraffinitas dengan ACE2 untuk masuk dalam tubuh manusia (L. Zhou *et al.*, 2020). Protein virus SARS-CoV-2 yang berperan dalam penularan adalah bagian *spike* (S) yang

berperan penting dalam kemampuan coronavirus menjangkau inang dan *tropism*, serta berfungsi sebagai penginduksi utama respon imun dari penjamu (F. Li, 2016). Daerah *spike* sering dilaporkan mengalami mutasi (Q. Li *et al.*, 2020). Daerah ini terjadi proses perlekatan antara *Reseptor Binding Domain* (RBD) dengan ACE2 sebagai jalan masuknya virus pada host (Hoffmann *et al.*, 2020) dan menjadi target penelitian pengembangan virus dan pengobatan Covid-19 (Du *et al.*, 2009).

Dibandingkan variasi mutasi asam amino daerah *Spike* antara virus SARS-CoV-2 dengan Sarbecovirus lainnya, maka terdapat beberapa perbedaan dimana SARS-Like-CoV tidak memiliki mutasi di daerah *C-terminal domain*, dan terdapat delesi pada posisi 455–457, 463–464, dan 485–497 (Lu *et al.*, 2020). Mutasi terjadi terutama disebabkan adanya perubahan asam amino sehingga struktur protein juga berubah. Mutasi sering terjadi secara transisi daripada transversasi (Koyama *et al.*, 2020)

Mutasi asam amino yang menjadi perhatian hingga akhir Desember 2020 adalah N501Y dan E484K. Pada N501Y terjadi substitusi gen *spike* di posisi 501, dimana mutasi nya ini terdapat pada varian *alpha*, *beta*, *gamma*, yang merupakan *Variant of Concern* (VOC). Sementara E484K terjadi mutasi pada varian *beta* dan *gamma* pada VOC (Health Ontario, 2021)

. Mutasi E484K mempengaruhi penurunan netralisasi virus oleh antibodi yang diperoleh secara alami setelah terinfeksi maupun karena vaksinasi (Gaebler, 2021; Greaney *et al.*, 2021). Mutasi N501Y dianggap

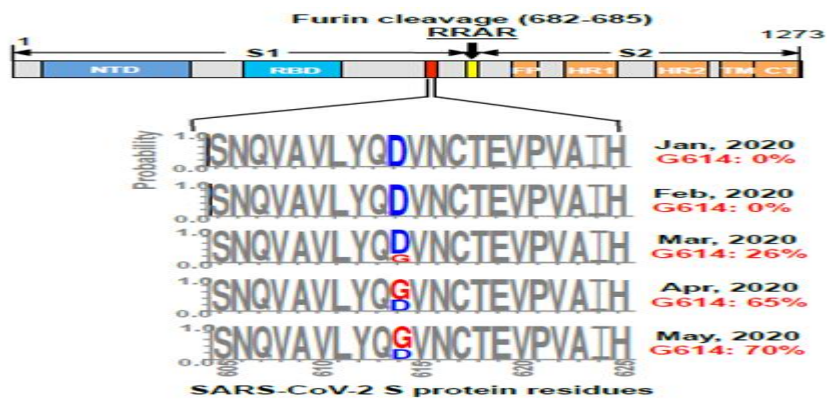
memiliki peran terhadap transmisi virus, dan mutasi E484K berulang kali berhubungan dengan kasus reinfeksi dan mungkin menurunkan aktivitas *neutralizing antibodies* yang tentunya mempengaruhi efektivitas vaksin (Jaspe *et al.*, 2021).

a) D614G

D614G menyebabkan menurunnya S1 *shedding* pada *spike protein* sehingga meningkatkan kemampuan menginfeksi sel inang, terutama pada ACE2 *reseptor dependent* dan terjadi penggabungan protein S ke dalam virion (Zhang *et al.*, 2020; Ogawa *et al.*, 2020). Berdasarkan analisis nilai *cycle threshold* (CT), varian D614G dikaitkan dengan viral load yang berpotensi lebih tinggi tetapi tidak dengan tingkat keparahan penyakit. (Korber, *et al.*, 2020). Tidak terdapat bukti hubungan yang signifikan antara genotip virus dan virulensi yang berubah. Sebuah studi *ex vivo* dan *in vivo* pada hewan pengerat menyimpulkan bahwa substitusi D614G meningkatkan infektivitas SARS-CoV-2, kemampuan kuat dalam menginvasi, dan transmisi dalam sel manusia utama dan pada hewan coba (Hou *et al.*, 2020).

