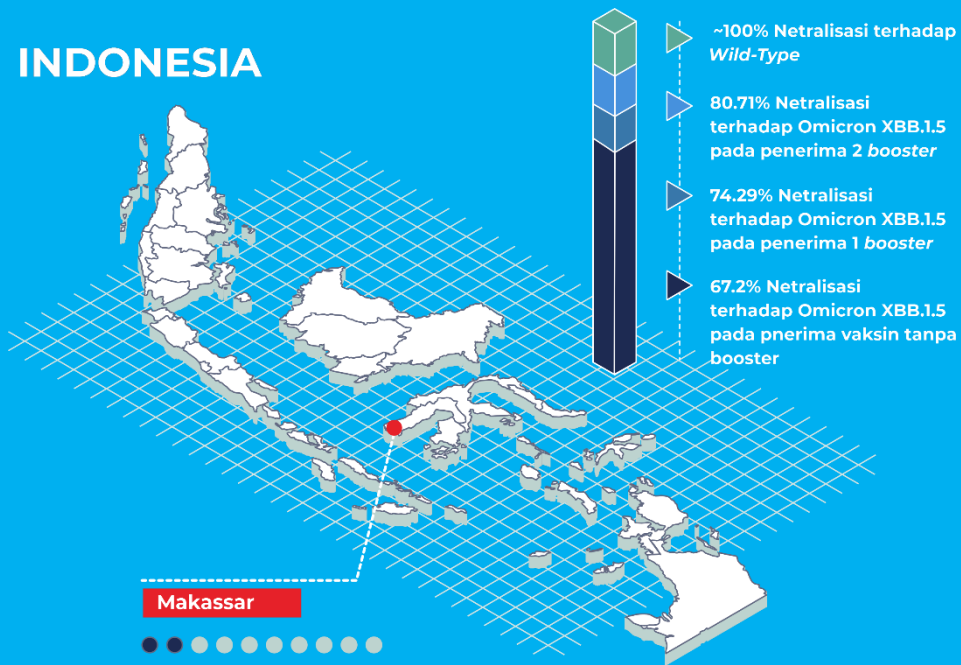


EVALUASI JANGKA PANJANG STATUS IMUNOLOGIS: PENGARUH VAKSINASI DAN RIWAYAT INFEKSI SARS-COV-2 DI MAKASSAR, INDONESIA

LONG-TERM ASSESSMENT OF IMMUNOLOGICAL STATUS: THE INFLUENCE OF SARS-COV-2 VACCINATION AND INFECTION HISTORY IN MAKASSAR, INDONESIA

KARISMANANDA
P062231027

INDONESIA



PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

**EVALUASI JANGKA PANJANG STATUS IMUNOLOGIS: PENGARUH
VAKSINASI DAN RIWAYAT INFEKSI SARS-COV-2 DI MAKASSAR,
INDONESIA**

***LONG-TERM ASSESSMENT OF IMMUNOLOGICAL STATUS: THE
INFLUENCE OF SARS-COV-2 VACCINATION AND INFECTION HISTORY
IN MAKASSAR, INDONESIA***

**KARISMANANDA
P062231027**



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**EVALUASI JANGKA PANJANG STATUS IMUNOLOGIS: PENGARUH
VAKSINASI DAN RIWAYAT INFEKSI SARS-COV-2 DI MAKASSAR,
INDONESIA**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Disusun dan diajukan oleh

**KARISMANANDA
P062231027**

Kepada

**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

**EVALUASI JANGKA PANJANG STATUS IMUNOLOGIS:
PENGARUH VAKSINASI DAN RIWAYAT INFEKSI SARS-COV-2 DI
MAKASSAR, INDONESIA**

**KARISMANANDA
P062231027**

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada 26 September
2024

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

**Program Studi Ilmu Biomedik
Sekolah Pasca Sarjana
Universitas Hasanuddin
Makassar**

mengesahkan

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

dr.Yenni Yusuf, M.Infect.Dis, Ph.D

NIP. 19820209 200801 2 011

Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc

NIP. 197701212003122003

Ketua Program Studi
Ilmu Biomedik

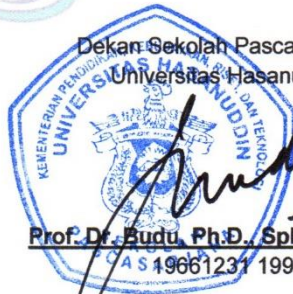
Dekan Sekolah Pasca Sarjana
Universitas Hasanuddin

Prof. dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D., Sp.PD(K)

NIP. 196802181999032002

Prof. Dr. Budu, Ph.D., SpM(K), M.Med.Ed

NIP. 19661231 199503 1 009



PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul “**Evaluasi Jangka Panjang Status Immunologis: Pengaruh Vaksinasi dan Riwayat Infeksi Sars-CoV-2 di Makassar, Indonesia**” adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dr. Yenni Yusuf, M.Infect.Dis, Ph.D dan Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka disertasi ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal *Antibodies, Special Issue: Review Collection on Humoral Immunity*, Volume 13, artikel 3, dan DOI: 10.3390/antib13030072 sebagai artikel dengan judul “*Long-Term Immunity Against SARS-CoV-2 Wild Type and Omicron XBB.1.5 in Indonesian Residents after Vaccination and Infection*”.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 3 September 2024



SMANANDA
P062231027

Ucapan Terima Kasih

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya yang tiada henti mengalir, sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul "Evaluasi Jangka Panjang Status Imunologis: Pengaruh Vaksinasi dan Riwayat Infeksi SARS-CoV-2." Dalam kesempatan ini, saya ingin menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama proses penyusunan tesis ini.

Pertama-tama, izinkan saya menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Yenni Yusuf, M.Infect.Dis, Ph.D., sebagai pembimbing utama. Tanpa bimbingan, arahan, dan kesempatan yang luar biasa dari beliau, tesis ini tidak akan terwujud. Beliau telah memberikan pengalaman berharga dalam segi ilmu dan penelitian yang tidak ternilai harganya. Kesabaran dan ketelatenan beliau dalam membimbing saya menyusun artikel ilmiah pertama yang berhasil dipublikasikan adalah salah satu tonggak penting dalam perjalanan akademik saya. Terima kasih atas semua inspirasi dan dedikasi yang telah diberikan.

Saya juga ingin menyampaikan penghargaan dan terima kasih yang tulus kepada Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc., sebagai pembimbing kedua. Beliau telah menjadi sosok teladan yang baik dan sangat membantu dalam setiap langkah penyusunan tesis ini. Nasihat dan dorongan beliau sangat berarti bagi saya dalam menghadapi berbagai tantangan selama proses penelitian.

Ucapan terima kasih yang tidak kalah penting saya sampaikan kepada senior dan kolega di Departemen Biokimia FK Unhas: Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D., Sp.Biok, dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed, Ph.D., Dr. dr. Sjahrijuita Kadir, Sp.THT, M.Kes, dr. Bau Dilam A., MBS, MHPE, Dr. dr. Ika Yustia Sia, MSc, dr. Ilhamuddin Azis, Msi, Ph.D., Sp.KJ, dr. Gita Vita Soraya, Ph.D., dr. Diandra Sabrina, Ph.D. Mereka semua telah memberikan dukungan yang luar biasa, baik dalam perkuliahan maupun penelitian, serta mendorong saya untuk mengambil program magister ini. Bantuan, saran, dan motivasi yang diberikan sungguh berarti dalam perjalanan akademik saya.

Saya juga berterima kasih kepada fasilitas laboratorium yang telah mendukung penelitian ini, yaitu Laboratorium FK Unhas dan Emerging Disease di Makassar, Laboratorium of Applied Vaccinology di Kanazawa University, Kanazawa, Jepang, serta Laboratorium of Molecular Immunology, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University, Tokyo, Jepang. Fasilitas dan dukungan yang diberikan oleh laboratorium-laboratorium tersebut sangat membantu dalam mewujudkan penelitian ini.

Tidak lupa, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan program pasca sarjana atas dukungan dan fasilitas yang telah diberikan. Tanpa dukungan institusi ini, saya tidak akan dapat menyelesaikan studi saya dengan baik.

Ucapan terima kasih khusus saya sampaikan kepada Professor Mitshuhiro Iyori dan Akihiko Sakamoto Sensei yang telah membimbing saya dengan penuh dedikasi selama kegiatan di laboratorium di Jepang. Pengetahuan dan pengalaman

yang saya peroleh dari bimbingan mereka sangat berharga dan memperkaya penelitian ini.

Saya juga berterima kasih kepada Ammar Abdur Rahman Hasyim, sebagai ketua angkatan, teman, dan partner penelitian. Dedikasinya yang luar biasa, serta waktu dan tenaganya yang dicurahkan di Kanazawa, sangat membantu dalam menyelesaikan penelitian ini. Terima kasih atas semua dukungan dan kerjasama yang telah diberikan.

