

TESIS

**HUBUNGAN ANTARA *CYCLE THRESHOLD (CT) VALUE* DENGAN
SEVERITAS GEJALA KLINIS PASIEN COVID-19**

*Correlation Between Cycle Threshold (CT) Value with Severity of Clinical
Symptoms in COVID-19 Patients*

WISNU ADRYANTO

C101216208



PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp.1)

DEPARTEMEN ILMU PENYAKIT DALAM

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR

2021

**HUBUNGAN ANTARA *CYCLE THRESHOLD (CT) VALUE* DENGAN
SEVERITAS GEJALA KLINIS PASIEN COVID-19**

*Correlation Between Cycle Threshold (CT) Value with Severity of Clinical
Symptoms in COVID-19 Patients*

TESIS

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Dokter Spesialis-1(Sp-1)

Program Studi Ilmu Penyakit Dalam

Disusun dan diajukan oleh:

WISNU ADRYANTO

Kepada:

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1
PROGRAM STUDI ILMUPENYAKIT DALAM FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**HUBUNGAN ANTARA *CYCLE THRESHOLD (CT) VALUE* DENGAN
SEVERITAS GEJALA KLINIS PASIEN COVID-19**

**CORRELATION BETWEEN *CYCLE THRESHOLD (CT) VALUE* WITH
SEVERITY OF CLINICAL SYMPTOMS IN COVID-19 PATIENTS**

Disusun dan diajukan oleh :

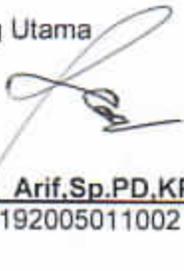
WISNU ADRYANTO

Nomor Pokok : C101 216 208

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Penyakit Dalam
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 25 Mei 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama



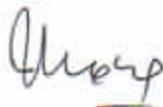
Dr. dr. Erwin Arif, Sp.PD, KP, SpP(K)
NIP. 197101192005011002

Pembimbing Pendamping



Dr. dr. Muh. Ilyas, Sp.PD, KP, SpP(K)
NIP. 196507231997031003

Ketua Program Studi

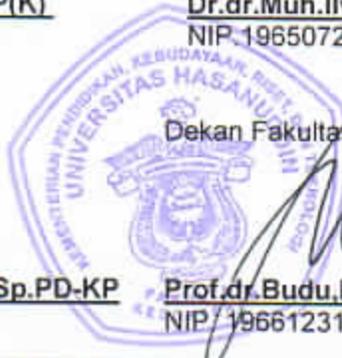


Dr. dr. M. Harun Iskandar, Sp.P, Sp.PD-KP
NIP. 197506132008121002

Dekan Fakultas/Sekolah Pascasarjana



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



PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Wisnu Adryanto

No. Stambuk : C101216208

Program Studi : Ilmu Penyakit Dalam

Jenjang : Program Pendidikan Dokter Spesialis-1

Menyatakan dengan ini bahwa Tesis dengan judul Hubungan Antara *Cycle Threshold* (CT) *value* dengan Severitas Gejala Klinis Pasien COVID-19 adalah hasil karya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari tesis saya ini terbukti sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 25 Mei 2021

Yang menyatakan,

A 10,000 Indonesian Rupiah banknote is shown with a signature written over it. The banknote features the Garuda Pancasila emblem and the text 'SEPULUH RIBU RUPIAH', '10000', 'METRAN', and 'RUMPEL'. The serial number '43E86AJX15644978B' is visible at the bottom.

Wisnu Adryanto

KATA PENGANTAR

Puji syukur Saya panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, atas segala rahmat dan karunia yang dilimpahkan-Nya, sehingga Saya dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis ini, yang merupakan karya akhir untuk melengkapi persyaratan penyelesaian pendidikan keahlian pada Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

Pada kesempatan ini saya ingin menghaturkan penghargaan dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. **Prof. Dr. Dwia A. Tina Pulubuhu, M.A,** Rektor Universitas Hasanuddin, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Dokter Spesialis di Universitas Hasanuddin Makassar.
2. **Prof. dr. Budu, Ph,D, Sp.M(K), M.MED.ED,** Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis dibidang Ilmu Penyakit Dalam.
3. **dr. Uleng Bahrun, SpPK(K), Ph.D,** Koordinator PPDS-I Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, bersama staf yang senantiasa memantau kelancaran program pendidikan Spesialis Bidang Ilmu Penyakit Dalam.
4. **Dr. dr. Andi Makbul Aman, SpPD, K-EMD** dan **Prof. Dr. dr. Syakib Bakri, Sp.PD, K-GH,** Ketua dan mantan Ketua Departemen

Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, atas kesediaan beliau untuk menerima, mendidik, membimbing dan memberi nasihat yang sangat berharga kepada saya dalam mengikuti Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Penyakit Dalam.

5. **Dr. dr. Harun Iskandar, Sp.PD, KP, Sp.P(K)**, dan **Dr. dr. Hasyim Kasim, Sp.PD-KGH**, Ketua dan mantan Ketua Program Studi bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, yang senantiasa memberikan motivasi, membimbing dan mengawasi kelancaran proses pendidikan selama saya mengikuti program pendidikan Dokter Spesialis Penyakit Dalam.
6. **Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD, K-GH, Sp.GK** selaku Sekretaris Program Studi Departemen Ilmu Penyakit Dalam dan Pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan motivasi, membimbing dan mengawasi kelancaran proses pendidikan selama saya mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis Penyakit Dalam.
7. **Dr. dr. Erwin Arif, Sp.PD, KP, Sp.P(K)** selaku pembimbing penelitian yang senantiasa memberikan motivasi, masukan dan membimbing dalam proses pembuatan tesis ini.
8. Seluruh Guru Besar, Konsultan dan Staf pengajar di Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin sebagai pengajar yang sangat berjasa dan bagaikan orang tua yang sangat saya hormati dan banggakan. Tanpa bimbingan mereka, mustahil bagi saya

mendapat ilmu dan menimba pengalaman di Departemen Ilmu Penyakit Dalam.

9. **Dr. dr. Arifin Seweng, MPH** selaku konsultan statistik atas kesediannya membimbing dan mengoreksi sejak awal hingga hasil penelitian ini.
10. Para penguji: **Dr. dr. Muh. Ilyas, Sp.PD, KP, Sp.P(K), Prof. Dr. dr. Syakib Bakri, SpPD-KGH, Dr. dr. Hasyim Kasim, Sp.PD-KGH, Dr. dr. Sahyuddin Saleh, Sp.PD-KHOM, dr. Asvin Nurulita, Sp.PK(K), dan Dr. dr. Arifin Seweng, MP.**
11. Para Direktur dan Staf Rumah Sakit dimana saya telah bekerja, RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo, RS UNHAS, RS Akademis Jauri, RS Islarn Faisal, RS Stella Maris, RS Ibnu Sina, RS Dayaku Raja Kalimantan Timur, atas segala bantuan fasilitas dan kerjasamanya selama ini.
12. Para pegawai Departemen Ilmu Penyakit Dalam FK-UNHAS : **Pak Udin, Mbak Vira, Tri, Maya, Ayu, dan Pak Aca**, paramedis, dan pekerja pada masing-masing rumah sakit, atas segala bantuan dan kerjasamanya selama ini.
13. Kepada teman-teman **Angkatan Januari 2017** atas jalinan persaudaraan, bantuan dan dukungan kalian memberikan semangat dalam menempuh pendidikan di Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin

14. Kepada seluruh teman sejawat para peserta PPDS-1 Ilmu penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin atas bantuan, jalinan persaudaraan dan kerjasamanya selama ini.

Pada saat yang berbahagia ini, saya tidak lupa menyampaikan rasa hormat dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada **orangtua saya Darmadji dan Boedi Tasik Wulan, saudara saya Muh. Kurniawan, istri saya Aisyah, anak saya Arsyila Putri Ramadhani, mertua saya Syamsuri Said dan St. Ulwiyah**, atas kasih sayang, dukungan, bantuan dan doa agar saya dapat menjadi manusia yang bermanfaat. Serta seluruh keluarga besar atas segala dukungan, bantuan dan doanya selama saya mengikuti pendidikan ini.

Akhir kata semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi kita semua dan kiranya Tuhan Yang Maha Esa selalu melimpahkan rahmat dan petunjuk-Nya kepada kita semua, amin.