Dari penelitian yang mencari tahu tentang potensi fungsional dan konsekuensi struktural ditemukan bahwa varian protein D614G pada *spike* SARS-CoV-2 telah banyak berada pada genom virus SARS CoV 2 menggantikan D614, telah terjadi peningkatan infektivitas *pseudotipe* Lentivirus dalam kultur sel disebabkan oleh adanya mutasi D614G, sel target yang mengandung ACE2 *Ortholog* mengalami peningkatan

infektivitas dari beberapa spesies, D614G tidak mengubah sintesis, pemrosesan, dan penggabungan Protein S ke dalam partikel SARS-CoV-2, D614G dan D614 sama-sama sensitif terhadap netralisasi oleh antibodi monoklonal menargetkan *Reseptor Binding Domain*, D614G menurunkan afinitas terhadap ACE2 dengan meningkatkan laju disosiasi, D614G mengubah konformasi domain S1 dalam protein SARS-CoV-2 S, D614G mengubah probabilitas Protein *Trimer* SARS-CoV-2 S menempati konformasi terbuka (Yurkovetskiy *et al.*, 2020)



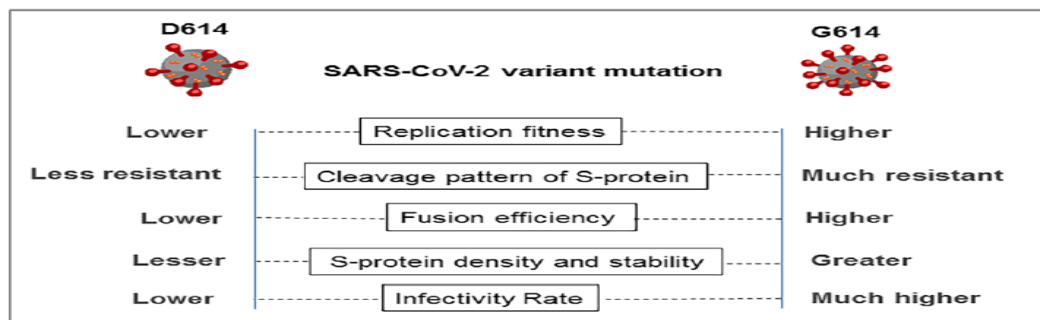
Gambar 9. Letak mutasi asam amino D614G

(Sumber : Zhang *et al.*, 2020b)

D614G letak mutasinya adalah pada domain S1 dan pada *C-terminal domain* (CTD2) . Residu glisin (G) menggantikan asam aspartat (D) pada posisi 614 (D614G) (Nguyen *et al.*, 2020). Dari Februari 2020, hingga Mei 2020 posisi aspartat semakin diakuisisi oleh glisin hingga 70 persen (Zhang *et al.*, 2020b) (Gambar 9).

Pada tipe *wildtype* D614 konformasi proteinnya “tertutup”, dimana *Reseptor Binding Domain* (RBD) sebagian terkubur dan tidak dapat

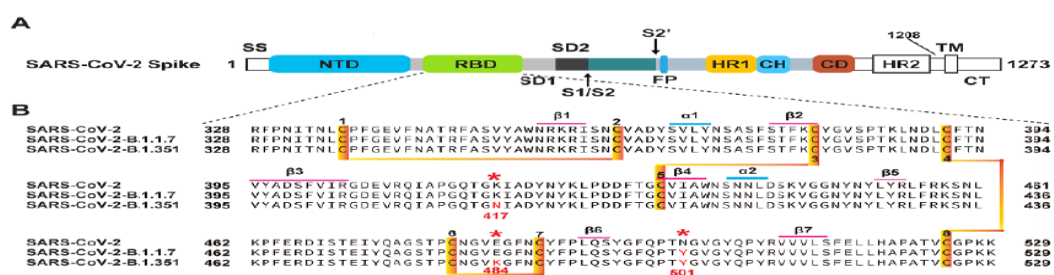
berikatan dengan reseptor ACE2 manusia. Dengan adanya mutasi D614G, pembelahan pada furin lebih mudah terjadi dan dengan adanya ACE2, meningkatkan proporsi protein *spike* sehingga konformasi lebih terbuka dan semakin memberi gambaran bahwa *spike* akan menjadi lebih terbuka (Benton *et al.*, 2021)



Gambar 10. Perubahan karakteristik virus SARS-CoV-2 pada D614G
(Sumber : Bhattacharya *et al.*, 2021)

Mutan D614G menjadi dominan di seluruh dunia dalam waktu yang singkat. Semua varian mutan dinyatakan sebagai *Variant of Interest* atau *Variant of Concern* oleh WHO dan CDC memiliki mutasi D614G pada umumnya. Mutasi terjadi pada S-protein, namun mengubah beberapa konformasi, memberikan beberapa kekuatan ekstra untuk virus. Hal ini membawa banyak perubahan dalam karakteristik S-glikoprotein fitur yang membuat *strain* menjadi dominan (Gambar 10). Evolusi strain ini juga menimbulkan pertanyaan mengenai efisiensi vaksin. Namun, penelitian menunjukkan bahwa strain ini tidak memiliki peran potensial dalam meningkatkan keparahan penyakit. Namun, pada beberapa kasus infeksi yang berulang, telah dikonfirmasi akan adanya isolasi genom mutasi

D614G. Beberapa perubahan pada protein *spike* meningkatkan transmisi penyakit, namun berguna bagi ilmuwan dalam mengembangkan terapi *next generation* anti virus SARS-Cov-2. Penggantian satu asam amino mungkin tidak menyebabkan hilangnya kekebalan ke tingkat yang lebih besar, tetapi D614G menjadi perhatian karena mutasi ini dapat membuat beberapa varian (Bhattacharya *et al.*, 2021).