Tak lupa, saya ingin menyampaikan terima kasih yang mendalam kepada keluarga saya, khususnya kepada ibu tercinta. Doa, dukungan, dan cinta kasih yang beliau berikan menjadi sumber kekuatan dan semangat yang tiada tara. Terima kasih ibu, atas segala pengorbanan dan kasih sayang yang tak terhingga.

Akhir kata, terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada istri tercinta atas dukungan fisik, batin, dan akademik yang telah diberikan. Kehadiran dan dukungan istri saya adalah sumber kekuatan dan inspirasi yang tiada taranya. Terima kasih telah selalu ada di sisi saya, memberikan semangat dan cinta tanpa henti.

Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan dan memberikan rahmat-Nya kepada semua pihak yang telah membantu saya dalam penyusunan tesis ini.

Makassar, 16 Juli 2024

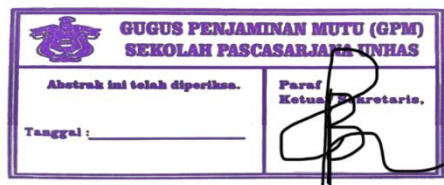
Karismananda

Abstrak

KARISMANANDA. Evaluasi Jangka Panjang Status Imunologis: Pengaruh Vaksinasi dan Riwayat Infeksi SARS-CoV-2 di Makassar, Indonesia. Dibimbing oleh Yenni Yusuf dan Ika Yustisia.

Latar Belakang: Dengan rampungnya program vaksinasi oleh pemerintah dan mutasi virus SARS-CoV-2 yang cepat dan tidak dapat diprediksi, pemantauan durabilitas status imunologis masyarakat Indonesia, khususnya di Makassar, perlu selalu dilakukan. **Tujuan Penelitian:** Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh *booster* dan riwayat infeksi terhadap ketahanan respons humoral jangka panjang terhadap varian *Wild-Type* (WT) dan Omicron XBB.1.5 pada sampel populasi di Makassar, Indonesia. **Metode:** Penelitian ini menggunakan metode *cross-sectional*. Sampel dikelompokkan menjadi 3 kelompok utama, yaitu kelompok tanpa *booster* (kelompok A), kelompok dengan dua kali *booster* (kelompok B), dan kelompok dengan tiga kali *booster* (kelompok C). Status imunologis sampel dievaluasi dengan mengukur kadar titer antibodi serum serta kapasitas netralisasinya terhadap virus varian WT dan XBB.1.5. Kadar titer antibodi (Ab) diukur dengan metode ELISA, sedangkan kapasitas netralisasi (NC) dievaluasi dengan menggunakan *Luciferase Assay*. **Hasil:** Penelitian ini berhasil mengumpulkan total 113 sampel (kelompok A: 37, B: 29, C: 37) dengan usia 26.77 ± 10.77 tahun (rerata \pm SD) (kelompok A: 19.81 ± 1.5 ; B: 25 ± 9.54 ; C: 35.49 ± 10.77 , rerata \pm SD). Pada indentifikasi durasi vaksinasi terakhir ditemukan: kelompok A vs B vs C: 25.11 vs 19.24 vs C: 16.9 (bulan). Selain itu, rerata waktu infeksi terakhir adalah 21.72 bulan. Pada pemeriksaan titer Ab, ditemukan bahwa *booster* hanya memberikan perbedaan yang signifikan antar kelompok pada titer Ab terhadap WT (A vs B vs C = 0.48 ± 0.03 vs 0.54 ± 0.05 vs 0.73 ± 0.03 , $p < 0.0001$, rerata \pm SEM), namun tidak terhadap XBB.1.5 (A vs B vs C = 1.43 ± 0.05 ; 1.51 ± 0.06 ; 1.52 ± 0.06 ; $p = 0.16$, rerata \pm SEM). Pada pemeriksaan NC, didapatkan persistensi NC masyarakat Makassar dengan netralisasi lebih dari 50% pada kedua strain. Lebih lanjut, NC menunjukkan tingkat netralisasi yang hampir sempurna terhadap WT pada semua sampel, sedangkan terhadap XBB.1.5, *booster* mampu mempertahankan peningkatan NC jangka panjang (A vs B vs C = $67.2 \pm 6.3\%$ vs $74.29 \pm 6.7\%$ vs $80.71 \pm 3.9\%$, $p = 0.14$, rerata \pm SEM). Meskipun riwayat infeksi tidak berpengaruh terhadap titer Ab pada kedua varian (non-infeksi vs infeksi: WT: $p = 0.28$; XBB.1.5: $p = 0.91$), sampel dengan riwayat infeksi menunjukkan nilai NC yang lebih baik terhadap XBB.1.5 ((non-infeksi vs infeksi) XBB.1.5: $90.29 \pm 3.89\%$ vs $71.75 \pm 3.63\%$; $p < 0.05$, rerata \pm SEM). **Kesimpulan:** Penelitian ini menunjukkan bahwa populasi di Makassar, Indonesia, mampu mempertahankan status imunitas yang persisten terhadap varian WT dan XBB.1.5. Selain itu, jumlah *booster* dan riwayat infeksi memberikan pengaruh yang baik terhadap ketahanan imunitas.

Kata Kunci: Persistensi imunitas, Omicron XBB.1.5, kapasitas netralisasi, antibodi, vaksin COVID-19.

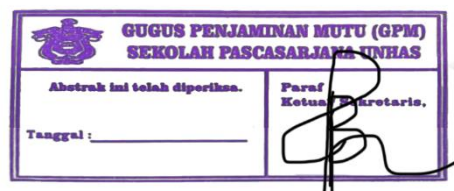


Abstract (English)

KARISMANANDA. Long-Term Evaluation Of Immunological Status: The Impact Of Vaccination And Sars-Cov-2 Infection History In Makassar, Indonesia. Supervised by Yenni Yusuf and Ika Yustisia.

Background: With the completion of the government's vaccination program and the rapid, unpredictable mutations of the SARS-CoV-2 virus, it is essential to continuously monitor the durability of the immunological status of the Indonesian population, especially in Makassar. **Aim:** This study aims to evaluate the impact of *booster* doses and infection history on the long-term humoral response to Wild-Type (WT) and Omicron XBB.1.5 variants in a population sample from Makassar, Indonesia. **Methods:** This research used a cross-sectional study design. Samples were divided into three main groups: those without a *booster* (Group A), those with two *boosters* (Group B), and those with three *boosters* (Group C). The immunological status of the samples was assessed by measuring serum antibody titers and their neutralization capacity against the WT and XBB.1.5 variants. Antibody titers (Ab) were measured using the ELISA method, while neutralization capacity (NC) was evaluated using the Luciferase Assay. **Results:** The study collected 113 samples (Group A: 37, B: 29, C: 37) with an average age of 26.77 ± 10.77 years (Group A: 19.81 ± 1.5 ; B: 25 ± 9.54 ; C: 35.49 ± 10.77 , mean \pm SD). The duration since the last vaccination was 25.11 months for Group A, 19.24 months for Group B, and 16.9 months for Group C. The average time since the last infection was 21.72 months. Antibody titer analysis showed that *boosters* significantly increased Ab titers against WT (A vs. B vs. C = 0.48 ± 0.03 vs. 0.54 ± 0.05 vs. 0.73 ± 0.03 , $p < 0.0001$, mean \pm SEM) but not against XBB.1.5 (A vs. B vs. C = 1.43 ± 0.05 ; 1.51 ± 0.06 ; 1.52 ± 0.06 ; $p = 0.16$, mean \pm SEM). NC analysis revealed persistence of NC with over 50% neutralization for both strains in the Makassar population. Further, NC showed almost perfect neutralization against WT in all samples, while for XBB.1.5, *boosters* maintained long-term NC improvement (A vs. B vs. C = $67.2 \pm 6.3\%$ vs. $74.29 \pm 6.7\%$ vs. $80.71 \pm 3.9\%$, $p = 0.14$, mean \pm SEM). Although infection history did not affect Ab titers for both variants (non-infected vs. infected: WT: $p = 0.28$; XBB.1.5: $p = 0.91$), samples with an infection history showed better NC against XBB.1.5 (non-infected vs. infected: $90.29 \pm 3.89\%$ vs. $71.75 \pm 3.63\%$; $p < 0.05$, mean \pm SEM). **Conclusion:** The study demonstrates that the population in Makassar, Indonesia, can maintain persistent immunity against WT and XBB.1.5 variants. Additionally, *booster* doses and infection history positively influence immunity persistence.

Keywords: Immunity persistence, Omicron XBB.1.5, Neutralization capacity, Antibodies, COVID-19 vaccine.