Makassar, 25 Mei 2021

Wisnu Adryanto

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
ABSTRAK	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
I.3.1 Tujuan Umum.....	3
I.3.2 Tujuan Khusus.....	4
I.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Klinis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Gambaran Umum COVID-19.....	5
II.1.1 Definisi dan Epidemiologi	5
II.1.2 Etiologi dan Penularan	6
II.1.3 Siklus Hidup SARS-CoV-2.....	9
II.1.4 Patomekanisme COVID-19 dan Hubungannya dengan Severitas Gejala Klinis.....	12
II.1.5 Manifestasi Klinis dan Diagnosis	15
II.2 Gambaran Umum PCR.....	19
II.3 Hubungan <i>CT-value</i> dengan <i>Viral Load</i>	24

BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	28
III.1 Kerangka Teori	28
III.2 Kerangka Konsep	29
III.3 Hipotesis	29
BAB IV METODE PENELITIAN	30
IV.1 Rancangan Penelitian	30
IV.2 Tempat dan Waktu Penelitian	30
IV.3 Populasi dan Sampel Penelitian	30
IV.3.1 Populasi Penelitian	30
IV.3.2 Sampel Penelitian	31
IV.4 Metode Pengumpulan Sampel	31
IV.5 Izin Penelitian dan Kelayakan Etik	32
IV.6 Definisi Operasional Penelitian	32
IV.6.1 Karakteristik Demografi	32
IV.6.2 Manifestasi Klinis	33
IV.6.3 Penyakit Komorbid	34
IV.6.4 <i>CT-value</i>	34
IV.9 Analisis Data	35
IV.10 Alur Penelitian	35
BAB V HASIL PENELITIAN.....	36
V.1 Gambaran Umum Sampel Penelitian	36
V.2 Hubungan <i>CT-value</i> dengan Severitas Gejala Klinis COVID-19.....	37
V.3 Analisis Multivariat Variabel terhadap Severitas Gejala Klinis	40
BAB VI PEMBAHASAN.....	43
BAB VII PENUTUP	52
VII.1 Ringkasan	52
VII.2 Kesimpulan	53
VII.3 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	xv

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur <i>Coronavirus</i>	7
Gambar 2.2. Gambaran Mikroskopis SARS-CoV-2	8
Gambar 2.3. Siklus Replikasi SARS-CoV-2.....	10
Gambar 2.4. Klasifikasi Tahapan Penyakit COVID-19.....	12
Gambar 2.5. Perbandingan Prosedur PCR Konvensional dan PCR <i>Real Time</i>	20
Gambar 2.6. Prinsip Umum dan Pelaksanaan PCR	22
Gambar 2.7. Hubungan <i>CT-value</i> dengan Jumlah <i>Copy</i> DNA Awal	25
Gambar 2.8. Siklus PCR dan Fluoresensi	26
Gambar 4.1 Alur Penelitian	35
Gambar 5.1 Perbandingan <i>CT-value</i> Berdasarkan Severitas Gejala Klinis	38
Gambar 5.2 Hubungan <i>CT-value</i> dengan Severitas Gejala Klinis	40

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Statistik Deskriptif Variabel Penelitian	36
Tabel 5.2. Sebaran Kategori Variabel Penelitian	37
Tabel 5.3. Perbandingan <i>CT-value</i> Berdasarkan Severitas Gejala Klinis	38
Tabel 5.4. Hubungan <i>CT-value</i> dengan Severitas Gejala Klinis	39
Tabel 5.5. Sebaran Kategori Variabel Penelitian Berdasarkan Severitas Gejala Klinis.....	41
Tabel 5.6 Analisis Multivariat Variabel terhadap Severitas Gejala Klinis COVID-19.....	42

DAFTAR SINGKATAN

API	: <i>Asymptomatic Patients in the Incubation Period</i>
ACE	: <i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ARDS	: <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
CFR	: <i>Case Fatality Rate</i>
COVID-19	: <i>Coronavirus Disease 2019</i>
CT-value	: <i>Cycle Threshold Value</i>
GGO	: <i>Ground Glass Opacity</i>
ICU	: <i>Intensif Care Unit</i>
MERS	: <i>Middle-East Respiratory Syndrome</i>
NCIP	: <i>Novel Coronavirus-Infected Pneumonia</i>
nCoV-2019	: <i>Novel Coronavirus 2019</i>
NSP	: <i>Non-Structural Protein</i>
ORF	: <i>Open Reading Frame</i>
PHEIC	: <i>Public Health Emergency of International Concern</i>
RdRp	: <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RTC	: <i>Replication-Transcription Complex</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SARS	: <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SARS-CoV-2	: <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>

ABSTRAK

Wisnu Adryanto: Hubungan antara Cycle Threshold (CT) Value dengan Severitas Gejala Klinis Pasien COVID-19 (Dibimbing oleh Erwin Arif)

Latar Belakang: Serangkaian kasus pneumonia dengan penyebab yang tidak diketahui pertama kali dilaporkan di Cina pada Desember 2019 dan telah menyebar ke seluruh dunia, termasuk Indonesia. Tanda dan gejala klinis penyakit *Corona Virus Disease 2019* (COVID-19) sangat beragam, dari asimtomatik hingga berat dan meninggal akibat kegagalan multipel organ. Diagnosis COVID-19 ditentukan oleh *Real Time Reverse Transcriptase PCR* (RT-PCR) dengan *Cycle Threshold* (CT) *value* yang berbanding terbalik dengan *viral load*. Hubungan antara *viral load* dan tingkat keparahan gejala klinis masih kontradiktif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan *CT-value* dengan severitas gejala klinis pasien COVID-19 pada saat datang ke rumah sakit.

Metode: Penelitian dilakukan di dua rumah sakit di Makassar: RS Wahidin Sudirohusodo dan RS Universitas Hasanuddin. Rekam medis yang memenuhi kriteria penelitian dimasukkan dalam penelitian ini. Data *CT-value* dikumpulkan dan dibandingkan diantara berbagai derajat severitas gejala klinis yang berbeda. Uji statistik yang digunakan adalah uji *Anova* dan *chi-square*. Analisis multivariat dilakukan dengan menggunakan regresi logistik multinomial.

Hasil: Rerata *CT-value* secara signifikan lebih rendah pada kelompok gejala berat dan lebih tinggi pada kelompok gejala ringan ($p < 0.05$). Jenis kelamin, usia, komorbid, dan gambaran radiologi juga berhubungan dengan severitas (masing-masing nilai $p < 0.01$) dan kemudian dilanjutkan ke analisis multivariat dengan hasil variabel yang berhubungan secara signifikan dengan severitas gejala klinis adalah gambaran radiologi ($p < 0.001$), komorbid ($p < 0.01$), dan *CT-value* ($p < 0.05$).

Kesimpulan: *CT-value* secara signifikan memiliki korelasi negatif dengan severitas gejala klinis pasien COVID-19 pada saat datang ke rumah sakit.

Kata Kunci: *COVID-19, CT-value, Severitas, Viral Load*

ABSTRACT

Wisnu Adryanto: *Correlation between Cycle Threshold (CT) Value with Severity of Clinical Symptoms in COVID-19 Patients (Supervised by Erwin Arif)*

Background: A cluster of pneumonia cases of unknown cause was first reported in China in December 2019, and has spread worldwide, include Indonesia. The clinical signs and symptoms of *Corona Vurus Disease 2019* (COVID-19) are very diverse, from asymptomatic to severe, and died from multiple organ failure. The diagnosis of COVID-19 is determined by Real Time Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) with Cycle Threshold (CT) value which is inversely related to viral load. Relationship between viral load and severity of clinical symptom remained unclear. This study aimed to determine the correlation between CT value with severity of clinical symptoms in COVID-19 patients at the time of admission.

Methods: The study was conducted in two hospitals in Makassar: Wahidin Sudirohusodo Hospital and Hasanuddin University Hospital. Medical records which met the study criteria were included in this study. CT value data was collected and compared among different clinical symptom severity. The statistical tests used were *Anova* and *Chi Square* test. A multivariate analysis was conducted using multinomial logistic regression.

Results: The mean CT value was significantly lower in severe group and higher in mild group ($p < 0.05$). We also found a significant correlation between gender, age, comorbidities, and radiological features with the severity of clinical symptom (each $p < 0.01$) and proceed to the multivariate analysis. The variables which significantly related to severity were the radiological features of pneumonia ($p < 0.001$), comorbidities ($p < 0.01$), and CT value ($p < 0.05$).

Conclusions: The CT value has significant negative correlation with the severity of clinical symptoms in COVID-19 patients at the time of admission.