Gambar 11. Letak Mutasi Asam Amino N501Y dan E484K
(Sumber : Tian *et al.*, 2021)

b) N501Y

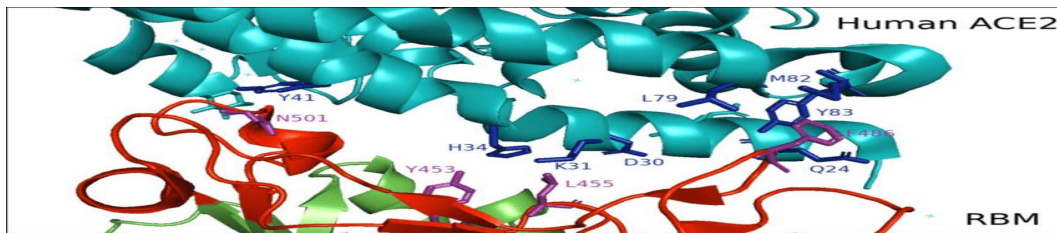
Mutasi N501Y meningkatkan transmisibilitas, meningkatkan severitas penyakit, menurunkan antibodi alami setelah terinfeksi Covid-19 (Burki, 2021; Jaspe *et al.*, 2021). Mutasi N501Y membuat virus SARS-CoV-2 dapat menghindari *neutralizing antibody* untuk meningkatkan infektivitas virus terhadap inang (Yang *et al.*, 2021). Mutasi N501Y memberi kontribusi adanya substitusi asam amino pada varian B.1.1.7. Sebuah studi yang dikoordinasikan oleh ECDC membandingkan tingkat rawat inap varian B.1.1.7 dengan tingkat di antara non-varian. Peningkatan risiko tertinggi terdapat pada kelompok usia 20-60 tahun, yang semakin memperkuat laporan dari rumah sakit bahwa varian ini memperlihatkan gejala klinis lebih

parah di antara orang-orang yang relatif lebih muda (*Funk et al.*, 2021). Mutasi RBD N501Y, menunjukkan peningkatan afinitas terhadap ACE2 dan mutasi ini terdapat pada varian B.1.1.7 dan B.1.351 (*Planas et al.*, 2021)

Ketika pasien datang dengan karakteristik klinik pada kasus-kasus *Variant of Interest* (VOC), terdapat laporan dari sebuah pusat studi Marseille, Perancis, dimana dari 211 pasien di unit penyakit menular konvensional yang terinfeksi dengan N501YV menunjukkan tingkat demam yang lebih tinggi dengan tingkat rinitis dan anosmia lebih rendah dibandingkan dengan mereka yang terinfeksi non-VOC (*Hoang et al.*, 2021)

Beberapa referensi tidak memberikan karakteristik klinis yang cukup dari N501YV, karena penelitian gejala penyakit hanya dilakukan pada saat observasi, atau data yang dikumpulkan berdasarkan gejala yang telah lewat yang diingat oleh orang yang diwawancarai. Sebuah laporan dari Pusat Pengendalian Penyakit Tiongkok dan Pencegahan menunjukkan bahwa 81% kasus COVID-19 tergolong penyakit ringan (*Z. Wu i.*, 2020)

Letak mutasi pada N501Y yaitu pada *Receptor Binding Motif* (RBM) pada posisi 501, dengan perubahan asam amino asparagin (N) menjadi tirosin (Y). RBM ini terlibat dalam interaksi fisik secara langsung dengan ACE2 untuk menginisiasi masuknya virus ke dalam sel host (*Yang et al.*, 2021). RBM merupakan bagian dari *Reseptor Binding Domain* pada protein domain S1. Pada gambar 11 dapat terlihat letak mutasi dari N501Y, pada posisi 501 terlihat Y mengambil posisi N pada SARS-CoV-2 *lineage* B.1.1.7 dan B.1.351 (*F. Tian et al.*, 2021)



Gambar 12. Mutasi N501Y pada RBM

(Sumber : Dorp *et al.*, 2020)

c) E484K

Mutasi virus SARS-CoV-2 baik pada E484K dan N501Y berada dalam *Receptor-Binding Motif* (RBM), sebuah motif fungsional utama yang membentuk antarmuka dan langsung bersentuhan dengan reseptor ACE2 manusia (Tegally *et al.*, 2020). Posisi RBM berada dalam *Receptor Binding Domain* (RBD), bersama dengan *core* RBD. RBM pada RBD berhubungan dengan bagian bawah dari lobus kecil ACE2, dengan permukaan luar RBM yang cekung mengakomodasi menghubungi sisi bawah lobus kecil dari ACE2, dengan permukaan luar cekung di RBM yang mengakomodasi *N-terminal helix* dari ACE2 (Lan *et al.*, 2020).



Gambar 13. Letak Mutasi E484K dan N501Y yang tidak berjauhan

(Sumber : You *et al.*, 2021)

Letak mutasi E484K yaitu asam amino glutamat (E) pada posisi 484 digantikan oleh asam amino lisin (K) (Gambar 11) (F. Tian *et al.*, 2021). Letak mutasi E484K tidak terlalu jauh dari N501Y dalam RBD (Gambar 13) (You *et al.*, 2021).