Daftar Isi

LEMBAR PENGESAHAN	III
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA	IV
UCAPAN TERIMA KASIH	V
ABSTRAK	VII
ABSTRACT (ENGLISH)	VIII
DAFTAR ISI	IX
DAFTAR TABEL	XI
DAFTAR GAMBAR	XII
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	XIV
BAB I – PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Teori.....	3
1.2.1. COVID-19	3
1.2.2. SARS-COV-2	3
1.2.3. Proses berikatannya protein S dengan reseptor ACE2.....	8
1.2.4. Peran penting <i>Neutralizing Antibodies</i> terhadap infeksi SARS-COV-210	
1.3. Rumusan Masalah	16
1.4. Hipotesis.....	17
BAB II – METODE PENELITIAN	18
2.1. Desain Penelitian dan Subjek Penelitian	18
2.1. Analisis Laboratorium.....	18
2.2.1 . Pengukuran Titer Antibodi dengan ELISA	18
2.2.2. Pengukuran Kapasitas Netralisasi metode <i>Neutralization Assay</i> dengan Luciferase Assay	20
2.3. Analisis Data	23
BAB III – HASIL	24
3.1. Karakteristik Subjek Penelitian.....	24
3.2. Analisis Status Imunologis Jangka Panjang pada Sampel Populasi di Makassar	27
3.2.1. Nilai Titer Antibodi Sampel Populasi di Makassar	27
3.2.2. Nilai Kapasitas Netralisasi Sampel Populasi di Makassar	28
3.2.3. Korelasi antara Titer Antibodi dengan Kapasitas Netralisasi Sampel Populasi di Makassar	28
3.3. Pengaruh Jumlah <i>Booster</i> terhadap Status Imunitas	29
3.3.1. Pengaruh Jumlah <i>Booster</i> terhadap Titer Antibodi.....	29
3.3.2. Pengaruh Jumlah <i>Booster</i> terhadap Kapasitas Netralisasi.....	30
3.3.3. Pengaruh Jumlah <i>Booster</i> terhadap Korelasi antara Titer Antibodi dengan Kapasitas Netralisasi.....	31
3.4. Pengaruh Riwayat Infeksi terhadap Status Imunitas	32
3.4.1. Pengaruh Riwayat Infeksi terhadap Titer Antibodi.....	32
3.4.2. Pengaruh Riwayat Infeksi terhadap Kapasitas Netralisasi.....	33

3.4.3. Pengaruh Riwayat Infeksi terhadap Korelasi antara Titer Antibodi dengan Kapasitas Netralisasi	34
3.5. Korelasi Silang antara Titer Antibodi dengan Kapasitas Netralisasi	35
3.6. Pengaruh Usia, Jenis Kelamin dan Pekerjaan terhadap Status Imunitas	36
3.6.1. Pengaruh Usia terhadap Status Imunitas.....	36
3.6.2. Pengaruh Jenis Kelamin terhadap Status Immunitas	43
3.6.3. Pengaruh Pekerjaan terhadap Status Imunitas.....	46
BAB IV – PEMBAHASAN DAN KESIMPULAN	50
4.1. Pembahasan	50
4.2. Kesimpulan.....	54
DAFTAR PUSTAKA.....	55

Daftar Tabel

Tabel 2.1. Pembagian Kelompok Subjek Penelitian berdasarkan Jumlah Vaksin dan <i>Booster</i> yang diterima	18
Tabel 3.1. Distribusi Subjek Penelitian Berdasarkan Status Vaksinasi.	24
Tabel 3.2. Karakteristik Subjek Penelitian berdasarkan Status Infeksinya	26
Tabel 3.3 Karakteristik Jenis Pekerjaan	27

Daftar Gambar

Gambar 1.1 Struktur Genomik SARS-COV-2 dan Protein yang Dikode	4
Gambar 1.2. Diagram yang menggambarkan glikoprotein Spike SARS-CoV-2.....	5
Gambar 1.3. <i>Variant of Concern</i> dari SARS-CoV-2 beserta Jenis dan Lokasi Mutasinya pada Genom.....	7
Gambar 1.4. Ilustrasi <i>timeline</i> dinamika mutasi SAS-CoV-2.....	7
Gambar 1.5. Subvariant dari Omicron beserta <i>Timeline</i> Penyebarannya.....	8
Gambar 1.6. Struktur domain terkait pada saat SARS-COV-2 berlekatan dengan reseptor ACE2.....	9
Gambar 1.7 Proses fusi membran oleh SARS-COV-2 setelah S protein berlekatan dengan reseptor ACE2.....	10
Gambar 1.8. Perbedaan proses eliminasi oleh <i>Neutralizing</i> dan non <i>Neutralizing Antibodies</i>	11
Gambar 1.9. Empat Jenis Mekanisme Pencegahan Infeksi dari Virus oleh <i>Neutralizing Antibodies</i>	12
Gambar 1.10. Proses Aktivasi dari Limfosit B Menjadi <i>Memory Cell</i> B dan sel plasma dimana keduanya dapat menjadi <i>Neutralizing antibody</i>	13
Gambar 1.11. Model Prediksi Imunitas yang Dihasilkan akibat Infeksi dan oleh Beberapa Jenis Vaksin.....	15
Gambar 1.12. Prediksi Penurunan Efikasi dari Imunitas Seiring Waktu yang Dipengaruhi oleh Faktor: Keparahan Infeksi Sebelumnya, Jenis Vaksin, dan Mutasi dari Virus	16
Gambar 1.13. Ilustrasi Penghindaran <i>Neutralizing Antibodies</i> akibat Mutasi.	16
Gambar 2.1. Prosedur Indirect ELISA	20
Gambar 2.2. Proses dan Fungsi Transfeksi gen <i>Luciferase</i>	21
Gambar 2.3. Ilustrasi Prosedur Pengukuran Kapasitas Netralisasi.....	22
Gambar 3.1. <i>Timeline</i> Ilustrasi Durasi Vaksinasi dan Riwayat Infeksi Terkonfirmasi Terakhir.....	25
Gambar 3.2. Kadar Titer Antibodi pada Sampel Populasi di Makassar	27
Gambar 3.3. Kapasitas Netralisasi pada Sampel Populasi di Makassar.....	28
Gambar 3.4. Korelasi antara Titer Antibodi dengan Aktivitas Internalisasi Virus pada Sampel Populasi di Makassar.....	29
Gambar 3.5. Pengaruh Jumlah <i>Booster</i> terhadap Titer Antibodi	30
Gambar 3.6. Pengaruh Jumlah <i>Booster</i> terhadap Kapasitas Netralisasi	31
Gambar 3.7. Pengaruh Jumlah <i>Booster</i> terhadap Korelasi antara Titer Antibodi dengan Aktivitas Internalisasi Virus	32

Gambar 3.8. Pengaruh Riwayat Infeksi Terhadap Titer Antibodi	33
Gambar 3.9. Pengaruh Riwayat Infeksi terhadap Kapasitas Netralisasi	34
Gambar 3.10. Pengaruh Riwayat Infeksi terhadap Korelasi antara Titer Antibodi dengan Aktivitas Internalisasi Virus	35
Gambar 3.11. Korelasi Silang antara Titer Antibodi dengan Kapasitas Netralisasi .	36
Gambar 3.12. Hubungan Usia dengan Titer Antibodi.	37
Gambar 3.13. Analisis Sub-kelompok Pengaruh Usia terhadap Titer Antibodi Berdasarkan Kelompok Usia.	38
Gambar 3.14. Analisis sub-kelompok pengaruh usia terhadap titer antibodi berdasarkan jumlah <i>booster</i>	39
Gambar 3.15. Pengaruh Usia terhadap Kapasitas Netralisasi	40
Gambar 3.16. Analisis Sub-kelompok Pengaruh Usia terhadap Kapasitas Netralisasi.	41
Gambar 3.17. Analisis Sub-kelompok Pengaruh Kelompok usia terhadap kapasitas netralisasi berdasarkan jumlah <i>booster</i>	42
Gambar 3.18. Pengaruh Jenis Usia terhadap Korelasi Antara Titer Antibodi dengan Kapasitas Netralisasi.....	43
Gambar 3.19. Pengaruh Jenis Kelamin Terhadap Titer Antibodi	44
Gambar 3.20. Pengaruh Jenis Kelamin terhadap Kapasitas Netralisasi	45
Gambar 3.21. Pengaruh Jenis Kelamin terhadap Korelasi Antara Titer Antibodi dengan Kapasitas Netralisasi	46
Gambar 3.22. Perbandingan Titer Antibodi Antara Tenaga Kerja Kesehatan dan Non-Tenaga Kerja Kesehatan.....	47
Gambar 3.23. Pengaruh Jenis Pekerjaan terhadap Kapasitas Netralisasi	48
Gambar 3.24. Pengaruh Jenis Pekerjaan terhadap Korelasi antara Titer Antibodi dengan Internalisasi Virus.....	49
Gambar 4.1. Proses Reinfeksi dengan Variant yang Berbeda Memberikan Andil terhadap Peningkatan Imunitas Jangka Panjang	53