Keywords: *COVID-19, CT-value, Severity, Viral Load*

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Serangkaian kasus pneumonia dengan penyebab yang tidak diketahui muncul di Wuhan, Cina, pada Desember 2019 dengan presentasi klinis sangat menyerupai pneumonia virus.¹ Analisa mendalam dari sampel saluran pernapasan bagian bawah menunjukkan *Novel Coronavirus*, yang diberi nama *Novel Coronavirus 2019* (nCoV-2019, sekarang dikenal sebagai *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* [SARS-CoV-2]).^{2,3,4} Pada Februari 2020, *World Health Organization* (WHO) memberi nama penyakitnya sebagai *Corona Virus Disease 2019* (COVID-19).⁵ Wabah tersebut terus menyebar ke seluruh daratan Cina dan negara lainnya, termasuk Indonesia, dengan jumlah korban jiwa yang terus meningkat.⁶ Spektrum klinis penyakit COVID-19 berkisar dari kondisi asimtomatik hingga berat. Walaupun mayoritas pasien COVID-19 sembuh total, 5,0% pasien dirawat di *Intensif Care Unit* (ICU), selain itu sebagian besar pasien saat ini semakin banyak yang mengalami komplikasi kesehatan jangka panjang.^{7,8}

Infeksi SARS-CoV-2 lebih menular dibandingkan dengan virus SARS sebelumnya dan telah berkembang menjadi pandemi. Hingga saat ini, lebih dari seratus juta orang di dunia telah terkonfirmasi COVID-19 di lebih dari 210 negara, dengan lebih dari dua juta angka kematian.^{9,10} Indonesia melaporkan kasus pertama COVID-19 pada 2 Maret 2020 dan terus meningkat serta menyebar ke seluruh daerah hingga saat ini.^{6,11} Hingga 22 April 2021 dilaporkan kasus terkonfirmasi mencapai 1.626.812 kasus dengan angka kematian sebanyak 44.172 kasus.¹² Di Provinsi Sulawesi Selatan, total kasus terkonfirmasi pada 23 April 2021 mencapai 61.327 kasus dengan angka kematian sebanyak 930 kasus. Tingginya angka morbiditas dan mortalitas COVID-19 yang terjadi menggerakkan berbagai pihak untuk berupaya menyelesaikan masalah kesehatan ini.¹³

Pemeriksaan *Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT PCR) digunakan untuk diagnosis infeksi SARS-CoV-2.⁷ *Cycle Threshold* (CT) PCR didefinisikan sebagai jumlah siklus yang diperlukan sinyal fluoresen untuk melewati ambang batas (*threshold*).¹⁴ Spesimen *swab nasofaring* dan *orofaring* yang diambil dan terkonfirmasi positif melalui RT-PCR sebagai COVID-19 dengan *CT-value* rendah menunjukkan tingginya jumlah asam nukleat target dalam sampel (*viral load*).^{14,15} Apakah ada korelasi antara *viral load* dan tingkat keparahan penyakit masih kontradiktif.¹⁶

Liu dkk¹⁷ melaporkan pasien dengan gejala berat secara signifikan memiliki *CT-value* lebih rendah dibandingkan gejala ringan. Begitupun dengan Xia Yu dkk¹⁶ melaporkan adanya hubungan positif antara *viral load*, tingkat severitas penyakit dan risiko progresi penyakit. Adapun Zheng dkk¹⁸ melaporkan *viral load* pada pasien dengan gejala klinis berat secara signifikan lebih tinggi dibandingkan pasien dengan gejala ringan, hal ini menunjukkan *viral load* yang tinggi mungkin menjadi faktor resiko terhadap keparahan penyakit dan dapat digunakan untuk menilai prognosis. Selain itu, penelitian Chen dkk⁹ menyimpulkan adanya RNA virus pada darah dan *swab* anal berkorelasi positif dengan derajat keparahan penyakit serta monitoring dini RNA virus pada darah, saluran pernapasan dan pencernaan mungkin bermanfaat untuk memprediksi penyakit. Namun berbeda dengan keempat penelitian sebelumnya, penelitian yang dilakukan oleh Shah dkk¹⁹ melaporkan tidak ada perbedaan *CT-value* antara pasien bergejala berat dengan yang bergejala ringan.

Berdasarkan penjelasan di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian mengenai hubungan *CT-value* SARS-CoV-2 dengan severitas gejala klinis COVID-19 di Makassar. Dengan dilakukannya penelitian ini, diharapkan dapat memberikan

tambahan informasi tentang hubungan *CT-value* dengan severitas gejala klinis COVID-19 sebagai salah satu upaya dalam penanganan COVID-19.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, maka rumusan masalah yang dikemukakan:

- Bagaimana hubungan antara *CT-value* dengan severitas gejala klinis pada pasien COVID-19?

I.3 Tujuan Penelitian

I.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui hubungan antara *CT-value* dengan severitas gejala klinis pasien COVID-19.

I.3.2 Tujuan Khusus

Adapun tujuan khusus penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui rerata *CT-value* pada berbagai derajat severitas gejala klinis COVID-19
2. Mengetahui peranan faktor perancu (jenis kelamin, usia, komorbid) dan gambaran radiologi terhadap severitas gejala klinis COVID-19

I.4 Manfaat Penelitian

I.4.1 Manfaat Akademik

Dengan dilakukannya penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi apakah *CT-value* dapat memberi gambaran derajat severitas gejala klinis COVID-19, agar dapat dijadikan acuan untuk penelitian lebih lanjut.

I.4.2 Manfaat Klinis

Dengan mengetahui hubungan *CT-value* dengan severitas gejala klinis pasien COVID-19, diharapkan selain sebagai diagnostik, juga dapat memberikan tambahan informasi tentang COVID-19 untuk mengoptimalkan penanganan pasien COVID-19 sebagai salah satu upaya dalam penanganan COVID-19.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Gambaran Umum COVID-19

II.1.1 Definisi dan Epidemiologi COVID-19

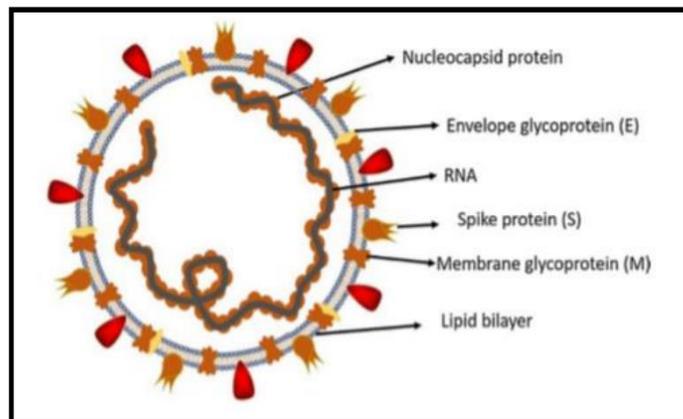
Virus SARS-CoV-2 merupakan *Coronavirus* jenis baru yang belum pernah diidentifikasi sebelumnya pada manusia. Penyakit ini diawali dengan munculnya kasus pneumonia yang tidak diketahui etiologinya pada akhir Desember 2019 di Wuhan, Provinsi Hubei, Cina. Berdasarkan hasil penyelidikan epidemiologi, kasus tersebut diduga berhubungan dengan Pasar *Seafood* di Wuhan. Pada 7 Januari 2020, China mengidentifikasi kasus tersebut sebagai jenis baru *Coronavirus*. Pada 30 Januari 2020 WHO menetapkan kejadian tersebut sebagai Kedaruratan Kesehatan Masyarakat yang Meresahkan Dunia (KKMMD)/*Public Health Emergency of International Concern* (PHEIC) dan pada 11 Maret 2020 WHO sudah menetapkan COVID-19 sebagai pandemi. Sampai dengan 30 Juni 2020 Kementerian Kesehatan melaporkan CFR 5,1%. Sebanyak 51,5% kasus terjadi pada laki-laki. Kasus paling banyak terjadi pada rentang usia 45-54 tahun dan paling sedikit terjadi pada usia 0-5 tahun. Angka kematian tertinggi ditemukan pada pasien dengan usia 55-64 tahun.¹¹