Mutasi E484K ,meningkatkan kemampuan virus untuk menghindari sistem kekebalan inang, terjadi pada varian B.1.1.7. Mutasi protein *spike* dan tampaknya berdampak pada respons kekebalan tubuh dan mungkin, kemanjuran vaksin (Wise, 2021). Mutasi pada varian B.1.351 dan P.1, termasuk E484K dan K417N/T, menjadi perhatian yang tinggi, karena kedua mutasi ini sebagian mengkompromikan netralisasi yang dihasilkan oleh infeksi atau vaksinasi sebelumnya atau mungkin meningkatkan kebugaran virus untuk meningkatkan daya lekatnya pada inang (Planas *et al.*, 2021).

Mutasi E484K memiliki peran penting dalam hilangnya aktivitas penetralan antibodi. Varian B.1.351 secara nyata lebih tahan terhadap netralisasi oleh plasma dari individu yang pernah terinfeksi Covid-19 dan telah pulih dan serum dari individu yang telah divaksinasi, dan efek ini dimediasi oleh adanya mutasi E484K (Annavajhala *et al.*, 2021). Mutasi asam amino ini juga dapat meningkatkan ketahanan terhadap netralisasi oleh *many antibody monoclonal* (mAbs), sementara sebagian besar serum *convalescent* dan vaksin mRNA yang diinduksi imun serum memperlihatkan aktivitas penghambatan berkurang (Lesho *et al.*, 2021)

7. Varian Virus SARS-CoV-2

Tim *Technical Advisory Group on Virus Evolution Working Group* dari *World Health Organization* (WHO), membuat pembagian 3 level varian virus SARS-CoV-2 berdasarkan karakteristik fenotif berupa transmisi, keparahan penyakit, dan pengukuran terhadap akurasi diagnostik dan performa

vaksin, yaitu *Variant of Concern*, *Variant of Interest*, dan *Variant of Under Monitoring*.

1. *Variant of Concern* (VOC) adalah virus SARS-CoV-2 mengalami perubahan satu atau lebih dari :

- a. peningkatan transmisi atau telah terjadi perubahan epidemiologi yang merugikan,
- b. peningkatan virulensi atau perubahan gejala klinis pasien terkonfirmasi Covid-19
- c. penurunan efektivitas kesehatan masyarakat dan tindakan sosial atau diagnostik yang tersedia, serta vaksin dan terapi (WHO, 2020f).

Varian yang termasuk adalah :

- a. Alpha/B.1.1.7
- b. Beta/B.1.351
- c. Gamma/P.1
- d. Delta/B.1.617.2

2. *Variant of Interest* (VOI)

- a. Virus SARS-CoV-2 yang mengalami perubahan genetik yang diprediksikan atau diketahui memiliki efek terhadap karakteristik virus seperti transmisi, keparahan penyakit, penurunan imunitas, serta penurunan efektivitas metode diagnostik dan terapi
- b. Teridentifikasi sebagai penyebab transmisi komunitas yang signifikan atau beberapa kluster Covid-19, di banyak negara dengan

prevalensi relatif yang meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah kasus dari waktu ke waktu, atau dampak epidemiologis nyata lainnya yang menunjukkan risiko yang muncul terhadap kesehatan masyarakat global.

Yang termasuk dalam VOI adalah :

- a. Lambda/ C.37
- b. MU/ B.1.621

3. *Variant Under Monitoring* (VUM)

Merupakan varian SARS-CoV-2 dengan perubahan genetik yang diduga mempengaruhi karakteristik virus dengan beberapa indikasi bahwa hal itu dapat menimbulkan risiko di masa depan, tetapi bukti dampak fenotipik atau epidemiologis saat ini tidak jelas, memerlukan pemantauan yang lebih dalam, dan penilaian ulang sambil menunggu bukti baru (WHO, 2020f)

Yang termasuk dalam VUM adalah :

- a. AZ.5
- b. C.1.2
- c. B.1.617.1
- d. B.1.526
- e. B.1.525
- f. B.1.630
- g. B.1.640 (WHO, 2020f)

Varian pertama yang muncul di Wuhan adalah *wildtype* Wuhan dengan susunan awal D614, hingga awal April 2020 telah terjadi mutasi dimana asam amino *aspartic acid* diisi oleh *glysin* pada posisi 614 sehingga variannya diberi nama D614G (Zhang *et al.*, 2020a). Hingga September 2020 muncul lagi varian-varian baru, dengan varian yang dilaporkan adalah varian B.1.1.7 yang mengalami mutasi asam amino dimana salah satunya masih terdapat mutasi D614G yang sudah dominan terdapat pada berbagai varian di seluruh dunia (Galloway *et al.*, 2021). Dengan bermunculannya varian-varian Covid-19 yang baru, akan mempengaruhi kebijakan penanganan Covid-19 sesuai risiko per daerah (Satgas Covid, 2021).