Daftar Istilah dan Singkatan

Daftar Istilah

Istilah	Arti dan Penjelasan
Blocking (pada ELISA)	Langkah di mana permukaan yang tidak terikat oleh antigen atau antibodi dilapisi dengan protein non-spesifik, seperti albumin atau kasein. Proses ini mencegah ikatan non-spesifik pada permukaan tersebut, sehingga mengurangi latar belakang sinyal dan meningkatkan akurasi deteksi target, seperti antigen atau antibodi spesifik.
Breakthrough infection	Infeksi COVID-19 yang terjadi pada individu yang telah divaksinasi penuh.
Coating	langkah di mana antigen atau antibodi spesifik dilapiskan (<i>di-coating</i>) ke permukaan sumur-sumur dalam pelat mikrotiter. Proses ini memungkinkan antigen atau antibodi untuk menempel secara stabil pada permukaan, sehingga dapat berinteraksi dengan sampel yang ditambahkan selama <i>assay</i> .
Endosomal cysteine proteases cathepsins	Enzim di endosom sel inang yang membantu pemrosesan protein virus untuk fusi dengan membran endosomal.
Epitop	Bagian spesifik dari antigen yang dikenali oleh sistem imun.
Furin	Enzim protease yang memotong protein spike SARS-CoV-2 menjadi subunit aktif.
Genom	Total informasi genetik SARS-CoV-2 yang mengkode protein virus.
Homotrimer	Struktur protein yang terdiri dari tiga unit identik, seperti protein spike SARS-CoV-2.
Konstanta disosiasi	Nilai yang menggambarkan kekuatan interaksi antara dua molekul, penting dalam memahami efektivitas respons imun terhadap virus.
Luciferase Assay	Metode untuk mengukur aktivitas enzim <i>Luciferase</i> yang menghasilkan cahaya, digunakan dalam penelitian COVID-19 untuk mendeteksi protein atau interaksi virus
Leuciferase gen	Gen yang mengkode enzim <i>Luciferase</i> , digunakan sebagai "reporter gene" untuk memantau proses biologis terkait infeksi COVID-19
Luminescence	Cahaya yang dihasilkan dari reaksi kimia, digunakan dalam deteksi sensitif dalam uji COVID-19 melalui <i>Luciferase Assay</i>
Microplate 96-well	Pelat laboratorium dengan 96 <i>well</i> kecil yang digunakan untuk menguji sampel dalam jumlah besar secara bersamaan

Microplate reader	Alat yang digunakan untuk membaca hasil reaksi dalam microplate, termasuk mengukur densitas cahaya
missmatch	Suatu mutasi yang terjadi ketika nukleotida yang salah dimasukkan selama replikasi DNA atau RNA, menghasilkan pasangan basa yang tidak sesuai dengan aturan pasangan basa standar
Mitigasi	Tindakan untuk mengurangi penyebaran atau dampak COVID-19.
Neutralization Assay	Uji laboratorium yang mengukur kemampuan antibodi untuk menetralkan virus, digunakan untuk mengevaluasi efektivitas respons imun terhadap SARS-CoV-2.
Omicron (XBB.1.5) Pseudovirus	Varian SARS-CoV-2 yang menunjukkan peningkatan penularan dan perubahan pada protein spike.
Prediksi modelling Strain	Penggunaan model matematika atau komputer untuk memprediksi penyebaran atau dampak COVID-19. Jenis atau versi tertentu dari virus SARS-CoV-2 dengan karakteristik genetik spesifik.
Transfeksi	proses pengenalan asam nukleat (seperti DNA atau RNA) ke dalam sel eukariotik
Transmembran	Protein atau bagian protein yang menembus membran sel, seperti protein spike SARS-CoV-2.
Vaksinasi booster	Dosis tambahan vaksin COVID-19 untuk meningkatkan atau memperpanjang kekebalan tubuh.
Varian of Concern	Merupakan jenis mutasi utama yang digolongkan oleh WHO karena mempunyai perubahan struktur yang berefek secara signifikan terhadap mitigasi dari COVID-19 (perubahan infeksifitas, kemampuan menghindari imunitas, dsb)

Daftar Singkatan

Singkatan	Kepanjangan	Arti
Ab	Antibodi	Protein yang diproduksi oleh sistem kekebalan tubuh untuk mengenali dan menetralkan patogen seperti virus dan bakteri
ACE/ACE2	Angiotensin- Converting Enzyme 2	Reseptor enzim pada permukaan sel yang digunakan oleh SARS-CoV-2 untuk memasuki sel inang.
APC	Antigen- Presenting Cell	Sel imun yang memproses dan menyajikan antigen kepada sel T, memicu respons imun adaptif.
CD	Cytoplasmic Domain	Domain sitoplasma pada protein yang berperan dalam transmisi sinyal di dalam sel.
CH	Central Helix	Struktur heliks sentral pada protein, misalnya dalam protein spike SARS-CoV-2.
CoV	Coronavirus	Keluarga virus yang memiliki bentuk seperti mahkota, termasuk SARS-CoV-2.
COVID-19	Coronavirus Disease 2019	Penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus SARS-CoV-2.
CTSB	Cathepsin B	Enzim protease di dalam endosom yang berperan dalam pemrosesan protein SARS-CoV-2.
CTSL	Cathepsin L	Enzim protease lain di dalam endosom yang juga terlibat dalam pemrosesan protein SARS-CoV-2.
ELISA (indirect)	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	teknik laboratorium yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur antibodi spesifik dalam sampel, seperti serum. Dalam metode tidak langsung (indirect), antigen terlebih dahulu dilapiskan pada permukaan, kemudian sampel yang mengandung antibodi ditambahkan. Setelah itu, antibodi sekunder yang berikatan dengan enzim ditambahkan untuk mendeteksi antibodi primer. Reaksi enzim menghasilkan perubahan warna yang diukur untuk menentukan konsentrasi antibodi dalam sampel.
Fab	Fragment antigen-binding	Bagian dari antibodi yang mengikat antigen spesifik.
FP	Fusion Peptide	Segmen pada protein yang memediasi fusi antara virus dan membran sel inang.

hACE2	Human Angiotensin-Converting Enzyme 2	protein reseptor yang digunakan oleh SARS-CoV-2 untuk memasuki sel.
hTMPRSS2	Human Transmembrane Protease, Serine 2	enzim yang membantu dalam pemrosesan protein spike virus SARS-CoV-2 untuk infeksi sel
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	teknik analisis yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur komponen-komponen dalam campuran. Dalam konteks COVID-19, HPLC dapat digunakan untuk menganalisis protein, peptida, atau senyawa lain yang relevan dengan penelitian terkait virus atau respons imun
HR1	Heptad Repeat 1	Struktur pada protein spike yang penting dalam proses fusi virus dengan sel inang.
ICU	Intensive Care Unit	Unit perawatan intensif di rumah sakit untuk pasien dengan kondisi kritis, termasuk pasien COVID-19.
IFN-I	Interferon Type I	Kelas sitokin yang berperan dalam respons antivirus awal tubuh.
IFNs	Interferons	Kelompok protein yang diproduksi oleh sel sebagai respons terhadap infeksi virus, meningkatkan respons imun.
IgM	Immunoglobulin M	Tipe antibodi yang pertama kali dihasilkan dalam respons imun terhadap infeksi baru.
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus	Virus corona penyebab sindrom pernapasan Timur Tengah.
NTC	Negative Control	Kontrol negatif dalam eksperimen yang seharusnya tidak menunjukkan hasil reaktif atau positif.
NTD	N-terminal Domain	Domain di ujung protein, seperti pada protein spike SARS-CoV-2, yang penting untuk pengikatan antigen.
NAbs	Neutralizing Antibodies	Antibodi yang dapat mencegah infeksi virus dengan mengikat bagian penting dari virus.
NSP	Non-structural Protein	Protein yang dihasilkan oleh SARS-CoV-2 yang berperan dalam replikasi dan penghindaran dari sistem imun inang.