II.1.2 Etiologi dan Penularan SARS-CoV-2

Coronavirus adalah virus genom RNA untai positif berbentuk bundar dengan beberapa pleomorfik (panjang~26-32 kb/diameter 60-140 nm), berkapsul, tidak bersegmen, dan *crown-like appearance* di bawah mikroskop elektron karena adanya tonjolan glikoprotein pada *envelope*. Virus ini termasuk dalam *family Coronaviridae*, *subfamily Orthocoronavirinae*, *ordo Nidovirales*, dan diklasifikasikan menjadi empat genus: *AlphaCoronaviruses (a-CoV)*, *BetaCoronaviruses (b-CoV)*, *GammaCoronaviruses (g-CoV)*, dan *DeltaCoronaviruses (d-CoV)*. *Coronavirus* yang menjadi etiologi COVID-19 termasuk dalam genus *b-CoV*.^{1,11,20,21}

Virus SARS-CoV-2 berasal dari garis keturunan yang sama (tetapi berbeda secara genetik) dari *Coronavirus* yang menyebabkan *Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)*.² *Coronavirus* adalah virus genom RNA untai positif dengan *envelope* tanpa segmen yang termasuk dalam *family Coronaviridae*, *subfamily Orthocoronavirinae* dan *ordo Nidovirales*.^{1,6} Terdapat kemiripan fitur klinis antara SARS-CoV-2 dan infeksi *betaCoronavirus* sebelumnya, diantaranya kebanyakan pasien datang dengan demam, kering batuk, sesak, dan *ground-glass opacities* bilateral pada *CT scan thorax*. Fitur-fitur infeksi SARS-CoV-2 ini memiliki kemiripan dengan infeksi SARS-CoV dan MERS-CoV. Namun, hanya sedikit pasien dengan infeksi SARS-CoV-2 memiliki tanda dan gejala saluran pernapasan atas yang menonjol (seperti rinorea, bersin, atau nyeri tenggorokan), yang mengindikasikan sel target mungkin berada di saluran napas bagian bawah.¹

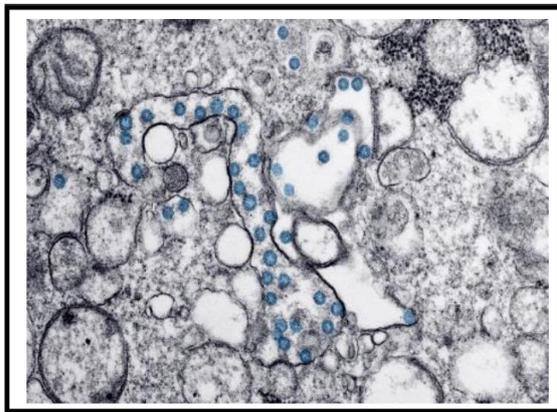
Terdapat 4 struktur protein utama pada *Coronavirus* yaitu: glikoprotein spike S (*spike*), protein E (*envelope*), glikoprotein M (*membrane*), dan protein N (nukleokapsid), serta beberapa protein non-struktural dan beberapa protein aksesori unik.^{11,20} Genom dikemas di dalam kapsid heliks yang dibentuk oleh protein nukleokapsid (N) dan selanjutnya dikelilingi oleh *envelope*. Terkait dengan *envelope* virus, terdapat minimal tiga protein struktural: Protein M dan protein E yang terlibat dalam perakitan virus, sedangkan protein *spike* (S) memediasi masuknya virus ke dalam sel inang. Beberapa *Coronavirus* juga mengkode protein Hemagglutinin-Esterase (HE) yang berhubungan dengan *envelope*. Di antara protein struktural ini, protein *spike* membentuk protrusi besar dari permukaan virus yang memberi penampilan *Coronavirus* memiliki mahkota (*crown*), karena itulah namanya *Corona* yang dalam bahasa Latin berarti mahkota. Selain memediasi masuknya virus, protein *spike* merupakan penentu kritis dari kisaran *host* virus dan tropisme jaringan serta penginduksi mayor respons imun inang.²⁰



Gambar 2.1. Struktur *Coronavirus*¹¹

Coronavirus menginfeksi manusia dan berbagai spesies unggas dan mamalia di seluruh dunia. Ada enam *Coronavirus* yang diketahui menginfeksi manusia, termasuk dua a-CoV (229E dan NL63) dan empat b-

CoV (OC43, HKU1, SARS-CoV, dan MERS-CoV).²⁰ SARS-CoV-2 berasal dari *family* yang sama dengan virus penyebab SARS dan MERS. Atas dasar ini, *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) memberikan nama penyebab COVID-19 sebagai SARS-CoV-2. Meskipun berasal dari *family* yang sama, namun SARS-CoV-2 lebih menular dibandingkan dengan SARS-CoV dan MERS-CoV.¹¹



Gambar 2.2. Gambaran Mikroskopis SARS-CoV-2¹¹

Belum dipastikan berapa lama virus penyebab COVID-19 bertahan di atas permukaan, tetapi perilaku virus ini menyerupai jenis-jenis *Coronavirus* lainnya. Lamanya *Coronavirus* bertahan mungkin dipengaruhi kondisi-kondisi yang berbeda (seperti jenis permukaan, suhu atau kelembapan lingkungan). Penelitian Doremalen et al menunjukkan bahwa SARS-CoV-2 dapat bertahan selama 72 jam pada permukaan plastik dan *stainless steel*, kurang dari 4 jam pada tembaga dan kurang dari 24 jam pada kardus. Seperti *Coronavirus* lain, SARS-CoV-2 sensitif terhadap sinar ultraviolet dan panas. Efektif dapat dinonaktifkan dengan pelarut lemak (*lipid solvents*) seperti

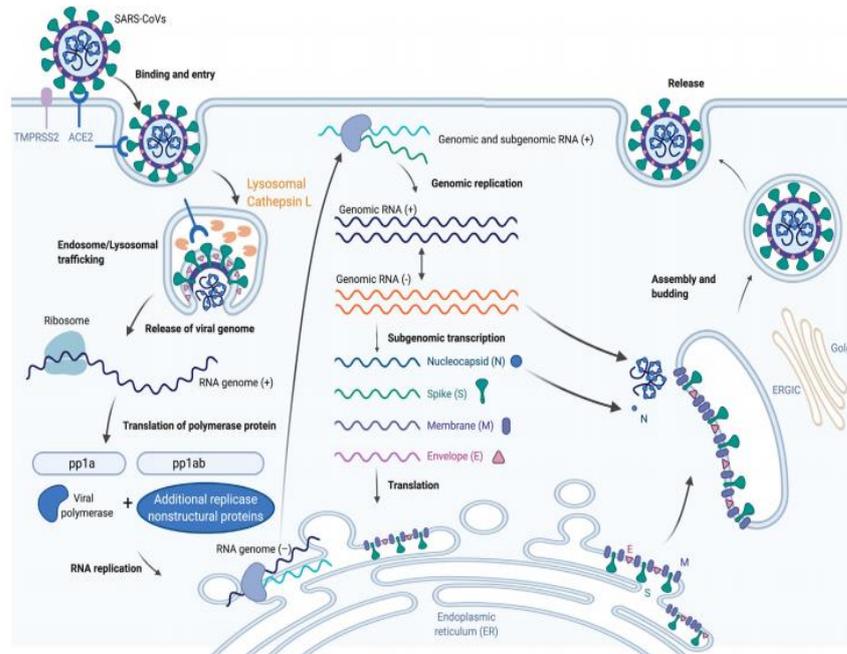
eter, *ethanol* 75%, *ethanol*, disinfektan yang mengandung klorin, asam peroksiasetat, dan *chloroform* (kecuali *chlorhexidine*).¹¹

Coronavirus merupakan zoonosis (ditularkan antara hewan dan manusia). Adapun hewan yang menjadi sumber penularan COVID-19 ini masih belum diketahui.¹¹ Namun, COVID-19 kemungkinan besar dikembangkan dari *Coronavirus* yang berasal dari kelelawar. Sebagian bukti lain yang mendukung COVID-19 berasal dari kelelawar adalah adanya homologi tingkat tinggi dari reseptor *Angiotensin Converting Enzyme-2* (ACE2) dari beragam spesies hewan, sehingga melibatkan spesies hewan ini sebagai inang perantara yang memungkinkan atau model hewan untuk COVID-19.²² Selain itu, virus-virus ini memiliki *Open Reading Frame* (ORF) tunggal pada gen 8, yang merupakan indikator lebih lanjut dari *Coronavirus* yang berasal dari kelelawar. Namun, urutan asam amino dari domain pengikatan reseptor tentatif menyerupai SARS-CoV, menunjukkan bahwa virus ini mungkin menggunakan reseptor yang sama.²³