C. Diagnosis Molekuler Covid-19

1. Pengambilan sampel virus SARS-CoV-2

Spesimen yang diambil sebagai sampel untuk mendeteksi adanya virus SARS-CoV-2 bergantung pada presentasi klinis dan lamanya waktu sejak *onset time*. Dimana minimal, spesimen saluran pernapasan harus diambil. Spesimen dari saluran pernapasan atas dianggap mewakili tes infeksi virus SARS-CoV-2 pada tahap awal, terutama pada kasus-kasus yang ringan atau tanpa gejala (WHO, 2020e). Sejumlah penelitian menemukan bahwa pengambilan sampel usap nasofaring lebih memberikan hasil yang lebih terandalkan dan lebih sensitif dibandingkan sampel dari usap orofaring (Patel. R *et al.*, 2020 ; Wang *et al.*, 2020).

Namun kombinasi keduanya lebih bagus jika dapat dilakukan karena terbukti meningkatkan sensitivitas dalam mendeteksi adanya virus saluran pernapasan (Lai *et al.*, 2020; Ek *et al.*, 2019).

Spesimen saluran pernapasan bawah dianjurkan jika pengambilan dilakukan pada tahapan lanjutan dari penyakit Covid-19 atau pada pasien dengan hasil pengambilan sampel swab nasofaring dan orofaring yang diduga kuat mengalami Covid-19 secara klinis (Winichakoon *et al.*, 2020; Y. Huang *et al.*, 2020). Sputum yang diambil secara spontan merupakan spesimen saluran pernapasan bawah. Untuk sputum yang diinduksi maupun yang merupakan aspirat endotracheal atau dari bronchoalveolar lavage tidak direkomendasikan karena risiko transmisi aerosol yang dapat meningkat, terutama jika pasien dengan penyakit saluran pernapasan yang sudah parah (WHO, 2020a; WHO, 2020e).

Ada kasus-kasus tertentu di mana usapan nasofaringeal dan orofaringeal dapat sulit dilakukan, seperti skrining massal di sekolah atau panti wreda, terutama jika orang lanjut usia dengan demensia atau anak-anak kecil terlibat. Dalam skenario-skenario ini, cairan oral dapat menjadi spesimen yang sesuai, karena metode-metode pengambilannya tidak begitu invasif dan risiko pajanan kepada orang lain saat pengambilan dilakukan lebih rendah dibandingkan pengambilan spesimen dari saluran pernapasan atas. Saat ini, WHO tidak merekomendasikan penggunaan air liur sebagai jenis spesimen tunggal untuk diagnosis klinis rutin. Jika metode pengambilan nonstandar akan digunakan untuk mendiagnosis patogen-

patogen saluran pernapasan lain, deteksi patogen-patogen ini perlu menjadi bagian dari prosedur validasi (WHO, 2020e)

Tata cara pengambilan swab nasofaring:

- a. Menyiapkan *cryotube* yang mengandung media transport virus (Hanks BSS + Antibiotika), dapat juga menggunakan VTM komersil yang siap pakai dari pabrikan.
- b. Menempelkan label bertuliskan nama pasien dan kode nomer spesimen. Jika label bernomer tidak tersedia maka penamaan dapat ditulis pada bagian berwarna putih di dinding *cryotube*. (Medium Hanks yang telah berubah warna menjadi kuning tidak dapat digunakan lagi).
- c. Menggunakan swab yang terbuat dari *dacron*/rayon steril dengan tangkai plastik atau jenis *Flocked Swab* (tangkai lebih lentur). Jangan menggunakan swab kapas atau swab yang mengandung *Calcium Alginat* atau swab kapas dengan tangkai kayu, karena mungkin mengandung substansi yang dapat menghambat dan menginaktivasi virus dan dapat menghambat proses pemeriksaan secara molekuler.
- d. Pastikan tidak ada obstruksi (hambatan pada lubang hidung).
- e. Masukkan secara perlahan swab ke dalam hidung, pastikan posisi swab pada Septum bawah hidung.
- f. Masukkan swab secara perlahan-lahan ke bagian nasofaring.
- g. Swab kemudian dilakukan gerak memutar secara perlahan.
- h. Kemudian masukkan sesegera mungkin ke dalam *cryotube* yang berisi VTM

- i. Patahkan tangkai plastik di daerah mulut cryotube agar cryotube dapat ditutup dengan rapat.
- j. Pastikan label kode spesimen sesuai dengan kode yang ada di formulir penyelidikan epidemiologi.
- k. Cryotube kemudian dililit parafilm dan masukkan ke dalam plastik klip. Jika ada lebih dari satu pasien, maka plastik klip dibedakan/terpisah. Untuk menghindari kontaminasi silang.
- l. Simpan dalam suhu 2-80C sebelum dikirim. Jangan dibekukan dalam freezer (Kemenkes, 2020)

2. Isolasi RNA

Tahapan setelah pengumpulan sampel adalah melakukan ekstraksi RNA untuk isolasi RNA virus (Patel. R *et al.*, 2020). RT-PCR menggunakan RNA sebagai bahan awal untuk amplifikasi asam nukleat in vitro (Farkas & Holland, 2009). Tahapan kunci preanalitik dalam metode *real time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* adalah ekstraksi RNA. Tahapan ini berfungsi untuk mengisolasi material genetik virus sebelum dideteksi. Tahapan isolasi RNA secara umum terdiri dari tiga prinsip yaitu;

1. Proses melisiskan sel,
2. Memisahkan RNA virus dari makromolekul lain seperti DNA, protein, dan lemak
3. Pembentukan konsentrasi RNA (Wozniak *et al.*, 2020).