ORF	Open Reading Frame	Bagian dari genom virus yang mengkode protein.
PRR	Pattern Recognition Receptor	Reseptor pada sel imun yang mengenali pola molekular pada patogen seperti virus.
RBD	Receptor Binding Domain	Bagian dari protein spike SARS-CoV-2 yang berikatan dengan reseptor ACE2 pada sel inang.
RLRs	RIG-I-like Receptors	Keluarga reseptor yang mendeteksi RNA virus dalam sel dan menginisiasi respons imun.
RNA	Ribonucleic Acid	Materi genetik dari SARS-CoV-2 yang mengkodekan protein virus.
S1	Subunit 1	Bagian dari protein spike yang mengandung domain pengikat reseptor (RBD).
S2	Subunit 2	Bagian dari protein spike yang terlibat dalam fusi membran virus dengan sel inang.
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2	Virus penyebab COVID-19.
TCID50	Tissue Culture Infectious Dose 50	Ukuran kuantitatif untuk menentukan jumlah virus yang diperlukan untuk menginfeksi 50% dari sel kultur jaringan. Digunakan untuk mengukur virulensi atau kekuatan infeksi virus, termasuk SARS-CoV-2
TM	Transmembrane Domain	Bagian dari protein yang menembus membran sel, seperti pada protein spike SARS-CoV-2.
TMPRSS2	Transmembrane Protease, Serine 2	Enzim protease yang memotong protein spike SARS-CoV-2, memfasilitasi masuknya virus ke dalam sel.
TLRs	Toll-like Receptors	Reseptor pada sel imun yang mengenali patogen dan memicu respons inflamasi.
VSV	Vesicular Stomatitis Virus	Virus yang sering digunakan sebagai vektor dalam penelitian virologi dan vaksin
WT	Wild-Type	Bentuk asli atau rujukan dari SARS-CoV-2 sebelum munculnya berbagai varian

BAB I

Pendahuluan

1.1. Latar Belakang

Pandemi COVID-19, yang dimulai sebagai krisis kesehatan global, secara resmi mengalami transisi status dari pandemi menjadi endemi pada Mei 2023.¹ Meskipun demikian, ancaman dan dampak dari virus ini tetap menjadi tantangan yang signifikan di seluruh dunia. Hal ini terutama disebabkan oleh adanya mutasi baru yang dilaporkan dapat meningkatkan risiko reinfeksi dan berpotensi menyebabkan dampak kesehatan yang serius. Menurut laporan WHO yang diterbitkan pada Desember 2023, terdapat peningkatan yang mengkhawatirkan sebesar 53% dalam jumlah kasus COVID-19 dan lonjakan penerimaan di unit perawatan intensif (ICU) sebesar 51%.² Angka-angka ini menyoroti betapa pentingnya pemantauan dan respons kesehatan masyarakat yang berkelanjutan.

Lebih jauh, beberapa penelitian telah mengungkapkan bahwa kondisi pasca-COVID-19, yang sering disebut sebagai *long* COVID-19, dapat menyebabkan gejala yang serius dan melemahkan. Gejala-gejala ini mencakup kelelahan kronis, masalah pernapasan yang berkepanjangan, nyeri otot yang terus-menerus, gangguan tidur, serta gangguan kognitif seperti *brain fog*.³ Gejala-gejala ini tidak hanya mempengaruhi kualitas hidup individu tetapi juga menambah beban pada sistem perawatan kesehatan.

Oleh karena itu, penting bagi kita untuk tetap waspada terhadap potensi infeksi baru atau reinfeksi oleh COVID-19 dalam upaya melindungi kesehatan masyarakat. Mengingat ketidakpastian yang masih menyelimuti SARS-CoV-2, termasuk kemampuannya untuk bermutasi, kita harus terus berhati-hati dan siap menghadapi ancaman yang ditimbulkan oleh perubahan genetik virus ini. Langkah-langkah preventif dan strategi mitigasi tetap harus menjadi prioritas dalam upaya untuk mengendalikan penyebaran penyakit ini.

Varian Omicron dari SARS-CoV-2 telah memperlihatkan peningkatan yang signifikan dalam hal kemampuan penularan serta kemampuan untuk menghindari kekebalan yang diperoleh melalui vaksinasi. Meskipun demikian, vaksin generasi pertama masih memberikan perlindungan yang cukup baik terhadap penyakit parah dan kematian akibat infeksi varian ini⁴. Namun, efektivitas vaksin terhadap infeksi yang disebabkan oleh Omicron umumnya lebih rendah dibandingkan dengan varian SARS-CoV-2 sebelumnya, dan perlindungan ini cenderung menurun lebih cepat seiring berjalannya waktu.⁴⁻⁶

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa varian Omicron memiliki sejumlah mutasi pada *protein spike*-nya, yang merupakan target utama dari banyak vaksin COVID-19. Mutasi ini memungkinkan Omicron untuk lebih mudah menghindari respons imun yang dibangun oleh tubuh setelah vaksinasi atau infeksi sebelumnya.

Akibatnya, banyak individu yang telah divaksinasi penuh masih mengalami *breakthrough infection*, meskipun biasanya dalam bentuk yang lebih ringan. Untuk mengatasi masalah ini dan meningkatkan respons imun terhadap varian ini, sebuah vaksin COVID-19 baru yang mengandung antigen dari *strain* Omicron telah mendapatkan persetujuan pada tahun 2023.⁷⁻¹⁰

Pengembangan vaksin baru ini menandai langkah penting dalam upaya global untuk memerangi COVID-19. Vaksin yang lebih khusus ini diharapkan dapat memberikan perlindungan yang lebih tahan lama dan efektif terhadap varian Omicron dan potensi varian lain yang mungkin muncul di masa depan. Strategi vaksinasi yang terus diperbarui ini sangat penting untuk menjaga efektivitas perlindungan terhadap virus yang terus bermutasi dan untuk mengurangi risiko penularan serta dampak serius pada populasi global.

Vaksinasi COVID-19 di Indonesia dimulai pada Januari 2021 dengan penggunaan dua dosis vaksin Coronavac. Coronavac adalah vaksin berbasis virus utuh yang telah diinaktivasi dan diberikan dengan interval 14 minggu antar dosis. Berdasarkan data dari Kementerian Kesehatan Indonesia, 86% populasi telah menerima setidaknya satu dosis vaksin, sementara 74% telah menyelesaikan dosis kedua. Pada Agustus 2021, Indonesia mulai memperkenalkan program vaksinasi *booster* pertama, yang pada akhirnya mencapai 39% populasi pada Desember 2022. Namun, tingkat penerimaan *booster* kedua lebih rendah, hanya mencakup 2% populasi pada awal tahun 2023.¹¹

Meskipun cakupan vaksinasi telah meningkat sejak saat itu, tidak ada peningkatan signifikan dalam jumlah individu yang menerima vaksinasi sejak Mei 2022.¹² Situasi ini menimbulkan kekhawatiran tentang celah waktu antara program vaksinasi di Indonesia dan munculnya *strain* Omicron, yang berpotensi menurunkan tingkat kekebalan terhadap varian tersebut di kalangan masyarakat Indonesia. Oleh karena itu, evaluasi berkelanjutan terhadap respons imun terhadap varian SARS-CoV-2 yang beredar sangat penting untuk memandu strategi vaksinasi di masa depan.

Memasuki akhir tahun 2022, Indonesia mulai merasakan dampak dari varian Omicron XBB.1.5. Varian ini menyebabkan peningkatan kematian pada kelompok lanjut usia setelah periode panjang tanpa kematian terkait COVID-19. XBB.1.5 telah muncul sebagai *strain* dominan di beberapa negara dan dikenal dengan penularannya yang lebih mudah serta kemampuan yang lebih besar dalam menghindari imunitas.^{13,14} Situasi ini menimbulkan beberapa pertanyaan penting mengenai respons imun terhadap varian ini, terutama terkait keberlanjutan respons humoral yang dihasilkan oleh vaksinasi. Juga penting untuk mengevaluasi efektivitas antibodi yang dihasilkan oleh vaksin *booster* dalam menetralkan virus, khususnya varian Omicron XBB.1.5 yang saat ini beredar.

Selain itu, pertanyaan lain yang muncul adalah apakah ada kebutuhan untuk memperkenalkan vaksin baru yang mengandung antigen khusus dari varian Omicron. Memahami efektivitas dan daya tahan respons imun terhadap varian baru ini adalah kunci untuk mengatasi pandemi dan memastikan kesehatan masyarakat tetap terlindungi. Oleh karena itu, studi ini dilakukan untuk menjawab pertanyaan-

pertanyaan tersebut dan memprediksi kerentanan populasi terhadap varian ini, guna memberikan dasar ilmiah bagi keputusan kebijakan vaksinasi di masa depan.