II.1.3 Siklus Hidup SARS-CoV-2

Siklus hidup virus SARS-CoV-2 terdiri dari 5 langkah yaitu perlekatan, penetrasi, biosintesis, maturasi dan pelepasan. Ketika virus berikatan dengan reseptor *host* (perlekatan), virus memasuki sel *host* melalui endositosis atau fusi membran (penetrasi). Ketika kandungan virus dilepaskan ke dalam sel *host*, RNA virus memasuki sitoplasma untuk replikasi. MRNA virus digunakan untuk membuat protein virus

(biosintesis). Kemudian partikel virus baru dibuat (maturasi) dan dilepaskan.²⁴



Gambar 2.3. Siklus Replikasi SARS-CoV-2²⁴

Virus SARS-CoV-2 dapat menyerang sel dengan dua cara, baik melalui endosom maupun melalui fusi membran plasma. Dalam kedua cara tersebut, protein *spike* (S1, S2) dari SARS-CoV-2 merupakan determinan yang signifikan dalam masuknya virus ke dalam sel pejamu, dimana protein tersebut memediasi perlekatan ke membran sel *host* dan melibatkan ACE2 sebagai reseptor masuk. Glikoprotein yang terdapat pada *spike* pembungkus virus akan berikatan dengan reseptor selular ACE2.^{22,25} Ikatan yang terbentuk sepuluh kali lebih kuat dibandingkan SARS-CoV.²⁶ Namun, adhesi virus dapat dihambat oleh Griffithsin (Inhibitor III) yang mengikat glikoprotein *spike* dan heparin eksogen. Ketika virion diambil secara

endositosis, cathepsin L mengaktifkan protein *spike*. Namun, protease sistein yang *pH-dependent* dapat diblokir oleh agen lisosomotropik, seperti Bafilomycin A1 atau Amonium Klorida.²⁵

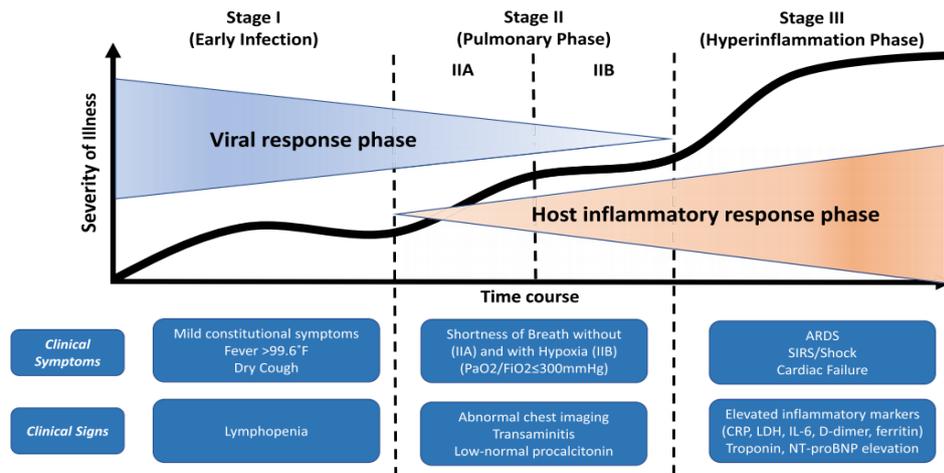
Sebagai alternatif, protein *spike* dapat dibelah antara domain S1 dan S2 oleh protease serin seluler *Transmembrane Serine Protease 2* (TMPRSS2) di dekat reseptor ACE2, yang menginisiasi fusi membran virus dengan membran plasma dan memfasilitasi masuknya virus ke dalam tubuh *host*.²⁷ Pada proses ini, protein S2 berperan penting dalam proses pembelahan proteolitik yang memediasi terjadinya proses fusi membran.^{22,24} Fusi membran plasma lebih kecil kemungkinannya untuk memicu imunitas antivirus sel *host* sehingga lebih efisien untuk replikasi virus.²⁵ SARS-CoV-2 yang berikatan dengan reseptor-reseptor akan membuat jalan masuk ke dalam sel.²²

Sama dengan SARS-CoV, pada SARS-CoV-2 setelah masuk ke dalam sel, genom RNA virus akan dilepaskan ke sitoplasma sel dan ditranslasikan menjadi dua poliprotein, yakni poliprotein 1a/1ab (pp1a/pp1ab), dan protein struktural.^{22,27,28} Proses transkripsi pada sintesis pp1a/pp1ab berlangsung melalui kompleks replikasi-transkripsi (RTC) di vesikel membran ganda dan juga berlangsung melalui sintesis rangkaian RNA subgenomik.²⁷ Selanjutnya, genom virus akan mulai untuk bereplikasi.²² Genom RNA *Coronavirus* mengkode protein nonstruktural (NSP) yang memiliki peran penting dalam sintesis RNA virus, dan protein struktural yang penting untuk perakitan virion. Poliprotein pp1a dan pp1ab ditranslasikan untuk

membentuk NSP fungsional sebagai Helikase atau kompleks replikasi-transkriptase RNA (RdRp). RdRp bertanggung jawab untuk replikasi protein struktural RNA. Protein struktural S1, S2, E dan M ditranslasi oleh ribosom yang terikat pada Retikulum Endoplasma dan disajikan pada permukaannya sebagai persiapan perakitan viron.²⁹ Protein N tetap berada dalam sitoplasma yang dirakit/tersusun dari genom RNA dan protein nukleokapsid. Pada tahap akhir, vesikel yang mengandung partikel virus akan bergabung dengan membran plasma yang diangkut dari RE melalui Aparatus Golgi ke permukaan sel melalui vesikula kecil untuk melepaskan komponen virus yang baru.^{22,25} Virion kemudian dilepaskan dari sel yang terinfeksi melalui eksositosis dan mencari sel *host* lain.^{22,26}

II.1.4 Patomekanisme COVID-19 dan Hubungannya dengan Severitas Gejala Klinis

Periode inkubasi untuk COVID19 antara 3-14 hari. Virus dapat melewati membran mukosa, terutama mukosa *nasal* dan *laring*, kemudian menembus selaput lendir dan memasuki paru. Virus dapat masuk ke aliran darah tepi dari paru yang menyebabkan viremia.^{27,30}



Gambar 2.4. Klasifikasi Tahapan Penyakit COVID-19³¹

II.1.4.1 Stadium 1 (Tahap Awal)

Di tahap ini virus menginfeksi sel *nasal* yang kemudian terjadi penyebaran virus secara lokal dan menginisiasi respon imun bawaan sehingga menimbulkan respon inflamasi minor.³² Selama periode tahap awal infeksi dan masih stadium ringan, SARS-CoV-2 bereplikasi pada *host* dengan fokus pada sistem pernapasan, ditandai dengan kadar leukosit dan limfosit yang masih normal atau sedikit menurun, serta pasien belum merasakan gejala. Pada pasien yang dapat mempertahankan replikasi virus tetap terbatas, tahap ini memiliki prognosis dan pemulihan sangat baik. Selanjutnya, virus mulai menyebar, terutama menuju ke organ yang mengekspresikan ACE2 dan pasien mulai merasakan gejala ringan.^{27,31}

II.1.4.2 Stadium II

Pada tahap ini sudah terjadi keterlibatan paru yang mengaktifasi respon imun innate lebih lanjut. Terjadi multiplikasi virus dan inflamasi yang

terlokalisasi di dalam paru. Sel-sel epitel yang terinfeksi virus akan mengeluarkan interferon β dan γ , sementara sel-sel imunitas bawaan akan mengeluarkan CXCL10 dan berbagai sitokin pro-inflammasi lainnya.. Selama tahap ini pasien mengalami pneumonia dengan manifestasi klinis ringan dan hanya terbatas pada saluran napas, seperti batuk dan demam.³¹