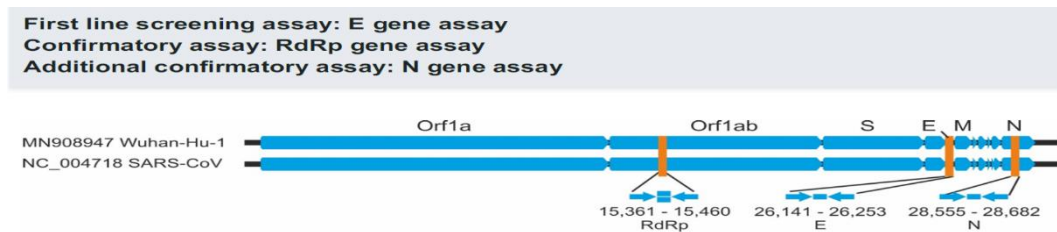
Prasyarat paling penting dalam preparasi analisa ekspresi gen adalah berupa persiapan RNA virus berkualitas tinggi yang konsisten dari sampel. Kontaminasi oleh DNA, protein, polisakarida, atau pelarut organik dapat mengganggu proses analisa ekspresi gen, dan dapat menjadi sumber sinyal positif palsu pada ekspresi gen metode RT-PCR. Hal lain yang dapat terjadi jika proses isolasi RNA tidak adekuat adalah terjadinya hasil negatif palsu dari luaran yang dibentuk oleh RT-PCR. Proses isolasi RNA yang tidak sempurna dapat pula menghambat *reverse transcriptase* dan DNA polimerase, yang mengarah pada efisiensi transkripsi balik yang lebih rendah dan sensitivitas PCR yang akan berkurang (Qiagen, 2021)

3. Real Time PCR

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang disebut juga sebagai reaksi berantai polimerase adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan (amplifikasi) suatu sekuen nukleotida tertentu secara eksponensial dengan cara *in vitro*. Pada awalnya metode ini hanya untuk amplifikasi molekul DNA, namun kemudian berkembang dapat pula melakukan pelipatgandaan mRNA (Yuwono, 2006). Metode PCR telah berkembang hingga saat ini berupa real time PCR yaitu suatu metode PCR untuk melihat secara langsung perkembangan reaksi PCR pada saat itu juga yang dianalisa dengan komputer (Biosoft, 2021).

Saat ini, uji deteksi virus SARS-CoV-2 berbasis *real time* PCR menargetkan regio gen virus berupa nukleokapsid (N), *envelop* (E), *spike* (S), dan/atau *open reading frame* (ORF) (Sahahjpal et.al, 2021).

Target gen utama yang dianjurkan oleh WHO adalah gen E (Victor W Corman *et al.*, 2020)



Gambar 14. Target Gen SARS-CoV-2 pada proses Real Time PCR
(Sumber: Corman *et al.*, 2020)

Nilai *Cycle threshold (CT-Value)* menentukan jumlah kopi RNA SARS-CoV-2 dari suatu spesimen (Alsuliman *et al.*, 2020). Nilai CT berbanding terbalik dengan viral load dan berlaku eksponensial. (Young *et al.*, 2020).

4. Reverse Transcriptase Real Time PCR

Penemuan *reverse transcriptase retroviral* pada awal 1970-an akhirnya memungkinkan RT-PCR. RT-PCR umumnya digunakan dalam diagnosis dan kuantifikasi infeksi virus RNA (misalnya *human immunodeficiency virus* dan virus hepatitis C) dan analisis transkrip mRNA seperti yang dihasilkan oleh translokasi yang umumnya terkait dengan limfoma non-Hodgkin, leukemia, dan sarkoma (Farkas, 2009).

SARS-CoV-2 adalah virus RNA untai tunggal positif tunggal dengan genomnya mengandung sekitar 30.000 nukleotida dan 15 gen. Beberapa dari gen ini telah digunakan sebagai primer/probe target untuk rantai polimerase *reverse transcriptase* pada diagnostik *real time* PCR (RT-PCR), termasuk E (amplop), N (nukleokapsid), RdRp (*RNA-dependent* RNA

polymerase), gen nsp10 (protein nonstruktural 10), dan gen nsp14 (protein nonstruktural 14, *exoribonuclease*) (Fang *et al.*, 2020).

Reverse Transcriptase Real Time PCR adalah suatu teknik penggandaan DNA dengan menggunakan *fluorogenic probe* yang dapat dilihat progresivitas hasil penggandaannya di setiap siklusnya. Alat yang digunakan adalah alat *thermal cycler* dengan detektor sebagai pembaca sinyal fluoresensi yang kemudian akan diubah menjadi sinyal digital yang dapat dianalisis melalui komputer, dan dapat dipantau pada saat itu juga. *Reverse Transcriptase Real Time PCR* memiliki sensitivitas tinggi dan efisien selain karena proses elektroforesis sudah tidak diperlukan lagi dalam interpretasi hasil, juga karena proses analisis dengan *software* komputer dalam mengolah proses amplifikasinya (Agustiningsih dkk, 2020).