1.2. Teori

1.2.1. COVID-19

SARS-CoV-2, virus yang bertanggung jawab atas COVID-19, adalah virus RNA beruntai tunggal yang sangat menular yang menyebar dengan cepat di seluruh dunia. Infeksi yang disebabkan oleh virus ini, yang dikenal sebagai COVID-19, dapat menimbulkan berbagai gejala, termasuk batuk, demam, ketidaknyamanan dada, dan dalam kasus yang parah, sindrom gangguan pernapasan. Virus ini utamanya menyebar melalui tetesan pernapasan yang dihasilkan ketika seseorang yang terinfeksi berbicara, batuk, atau bersin, dan juga dapat ditularkan melalui permukaan dan benda yang terkontaminasi.¹⁴

Keparahan gejala COVID-19 dapat bervariasi secara signifikan di antara individu, dengan beberapa mengalami gejala ringan atau tidak ada gejala, sementara yang lain dapat mengembangkan komplikasi yang parah atau mengancam jiwa, seperti pneumonia, sindrom gangguan pernapasan akut (ARDS), dan kegagalan multi-organ. Faktor risiko untuk penyakit parah meliputi usia, kondisi kesehatan yang mendasari, dan keberadaan infeksi virus atau bakteri lainnya¹⁵.

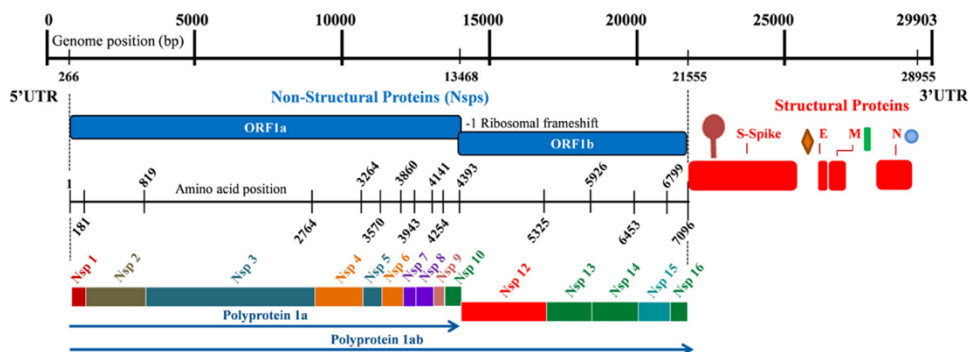
1.2.2. SARS-COV-2

Struktur Genomik SAR-CoV2.

Coronavirus termasuk dalam subfamili Coronavirinae dalam keluarga Coronaviridae, yang terdiri dari empat genus: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus, dan Deltacoronavirus. SARS-CoV-2, sebagai anggota keluarga virus coronavirus (CoV), memiliki genom terbesar di antara virus RNA untai positif, dengan panjang berkisar antara 26 hingga 32 kilobase (kb)¹⁶. Virus ini masuk ke dalam genus β -coronavirus, dalam kelompok B, bersama dengan anggota-anggota penting lainnya seperti severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) dan Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)¹⁷. Dalam hal urutan genetik, SARS-CoV-2 menunjukkan kesamaan sebesar 79,6% dengan SARS-CoV dan 96% dengan coronavirus kelelawar RaTG13. Tingkat kesamaan yang tinggi ini mengindikasikan bahwa SARS-CoV-2 mungkin berasal dari coronavirus kelelawar, dengan kemungkinan adanya inang perantara yang berkontribusi pada evolusinya^{18,19}.

SARS-CoV-2 memiliki genom RNA berupa rantai tunggal yang bersifat positif, dengan panjang sekitar 30.000 basa. Genom ini terdiri dari dua bingkai pembacaan terbuka (ORF) yang tumpang tindih, yaitu ORF1a dan ORF1b, yang ditranslasikan menjadi polyprotein ppa1 (ORF1a) dan (ORF1b) dan proses menjadi 16 protein non-struktural (NSP) penting untuk proses replikasi dan translasi virus. NSP ini membentuk

kompleks replikasi-transkripsi (RTC), yang bertanggung jawab atas sintesis RNA virus (gambar 1).^{20,21}



Gambar 1.1 Struktur Genomik SARS-COV-2 dan Protein yang Dikode
Dikutip dari¹⁹

Di samping NSP, genom SARS-CoV-2 juga mengandung informasi untuk pembentukan protein struktural dan aksesoris. Protein aksesoris, yang dihasilkan dari ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c, dan ORF10, memiliki peran dalam mengatur proses replikasi virus, patogenesis, dan respons kekebalan tubuh inang. Sementara itu, protein struktural, termasuk protein envelope (E), protein membran (M), protein nukleokapsid (N), dan protein spike (S), memiliki fungsi kunci dalam siklus hidup virus. Protein E membantu dalam pembentukan dan pelepasan virus, sementara protein M berperan dalam pembentukan struktur selubung virus. Protein N berperan dalam mengikat RNA-virus dan memfasilitasi pengemasan genom, sementara protein S memediasi masuknya virus ke dalam sel inang dengan berikatan pada reseptor ACE2. Protein S juga menjadi sasaran utama untuk pengembangan vaksin dan pengembangan obat antivirus. Pemahaman mengenai fungsi protein-protein ini sangat penting dalam pengembangan strategi untuk mengatasi SARS-CoV-2^{22,23}.

Struktur dan Fungsi Protein Spike (S protein)

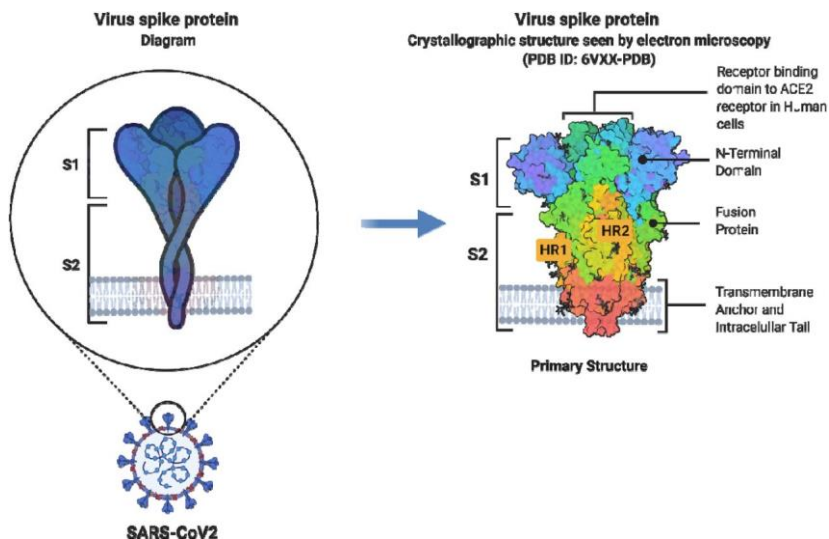
Seperti yang disebutkan sebelumnya, spike protein merupakan struktur penting untuk masuknya virus dan menjadi sasaran utama untuk vaksinasi dan intervensi terapeutik. Glikoprotein S transmembran ini membentuk homotrimer yang menonjol dari permukaan virus. Karena perannya yang sangat penting dalam memfasilitasi masuknya coronavirus, mereka merupakan target antiviral yang menarik.^{24,25}

Protein S terdiri dari dua subunit fungsional: S1 dan S2. Subunit S1 mencakup domain N-terminal (NTD) dan domain pengikat reseptor (RBD), yang mengikat ke

reseptor sel inang. Sebaliknya, subunit S2 terdiri dari peptida fusi (FP), heptad 1 repeat (HR1), heliks sentral (CH), connector domain (CD), heptad repeat 2 (HR2), domain transmembran (TM), dan ekor sitoplasma (CT)²⁵.

Fungsi utama subunit S1 adalah mengikat ke reseptor sel inang, sedangkan subunit S2 memfasilitasi fusi membran virus dan sel inang. Situs pemotongan (cleavage site) yang terletak di batas antara subunit S1 dan S2, yang dikenal sebagai situs pemotongan protease S1/S2, sangat penting untuk mengaktifkan protein melalui protease inang. Aktivasi ini penting untuk menginduksi perubahan konformasi yang tidak dapat dibalikkan yang diperlukan untuk fusi membran^{25,26}.

Selain itu, glikan terikat N (N-linked glycans) memainkan peran penting dalam memastikan lipatan protein yang tepat, meningkatkan respons antibodi netralisasi, dan mendekorasi secara ekstensif trimer protein spike. Glikan-glikan ini berkontribusi pada stabilitas dan fungsionalitas keseluruhan protein paku, yang lebih menekankan pentingnya dalam masuknya virus dan pengenalan imun^{25,26}.



Gambar 1.2. Diagram yang menggambarkan glikoprotein Spike SARS-CoV-2.
Diadaptasi dari²⁷

Protein S1, RBD dan proses masuknya virus

Protein Spike (S) di permukaan virus adalah faktor kunci yang terlibat dalam infeksi. Ini adalah glikoprotein trimerik kelas I TM yang bertanggung jawab atas masuknya virus, dan hadir dalam semua jenis HCoV, serta dalam virus lain seperti HIV (glikoprotein HIV 160, Env), virus influenza (hemagglutinin influenza, HA), paramyxovirus (paramyxovirus F), dan Ebola (glikoprotein virus Ebola). Serupa dengan coronaviruses lainnya, protein S dari SARS-CoV-2 memfasilitasi pengenalan reseptor, penempelan sel, dan fusi selama infeksi virus²⁸.