II.1.4.3 Stadium III

Pada stadium ini virus mencapai unit pertukaran gas paru dan menginfeksi sel alveolar tipe II (terutama yang berlokasi di perifer dan subpleura). Virus SARS-CoV-2 bereplikasi dalam sel alveolar tipe II, mengeluarkan partikel virus lebih banyak, serta menginduksi terjadinya apoptosis dan kematian sel; menyebabkan terjadi kerusakan sel alveolar secara difus. Adanya penyimpangan *wound healing* pada jaringan yang rusak menyebabkan terbentuknya jaringan parut dan fibrosis yang berat pada jaringan paru. Ketidakseimbangan ventilasi perfusi dan perubahan membran alveoli menyebabkan gangguan pertukaran gas.²⁶ Pada stadium ini juga terjadi hiperinflamasi sistemik, terjadi penurunan jumlah sel T-helper, sel T-supressor, dan sel T-regulator, serta peningkatan sitokin dan biomarker inflamasi secara signifikan yang memperparah kerusakan destruktif jaringan melalui disfungsi endotel dan vasodilatasi, karena infeksi dari virus mampu memproduksi reaksi imun yang berlebihan pada *host*.²⁷ Pada tahap ini syok, vasoplegia, gagal napas, dan bahkan kolaps kardiopulmoner dapat terjadi.³¹ Jika proses inflamasi ini terus terjadi, dapat berakhir pada nekrosis, fibrosis, dan penebalan membrane hialin.³¹ Sehingga walaupun virus berhasil dieradikasi, kerusakan paru bersifat *irreversible*.²⁷

II.1.5 Manifestasi Klinis dan Diagnosis

Gejala infeksi COVID-19 muncul setelah masa inkubasi sekitar 5-6 hari (5,2 hari) dengan range antara 1 dan 14 hari namun dapat mencapai 14 hari. Periode dari timbulnya gejala COVID-19 hingga kematian berkisar antara 6 hingga 41 hari dengan median 14 hari. Periode ini tergantung pada usia pasien dan status sistem kekebalan pasien.^{11,23}

Risiko penularan tertinggi diperoleh di hari-hari pertama penyakit disebabkan oleh konsentrasi virus pada sekret yang tinggi. Orang yang terinfeksi dapat langsung menularkan sampai 48 jam sebelum onset gejala (presimptomatik) dan sampai 14 hari setelah onset gejala. Sebuah studi melaporkan bahwa 12,6% menunjukkan penularan presimptomatik. Penting untuk mengetahui periode presimptomatik karena memungkinkan virus menyebar melalui droplet atau kontak dengan benda yang terkontaminasi. Sebagai tambahan, bahwa terdapat kasus konfirmasi yang tidak bergejala (asimptomatik), meskipun risiko penularan sangat rendah akan tetapi masih ada kemungkinan kecil untuk terjadi penularan. Berdasarkan studi epidemiologi dan virologi saat ini membuktikan bahwa COVID-19 utamanya ditularkan dari orang yang bergejala (simptomatik) ke orang lain yang berada jarak dekat melalui droplet. Droplet merupakan partikel berisi air dengan diameter $>5-10 \mu\text{m}$. Penularan droplet terjadi ketika seseorang berada pada jarak dekat (dalam 1 meter) dengan seseorang yang memiliki gejala pernapasan (misalnya, batuk atau bersin) sehingga droplet berisiko mengenai mukosa (mulut dan hidung) atau konjungtiva (mata). Penularan

juga dapat terjadi melalui benda dan permukaan yang terkontaminasi droplet di sekitar orang yang terinfeksi. Oleh karena itu, penularan virus COVID-19 dapat terjadi melalui kontak langsung dengan orang yang terinfeksi dan kontak tidak langsung dengan permukaan atau benda yang digunakan pada orang yang terinfeksi (misalnya, stetoskop atau termometer). Dalam konteks COVID-19, transmisi melalui udara dapat dimungkinkan dalam keadaan khusus dimana prosedur atau perawatan suportif yang menghasilkan aerosol seperti intubasi endotrakeal, bronkoskopi, *suction* terbuka, pemberian pengobatan nebulisasi, ventilasi manual sebelum intubasi, mengubah pasien ke posisi tengkurap, memutus koneksi ventilator, ventilasi tekanan positif noninvasif, trakeostomi, dan resusitasi kardiopulmoner. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai transmisi melalui udara.¹¹

Gejala-gejala yang dialami biasanya bersifat ringan dan muncul secara bertahap. Beberapa orang yang terinfeksi tidak menunjukkan gejala apapun dan tetap merasa sehat. Gejala COVID-19 yang paling umum adalah demam, rasa lelah, dan batuk kering. Beberapa pasien mungkin mengalami rasa nyeri, hidung tersumbat, pilek, nyeri kepala, konjungtivitis, sakit tenggorokan, diare, hilang penciuman dan pembauan atau ruam kulit.¹¹ Salah satu laporan kasus COVID-19 menunjukkan pasien pada 5 hari demam mengalami batuk, rhonki di kedua paru-paru, dan suhu tubuh 39,0°C. Hasil laboratorium menunjukkan leukopenia dengan jumlah leukosit $2,91 \times 10^9$ sel/L di antaranya 70,0% adalah neutrofil.²³ Menurut data dari negara-negara yang terkena dampak awal pandemi, 40% kasus akan

mengalami penyakit ringan, 40% akan mengalami penyakit sedang termasuk pneumonia, 15% kasus akan mengalami penyakit parah, dan 5% kasus akan mengalami kondisi kritis. Pasien dengan gejala ringan dilaporkan sembuh setelah 1 minggu. Pada kasus berat akan mengalami *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), sepsis dan syok septik, gagal multiorgan, termasuk gagal ginjal atau gagal jantung akut hingga berakibat kematian. Orang lanjut usia (lansia) dan orang dengan kondisi medis yang sudah ada sebelumnya seperti tekanan darah tinggi, gangguan jantung dan paru, diabetes dan kanker berisiko lebih besar mengalami keparahan.¹¹

Gambaran *CT Scan thorax* berupa pneumonia dan *ground-glass opacities* yang menyebabkan kematian. Dalam beberapa kasus, *ground-glass opacities* diamati di daerah subpleural kedua paru yang kemungkinan menginduksi respon imun sistemik dan lokal yang menyebabkan peningkatan peradangan. Selain itu, berdasarkan hasil dari radiografi dada, beberapa kasus menunjukkan infiltrat di lobus atas paru-paru yang berhubungan dengan peningkatan dispnea dan hipoksemia.²³

Pasien yang terinfeksi COVID-19 menunjukkan jumlah leukosit yang lebih tinggi dan peningkatan kadar sitokin pro-inflamasi di plasma. Kadar sitokin dan kemokin dalam darah yang sangat tinggi tercatat pada pasien dengan infeksi COVID-19 diantaranya IL1- β , IL1RA, IL7, IL8, IL9, IL10, FGF2, GCSF, GMCSF, IFN γ , IP10, MCP1, MIP1 α , MIP1 β , PDGFB, TNF α , dan VEGFA. Beberapa kasus berat yang dirawat ICU menunjukkan sitokin

proinflamasi yang tinggi diantaranya IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1 α , dan TNF α yang meningkatkan keparahan penyakit.²³

Berdasarkan beratnya kasus, COVID-19 dibedakan menjadi tanpa gejala/asimptomatik, ringan, sedang, berat dan kritis.

II.1.3.1 Tanpa gejala/Asimptomatik

Kondisi ini merupakan kondisi paling ringan, dimana hasil RT-PCR positif, tanpa disertai tanda dan gejala klinis.³³

II.1.3.2 Ringan

Pasien dengan gejala tidak khas dan tanpa adanya bukti pneumonia virus maupun hipoksia. Pasien dengan infeksi virus saluran napas atas dengan gejala tidak spesifik, seperti demam, batuk (dengan atau tanpa sputum), fatigue, anoreksia, napas pendek, myalgia, malaise. Gejala tidak spesifik lainnya seperti sakit tenggorokan, kongesti hidung, sakit kepala, diare, mual dan muntah, hilang pembau (*anosmia*) atau hilang perasa (*ageusia*) yang muncul sebelum onset gejala pernapasan juga sering dilaporkan.³⁴

II.1.3.3 Sedang/Moderat

Pasien dengan tanda klinis pneumonia (demam, batuk, napas cepat) tetapi tidak ada tanda pneumonia berat, termasuk SpO₂>93% dengan udara ruangan dan tidak butuh bantuan oksigen.^{33,34}