Pada prinsipnya proses reverse transkriptase real time PCR berupa proses pembentukan cDNA dari template RNA dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase*. *Reverse transcriptase* adalah enzim DNA polimerase yang bergantung pada RNA, mengkatalisis sintesis DNA menggunakan RNA sebagai templat. Produk akhir dikenal sebagai DNA komplementer (cDNA) (Farkas, 2009). Dengan durasi sekitar 30 menit pada temperature 50⁰celsius. (Agustiningsih dkk, 2020) Setelah cDNA menjadi templat, maka dimulailah proses amplifikasi DNA pada proses PCR. (Wong, 2005), dan jumlah DNA target akan meningkat secara eksponensial (Agustiningsih dkk, 2020).

D. Next Generation Sequencing

1. Next Generation Sequencing

Saat ini pandemi sudah memberi dampak yang cukup besar. Oleh karena itu diperlukan sekuensing genomik untuk melihat urutan kode genetik dari virus Sars-CoV-2. Pengurutan genom (sekuensing genomik) untuk SARS-CoV-2 dapat digunakan untuk menyelidiki dinamika wabah, termasuk perubahan ukuran epidemi dari waktu ke waktu, penyebaran spatiotemporalnya (pola distribusi), dan pengujian hipotesis tentang rute penularan (WHO, 2020c). Pola distribusi virus didapatkan melalui sekuensing genomik dari produk PCR yaitu gen *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp) sehingga dapat disusun pohon filogenetik (Young *et al.*, 2020)

Selain itu, urutan genomik dapat digunakan untuk memutuskan tes diagnostik, obat, dan vaksin mana yang cocok untuk eksplorasi lebih lanjut. Oleh karena itu, analisis genom virus SARS-CoV-2 dapat melengkapi, menambah, dan mendukung strategi untuk mengurangi beban penyakit. Namun, potensi biaya dan volume pekerjaan yang tinggi yang diperlukan untuk sekuensing genom berarti bahwa laboratorium harus memiliki kejelasan tentang apa yang dapat diharapkan dari investasi tersebut dan apa yang diperlukan untuk memaksimalkan utilitas data sekuens genomik tersebut. Panduan WHO tentang sekuensing genomik SARS-CoV-2 saat ini sedang dikembangkan (WHO, 2020c).

Melakukan sekuensing genomik dilakukan dengan memilih suatu teknik sekuensing yang akurat, efisien, dan efektif. Teknik *Next Generation Sequencing* merupakan teknik sekuensing yang dapat menjawab tantangan tersebut. Teknik *Next Generation Sequencing* (NGS) adalah suatu teknik sekuensing genomik “*high-throughput sequencing platforms*” yang jauh lebih cepat, murah, dan lebih akurat daripada metode sekuensing sebelumnya yaitu metode sanger (Ku, 2013).

Secara umum tahap-tahap dalam pengerjaan NGS terbagi dalam tiga tahapan yaitu:

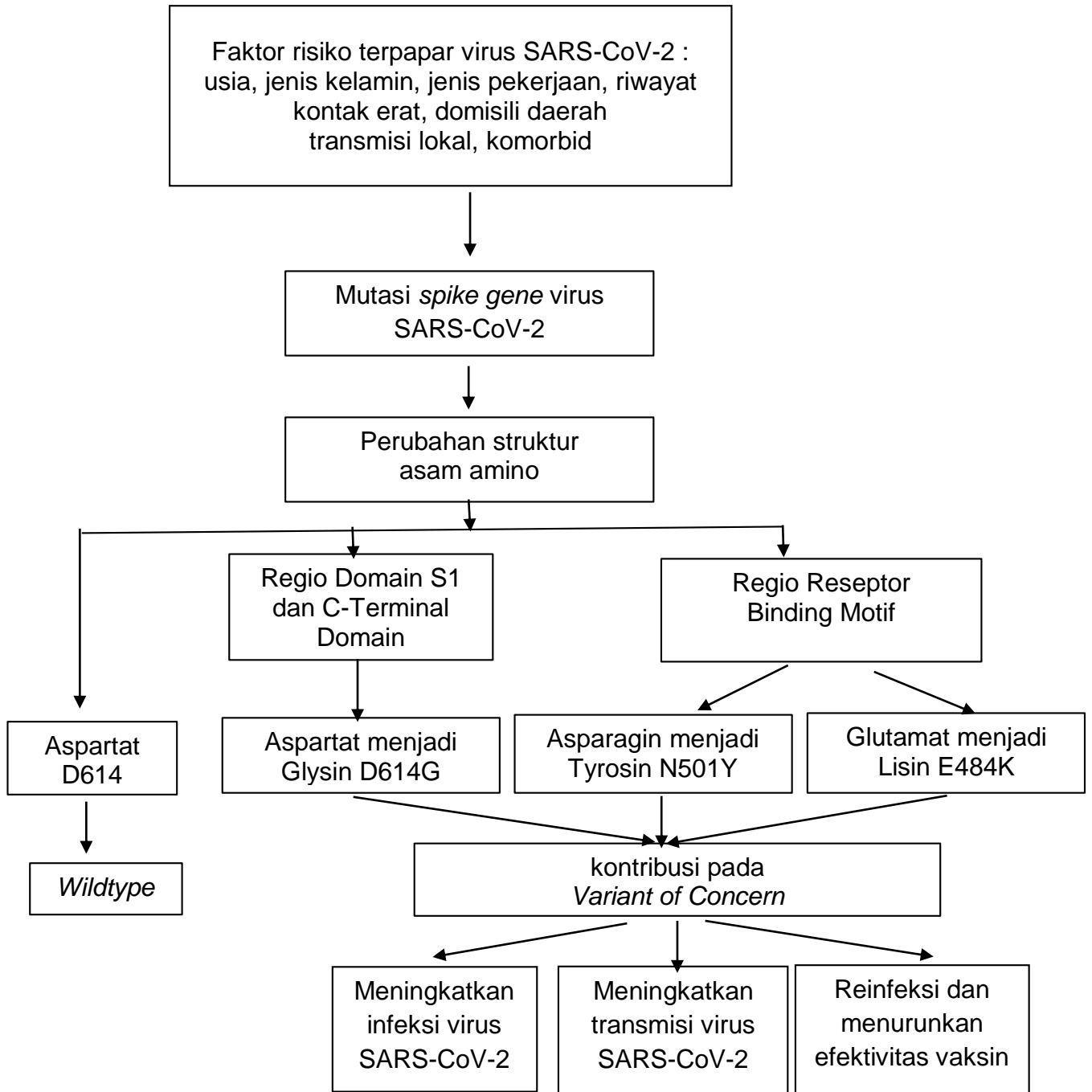
1. *Library preparation* dimana pemotongan genomik DNA secara acak lalu diligasi dengan adapter yang sesuai
2. Amplifikasi *library*
3. Sekuensing dengan sintesis yang membutuhkan DNA *library* (Gupta & Verma, 2019).

Teknik NGS dapat dilakukan secara masif dan paralel dengan sekuensing genomik yang diinginkan dalam sekali waktu, dan memiliki keunggulan hasil, skala, kecepatan, resolusi dan tentunya biaya (Behjati & Tarpey, 2013). Teknik NGS memiliki kapasitas menurunkan biaya *Human Genome Project* yang sebelumnya memakai metode sekuensing Sanger, dari \$100.000 menjadi \$1000 (Kling, 2005).

2. Kriteria sampel untuk dilakukan *Next Generation Sequencing*

Sampel yang dipilih untuk dapat dilanjutkan pengerjaan sekuensing untuk dapat menghasilkan sekuens genomik serta transkriptom SARS-CoV-2 dari pasien terinfeksi adalah sampel dengan nilai *viral load* tinggi yang diinterpretasikan dalam nilai *cycle threshold* rendah dari qPCR. Nilai ambang *cycle threshold* sendiri adalah di bawah 33 (Doddapaneni *et al.*, 2021). Hal ini mungkin didukung oleh fakta bahwa korelasi antara keberhasilan isolasi virus dalam kultur sel dengan nilai *cycle threshold* gen E penargetan RT-PCR kuantitatif menunjukkan bahwa pasien dengan *cycle threshold* di atas 33-34 sudah tidak menular lagi (La Scola *et al.*, 2020). Pada beberapa studi lain, dilaporkan bahwa analisa sekuensing genomik memberi hasil yang baik dengan nilai *cycle threshold* hasil RT-PCR di kisaran 25-30 (WHO, 2021c)

E. Kerangka Teori



F. Definisi Operasional

1. SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 adalah virus yang diisolasi dari sampel swab nasofaring pasien Klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin yang berantai tunggal positif, nonsegmen, dan memiliki kapsul yang diidentifikasi dengan teridentifikasi alat *Polymerase Chain Reaction*.

Kriteria Objektif

Dinyatakan terdeteksi RNA virus SARS-CoV-2 jika terdeteksi dua gen yaitu ORF1ab dan *N Gene*.

2. *Next Generation Sequencing (NGS)*

Next Generation Sequencing (NGS) adalah pengurutan DNA lengkap dari suatu genom mikroorganisme pada satu waktu dengan metode yang akurat, masif, paralel dan efisien, yang dilakukan pada sampel yang terdeteksi RNA Virus SARS-CoV-2.

Kriteria Objektif

NGS dapat dilanjutkan pengerjaannya jika nilai CT sampel tersebut di bawah atau sama dengan 30 dan sesuai dengan *Quality Control (QC)* dari distributor.

3. Mutasi Genomik Virus SARS-CoV-2

Mutasi genomik virus SARS-CoV-2 adalah perubahan nukleotida, diantaranya D614G, N501Y, E484K, dari virus SARS-CoV-2 setelah melalui alignment data dengan menggunakan referensi varian *wildtype*.

Kriteria Objektif

Mutasi pada Analisa *Next Generation Sequencing* terlihat ada perubahan nukleotida setelah disejajarkan dengan nukleotida varian *wildtype*.