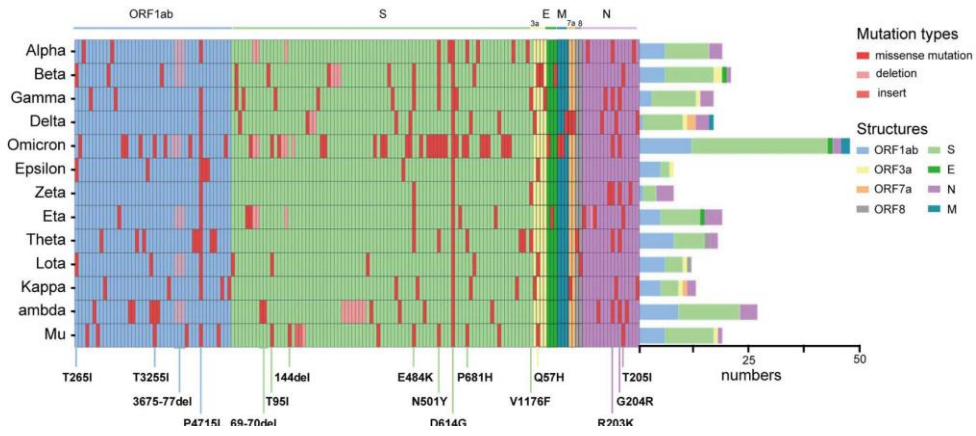
Seperti yang disebutkan sebelumnya, protein SARS-CoV-2 S berikatan dengan sel inang dengan mengenali reseptor ACE2. ACE2 adalah homolog dari ACE, yang mengkonversi angiotensin I menjadi angiotensin 1–9. ACE2 terdistribusi terutama di paru-paru, usus, jantung, dan ginjal, dan sel epitel alveolar tipe II adalah sel yang paling banyak mengekspresikan. ACE2 juga merupakan reseptor yang diketahui untuk SARS-CoV. Subunit S1 dari protein SARS-CoV S berikatan dengan ACE2 untuk mempromosikan pembentukan endosom, yang memicu aktivitas fusi virus di bawah pH rendah.^{27,28}

Interaksi antara protein S dan ACE2 dapat digunakan untuk mengidentifikasi inang perantara SARS-CoV-2, karena ACE2 dari berbagai spesies, seperti amfibi, burung, dan mamalia, memiliki struktur primer yang dilestarikan. Terdapat perbandingan afinitas pengikatan antara ACE2 dan SARS-CoV-2 S dari mamalia, burung, ular, dan kura-kura dan menemukan bahwa ACE2 dari Bovidae dan Cricetidae berinteraksi dengan baik dengan RBD SARS-CoV-2 S tetapi ACE2 dari ular dan kura-kura tidak bisa.²⁸

Mutasi pada SARS-CoV-2

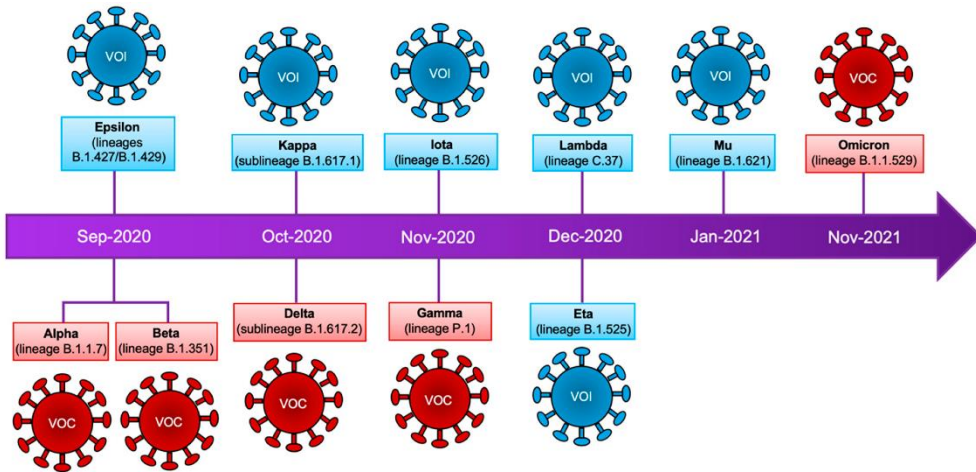
Seperti layaknya virus *single-stranded* RNA (ssRNA) lainnya, SARS-CoV-2 juga rentang terhadap mutasi. Hal ini terjadi karena virus ssRNA ini tidak mempunyai kemampuan perbaikan terhadap pada saat terjadi *missmatch* sedangkan virus tersebut mempunyai kemampuan atau tendensi untuk mengubah struktur genomiknya²⁹. Hingga saat ini teridentifikasi 13 jenis mutasi utama dari SARS-CoV-2 dimana mutasi paling sering terjadi pada struktur protein S nya.³⁰ Sehingga tentu saja hal ini membuat dinamika terhadap tingkat infeksi serta kemampuan virus ini untuk menghindari dari imunitas.³¹

Jenis mutasi utama tersebut yaitu Alpha, Beta, Gamma, Delta, Omicron, Epsilon, Zeta, Eta, Theta, Kappa, lambda dan MU yang disebut juga sebagai *Variant of Concern*. Varian-varian ini dikaitkan dengan peningkatan penularan, perubahan dalam epidemiologi COVID-19, peningkatan virulensi, atau berkurangnya efektivitas langkah-langkah kesehatan masyarakat, diagnostik, vaksin, atau terapeutik. Jenis dan lokasi dari mutasi pada varian utama ini dapat dilihat pada **Gambar 1.3** dibawah.³²



Gambar 1.3. Variant of Concern dari SARS-CoV-2 beserta Jenis dan Lokasi Mutasinya pada Genom.
Dikutip dari³²

Mutasi ini berlangsung sangat cepat dan dinamis. Ilustrasi tentang dinamika waktu pada mutasi ini dapat dilihat pada Gambar 1.4. di bawah.



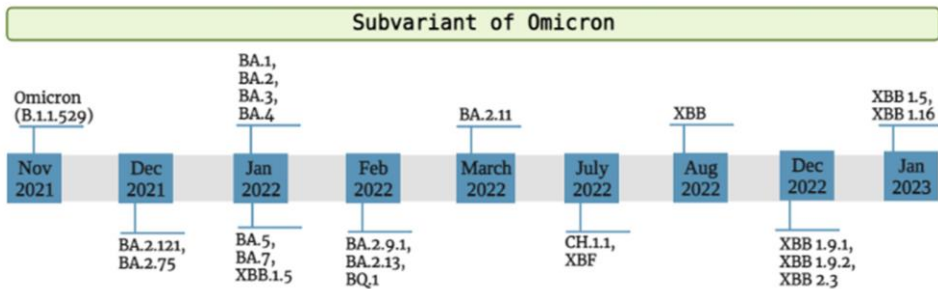
Gambar 1.4. Ilustrasi *timeline* dinamika mutasi SAS-CoV-2.
Dikutip dari³³

Omicron dan subvariant-nya.

Varian Omicron cukup menjadi perhatian sebab peningkatan terhadap infeksiitas serta kemampuannya untuk melakukan infeksi ulang yang tinggi pada semua populasi, baik dengan riwayat infeksi atau dengan riwayat vaksinasi ataupun

booster. Omicron memiliki gabungan dari semua mutasi penting yang ditemukan pada VOC sebelumnya, di samping beberapa mutasi unik yang ada pada protein S dan non-S. Protein S yang membawa mutasi pada varian Omicron mencakup protein *envelope* virus, protein membran, protein nukleokapsid, protein nonstruktural, dan situs pembelahan furin. Secara keseluruhan, varian Omicron mengandung hampir 60 mutasi, dengan 50 mutasi asam amino dan 10 sisanya diklasifikasikan sebagai mutasi non-asam amino. Protein S varian Omicron memiliki 32 mutasi, 15 di antaranya terletak di RBD.³⁴

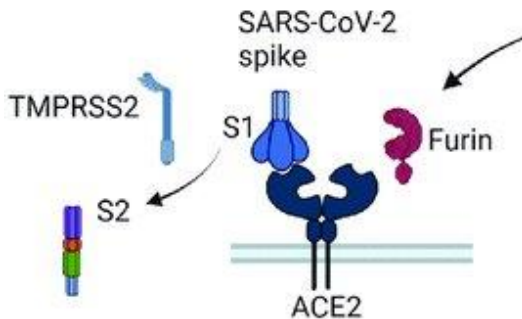
Salah satu *subvariant* paling akhir dari Omicron, yaitu XBB, dideteksi kemunculan pada akhir Agustus 2022. Untuk Subvarian XBB.1.5 dan subvarian XBB lainnya dideteksi menjadi subvarian SARS-CoV-2 yang paling dominan sejak Februari 2023. XBB.1.5 diketahui mempunyai tiket replikasi yang cukup tinggi.³⁵