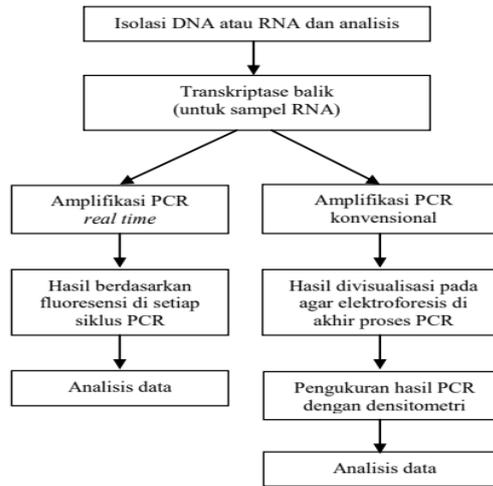
II.1.3.4 Berat/Pneumonia Berat

Pasien dengan tanda klinis pneumonia berat (demam, batuk, sesak, napas cepat) disertai satu dari tanda: frekuensi napas >30x/menit, distress pernapasan berat, atau SpO₂ <93% pada udara ruangan.^{33,34}

II.2 Gambaran Umum PCR

Pemeriksaan PCR merupakan salah satu teknik amplifikasi asam nukleat in vitro yang paling banyak dipelajari dan digunakan secara luas. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Prinsip dasar PCR adalah sekuen DNA spesifik diamplifikasi menjadi dua kopi selanjutnya menjadi empat kopi dan seterusnya. PCR digunakan untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan menganalisis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target melalui enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu *thermocycle*. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam.^{35,36,37}

Metode PCR dibedakan menjadi dua yaitu PCR konvensional dan *real time*. Analisis hasil amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional dilakukan dengan visualisasi di agar elektroforesis. Sedangkan *real time* PCR jumlah DNA yang diamplifikasi dapat dideteksi dan diukur di setiap siklus proses PCR. Perbandingan prosedur antara PCR konvensional dan *real time* PCR secara singkat dapat dilihat pada Gambar 2.5.³⁷



Gambar 2.5. Perbandingan Prosedur PCR Konvensional dan *Real Time PCR*³⁷

Jumlah amplifikasi fragmen DNA pada PCR konvensional divisualisasikan dengan menggunakan agar elektroforesis. Penandaan fragmen DNA dengan *fluorescent dye* dan intensitas pita DNA dapat diukur dengan menggunakan mesin digital densitometri. Hal ini berbeda pada *real time PCR*, jumlah DNA diukur di setiap siklus proses amplifikasi PCR terutama pada fase eksponensial. Deteksi akumulasi amplifikasi DNA pada *real time PCR* menggunakan *probe DNA fluorescent*. Walaupun demikian, analisis data hasil kedua prosedur tersebut baik PCR konvensional maupun *real time* memerlukan normalisasi data terhadap acuan yang diketahui untuk menentukan kualitas awal ekspresi target gen.³⁷

Disamping memiliki sensitivitas lebih tinggi, kelebihan pengujian *real time PCR* jika dibandingkan dengan PCR konvensional adalah lebih dinamis, risiko kontaminasi silang lebih sedikit, kemampuan aplikasi penggunaannya untuk pengujian lebih banyak. *Real time PCR* tepat untuk berbagai aplikasi seperti analisis ekspresi gen, penentuan jumlah virus, deteksi organisme yang mengalami mutasi genetik, diskriminasi alel dan genotipe *Single Nucleotide Polymorphisms*

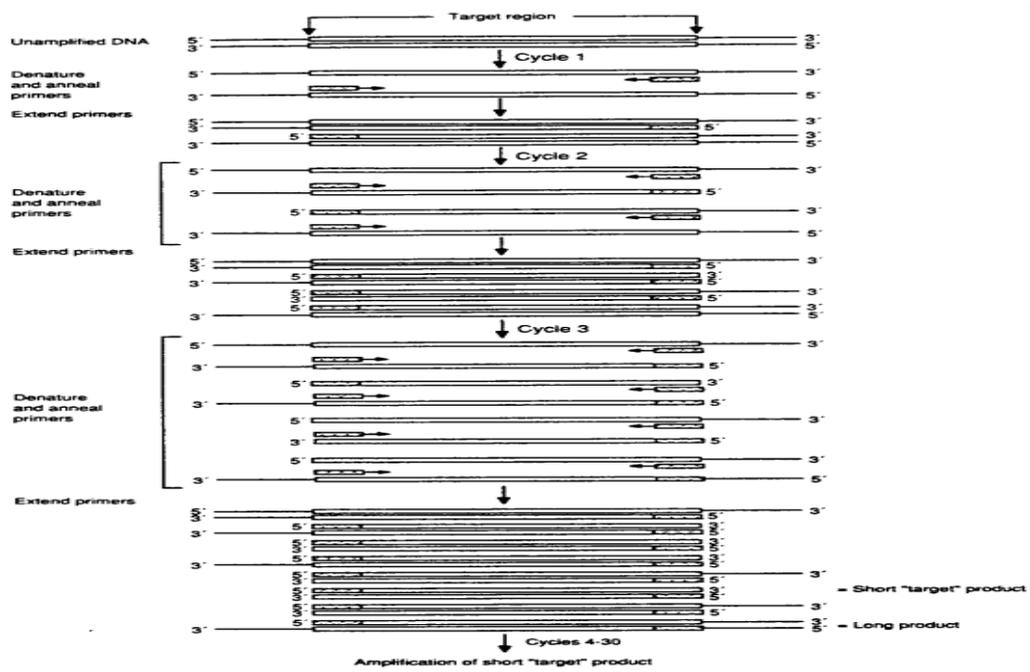
(SNP). Penggunaan probe yang spesifik membantu peningkatan spesifisitas pada pengujian *real time* PCR jika dibandingkan dengan pengujian PCR konvensional.³⁷

Real-Time quantitative PCR merupakan penghitungan asam nukleat yang sensitif, spesifik, dan reproduksibel. PCR telah merevolusi bidang diagnostik molekul sejak diperkenalkan, dan teknik ini telah digunakan dalam aplikasi yang berkembang sangat pesat.³⁸ RT q-PCR merupakan salah satu metode paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA hingga sekarang. Prinsip kerja q-PCR adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi berdasarkan keberadaan *Reporter Fluorescens*. Sinyal *Fluorescens* akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR (amplikon) dalam reaksi. Peningkatan jumlah amplikon yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi.³⁹

Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah DNA template; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA template; dNTPs (*Deoxynucleotide triphosphates*); *buffer* PCR; magnesium klorida (MgCl₂) dan enzim polimerase DNA.³⁶

Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA *template*; (3) penempelan primer pada templat (*annealing*); (4) pemanjangan primer (*extension*) dan (5) pemantapan (*postextension*). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang

(siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA. Tahapan proses PCR dapat dilihat pada gambar 2.6.³⁶



Gambar 2.6. Prinsip Umum dan Pelaksanaan PCR³⁶

Teknik PCR melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda.³⁶ PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA maupun RNA. Untuk mengamplifikasi RNA, proses PCR didahului dengan *reverse transcriptase* terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul *complementary DNA* (cDNA). Proses PCR untuk mengamplifikasi RNA ini disebut *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Namun tahap ini tidak dilakukan apabila sampel berupa DNA murni.^{35,37}

Selanjutnya adalah denaturasi, yakni pemisahan kedua untai DNA pada temperatur tinggi. DNA akan terdenaturasi pada temperatur 90 hingga 97°C. Pada

teknik PCR, denaturasi optimum terjadi pada temperatur 95°C selama 30 detik.⁴⁰ Untai ganda DNA template (*unamplified* DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA.³⁶ Selanjutnya adalah *annealing*, yakni tahap penempelan primer pada pita DNA yang sesuai, pada suhu 55 hingga 60°C selama 30 detik.⁴⁰ Primer yang berada sebelum daerah target disebut *primer forward* dan yang berada setelah daerah target disebut *primer reverse*.³⁵ Selanjutnya adalah ekstensi oleh enzim DNA polimerase pada suhu 72°C dalam waktu yang disesuaikan dengan panjang atau pendeknya ukuran DNA yang diharapkan sebagai produk amplifikasi.⁴⁰ Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA yang baru dikenal disebut enzim polimerase.³⁵ Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai.³⁶ Umumnya, waktu yang digunakan untuk ekstensi DNA pada PCR yaitu 2 – 3 menit dan dilakukan antara 20 – 40 siklus.^{36,40}

Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier. Jumlah kopi fragmen DNA target (*amplicon*) yang dihasilkan pada akhir siklus PCR dapat dihitung secara teoritis menurut rumus:³⁶

$$Y = (2^n - 2n)X$$

Keterangan:

Y: jumlah *amplicon*

n: jumlah siklus

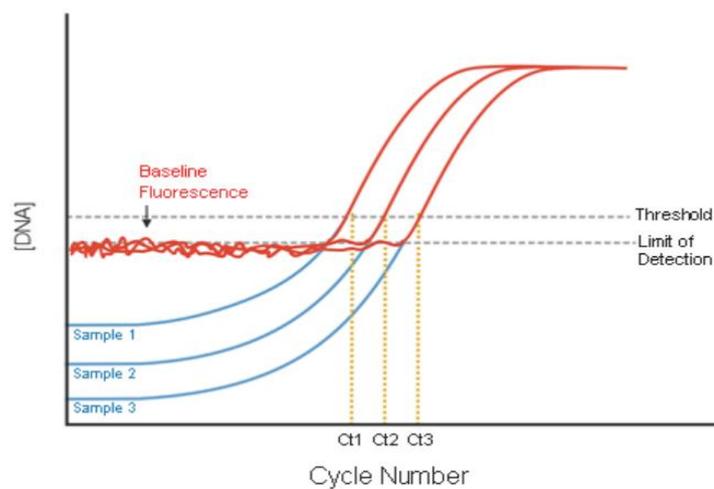
X: jumlah molekul DNA templat semula

Jika $X = 1$ dan jumlah siklus yang digunakan adalah 30, maka jumlah amplicon yang diperoleh pada akhir proses PCR adalah 1.074×10^9 . Dari fenomena ini dapat terlihat bahwa dengan menggunakan teknik PCR dimungkinkan untuk mendapatkan fragmen DNA yang diinginkan (amplicon) secara eksponensial dalam waktu relatif singkat.³⁶

II.3 Hubungan *CT-value* dengan *Viral Load*

Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya amplifikasi DNA PCR dalam reaksi. Reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus. Peningkatan hasil amplifikasi PCR pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi target gen. Makin tinggi tingkat ekspresi target gen maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi. Kuantitas urutan DNA target dicapai dengan menentukan jumlah siklus amplifikasi. Jumlah siklus amplifikasi diperlukan untuk menghasilkan produk PCR berdasarkan fluoresensi di awal fase eksponensial PCR serta untuk melewati garis ambang fluoresensi.³⁷ Jumlah siklus yang diperlukan untuk mencapai ambang batas disebut *cycle threshold* yang merupakan prinsip dasar dari *real time* PCR dan sebagai bagian yang sangat penting untuk memperoleh data yang akurat.³⁷ Semakin banyak template pada awal reaksi, maka semakin sedikit siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk mencapai titik saat sinyal fluoresens terdeteksi lebih tinggi dari ambang batas fluoresens yang ditentukan.³⁹ *CT-value real time* PCR sangat berkorelasi dengan kuantitas urutan DNA target.³⁷ *CT-value* berbanding terbalik dengan jumlah copy awal.⁴¹ Sehingga *CT-value* rendah

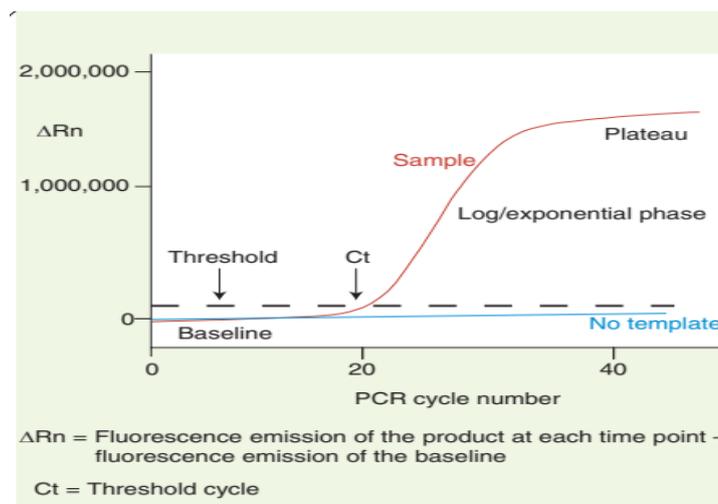
menunjukkan tingginya jumlah asam nukleat target dalam sampel (*viral load*).^{14,15} Apabila kuantitas urutan DNA target tinggi di awal reaksi, *CT-value* akan lebih cepat diketahui. Namun demikian, *CT-value* akan lebih sering ditemukan pada fase eksponensial di setiap siklus amplifikasi PCR. Hal ini yang menjadi alasan utama bahwa *CT-value* lebih mampu mengukur jumlah amplifikasi DNA target dari awal reaksi.³⁷



Gambar 2.7. Hubungan *CT-value* dengan Jumlah *Copy* DNA Awal³⁶

Awalnya, fluoresensi berada pada level dasar dan peningkatan fluoresensi tidak terdeteksi (siklus 1–18, Gambar 2.6) meskipun produk terakumulasi secara eksponensial. Akhirnya, produk yang teramplifikasi cukup terakumulasi untuk menghasilkan sinyal fluoresensi yang dapat dideteksi. Nomor siklus di mana ini terjadi disebut siklus kuantifikasi, atau *Cq*. Karena nilai *Cq* diukur dalam fase eksponensial ketika reagen tidak terbatas, *real time* q-PCR dapat digunakan untuk menghitung secara handal dan akurat jumlah awal template yang ada dalam reaksi berdasarkan fungsi eksponensial yang diketahui menggambarkan kemajuan reaksi.³⁸

Siklus kuantifikasi suatu reaksi ditentukan terutama oleh jumlah template yang ada pada awal reaksi amplifikasi. Jika terdapat sejumlah besar template pada awal reaksi, relatif sedikit siklus amplifikasi akan diperlukan untuk mengakumulasi produk yang cukup untuk memberikan sinyal fluoresensi di atas level dasar. Dengan demikian, reaksi akan memiliki C_q rendah. Sebaliknya, jika terdapat sejumlah kecil template, lebih banyak siklus amplifikasi akan diperlukan untuk sinyal fluoresensi naik di atas level dasar. Dengan demikian, reaksi akan memiliki C_q yang tinggi, atau terlambat. Hubungan ini membentuk dasar untuk aspek kuantitatif real time PCR.³⁸



Gambar 2.8. Siklus PCR dan Fluoresensi³⁸

Dalam plot ini, jumlah siklus PCR ditunjukkan pada sumbu X, dan fluoresensi dari reaksi amplifikasi, yang sebanding dengan jumlah produk yang diperkuat dalam tabung, ditunjukkan pada sumbu Y. Plot amplifikasi menunjukkan dua fase, fase eksponensial diikuti oleh fase plateau/non eksponensial. *CT-value* akan selalu terjadi selama fase eksponensial dari amplifikasi target yang terjadi selama siklus awal PCR dan jumlah produk PCR

sekitar dua kali lipat dalam setiap siklus.³⁸ Penggunaan jumlah siklus lebih dari 30 siklus tidak akan meningkatkan jumlah amplicon secara bermakna. Pada titik ini, reaksi melambat dan memasuki fase non-eksponensial plateau.³⁶ Hal inilah yang menjadi alasan utama mengapa *cycle threshold* merupakan pengukuran yang lebih dapat diandalkan untuk pengukuran jumlah salinan awal dibandingkan pengukuran titik akhir dari jumlah akumulasi produk PCR. Selama fase eksponensial, tidak ada komponen reaksi yang membatasi dan oleh karena itu *CT-value* sangat dapat direproduksi untuk mereplikasi reaksi dengan nomor salinan awal yang sama. Fase plateau terjadi akibat adanya penghambat reaksi polimerase yang ditemukan pada template, keterbatasan reagen atau akumulasi molekul pirofosfat, reaksi PCR akhirnya berhenti menghasilkan template pada tingkat eksponensial yang membuat kuantisasi titik akhir produk PCR tidak dapat diandalkan.³⁸

Hasil pemeriksaan real time PCR dinyatakan positif bila terdapat akumulasi sinyal fluoresens. *CT-value* adalah jumlah siklus yang dibutuhkan sampai sinyal fluoresens melewati ambang (*threshold*). *CT-value* tersebut secara eksponensial berbanding terbalik dengan jumlah target asam nukleat di dalam sampel. Pada umumnya interpretasi *CT-value* adalah:⁴²

- a. *CT-value* <29: positif kuat, terdapat target asam nukleat dalam jumlah banyak
- b. *CT-value* antara 30—37: positif sedang, terdapat target asam nukleat dalam jumlah sedang
- c. *CT-value* antara 38—40: positif lemah, terdapat target asam nukleat dalam jumlah sedikit dan terdapat kemungkinan kontaminasi dari lingkungan.