Gambar 1.5. Subvariant dari Omicron beserta *Timeline* Penyebarannya.
Dikutip dari³⁴

1.2.3. Proses berikatannya protein S dengan reseptor ACE2

Protein S berikatan dengan ACE2 melalui daerah RBD dari subunit S1, memediasi lampiran virus ke sel inang dalam bentuk trimer. SARS-CoV-2 S berikatan dengan ACE2 manusia dengan konstanta disosiasi sebesar 14.7 nM, sedangkan SARS-CoV S adalah 325.8 nM, menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi dari SARS-CoV-2 S terhadap ACE2 dibandingkan dengan SARS-CoV S. Melalui identifikasi protein SARS-CoV-2, para peneliti telah mengamati sekitar 24% perbedaan dalam S antara SARS-CoV-2 dan SARS-CoV, dengan RBD menunjukkan sekitar 23% perbedaan (**Gambar 1.6**).³⁶



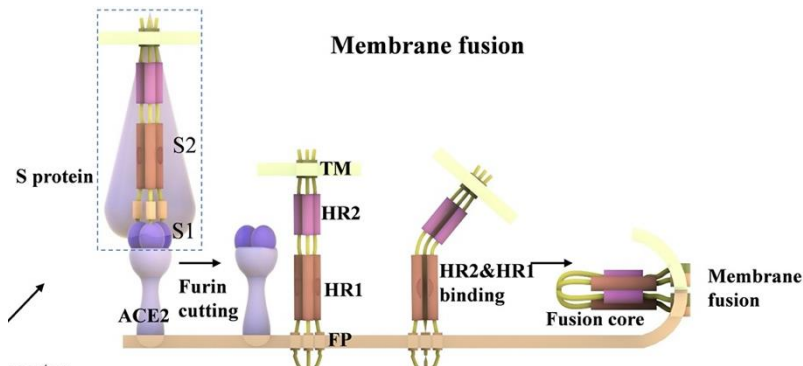
Gambar 1.6. Struktur domain terkait pada saat SARS-COV-2 berlekatan dengan reseptor ACE2

Diadaptasi dari ³⁶.

Virus memasuki sel melalui proses yang disebut fusi viral. Fusi viral mengacu pada penyatuan membran virus dan membran sel inang, yang mengakibatkan pelepasan genom virus ke dalam sel inang. Pemecahan subunit S1 dan S2 SARS-CoV-2 adalah dasar dari fusi. Protein S dipotong menjadi dua bagian, subunit S1 dan subunit S2, oleh protease inang, dan subunit tersebut ada dalam bentuk nonkovalen sampai terjadi fusi virus. Para peneliti telah menemukan bahwa situs pemotongan furin spesifik terletak di situs pemotongan SARS-CoV-2 tetapi tidak ada di CoVs mirip SARS lainnya. Mutasi situs pemotongan dalam SARS-CoV-2 atau CoVs mirip SARS telah mengungkapkan bahwa protein S SARS-CoV-2 ada dalam keadaan tidak terpotong tetapi yang lainnya sebagian besar dalam keadaan terpotong. SARS-CoV-2 S memiliki beberapa situs pemotongan furin, yang meningkatkan kemungkinan dipotong oleh protease mirip furin dan dengan demikian meningkatkan infektivitasnya. Selain itu, protease sel inang seperti TMPRSS2 penting untuk primer protein S, dan telah terbukti diaktifkan dalam masuknya SARS-CoV dan virus influenza A. Protease sel inang lain yang terbukti memotong protein S virus adalah tripsin. Secara keseluruhan, protein SARS-CoV-2 mirip dengan SARS-CoV, dan protease sel inang penting untuk mempromosikan pemotongan protein S baik SARS-CoV-2 maupun SARS-CoV. Keberadaan situs pemotongan furin spesifik pada SARS-CoV-2 mungkin menjadi salah satu alasan mengapa SARS-CoV-2 lebih menular daripada SARS-CoV.³⁷

Pembentukan struktur 6-HB sangat penting untuk fusi viral. Peptida fusi (FP) yang terletak di ujung N dari SARS-CoV-2, bersama dengan dua domain *heptad repeat* (HR) pada subunit S2, memainkan peran penting dalam proses ini. Setelah terpotongnya protein S, FP dari SARS-CoV-2 menjadi terbuka, memulai fusi viral. Dengan pengaruh ligan khusus, protein fusi mengalami perubahan bentuk, memungkinkannya untuk menyisipkan ke dalam membran sel inang. Interaksi ini

menyebabkan penurunan jarak antara membran virus dan sel inang. Domain HR1 dari protein S mendekati ke membran sel inang, sementara domain HR2 mendekati membran virus. Selanjutnya, HR2 melipat kembali ke HR1, menghasilkan pembentukan struktur enam heliks yang dikenal sebagai inti fusi, tersusun dalam format antiparalel. Struktur ini menarik membran virus menuju membran sel inang, mempromosikan ikatan yang kuat dan fusi akhir dari kedua membran (**Gambar 1.7**)³⁷.



Gambar 1.7 Proses fusi membran oleh SARS-COV-2 setelah S protein berelektan dengan reseptor ACE2
Diadaptasi dari ³⁷.

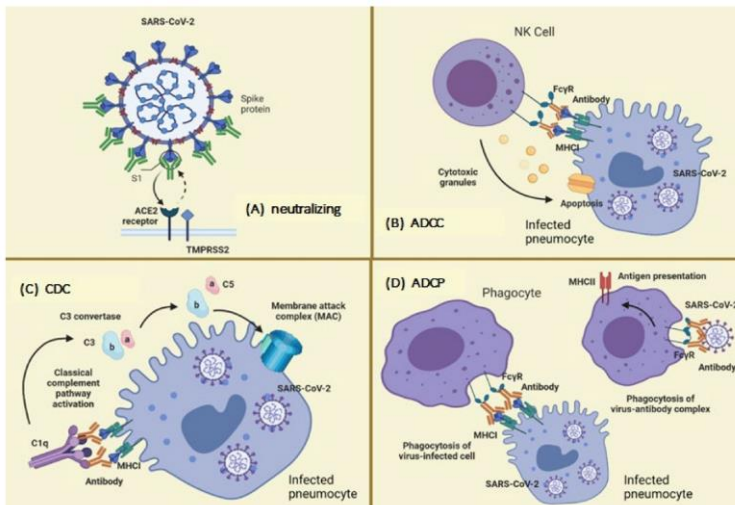
1.2.4. Peran penting *Neutralizing Antibodies* terhadap infeksi SARS-COV-2

Respon imun kompleks terhadap SARS-CoV-2 dan COVID-19 melibatkan mekanisme kekebalan bawaan dan adaptif. Respon imun bawaan dipicu oleh pengenalan komponen virus oleh pattern recognition receptors (PRRs) seperti Toll Like Receptor (TLRs) dan RIG-I-like receptors (RLRs), yang mengarah pada produksi interferon (IFNs) dan sitokin pro-inflamasi lainnya. Ini membantu membatasi replikasi virus dan merekrut sel imun ke lokasi infeksi³⁸.

Sebaliknya, respon adaptif ditandai dengan produksi antibodi dan sel T spesifik yang menargetkan antigen SARS-CoV-2. Respon humoral termasuk produksi antibodi IgG dan IgM, yang mampu menetralkan virus dan mencegah infeksi. Sel T juga membantu membersihkan sel terinfeksi dan memproduksi sel T memori untuk kekebalan jangka panjang³⁸.

Peran penting antibodi dalam perlindungan host terhadap infeksi virus sudah banyak diperlihatkan. Antibodi menetralkan infeksi virus dengan menargetkan glikoprotein virus atau cangkang protein, yang mana glikoprotein ini memfasilitasi fusi virus dan penetrasi ke dalam sel. Antibodi netralisasi (NABs) efektif dalam mengurangi tingkat patogen dan melindungi jaringan dari infeksi melalui efektor Fab, sementara antibodi non-netralisasi (non-nAbs) dapat memberikan efek protektif melalui fungsi efektor yang dimediasi Fc, seperti sitotoksitas sel yang bergantung pada antibodi,

fagositosis sel yang bergantung pada antibodi, dan sitotoksitas yang bergantung pada komplement (**Gambar 1.8**)³⁹.



Gambar 1.8. Perbedaan proses eliminasi oleh *Neutralizing Antibodies*
Diadaptasi dari³⁹.

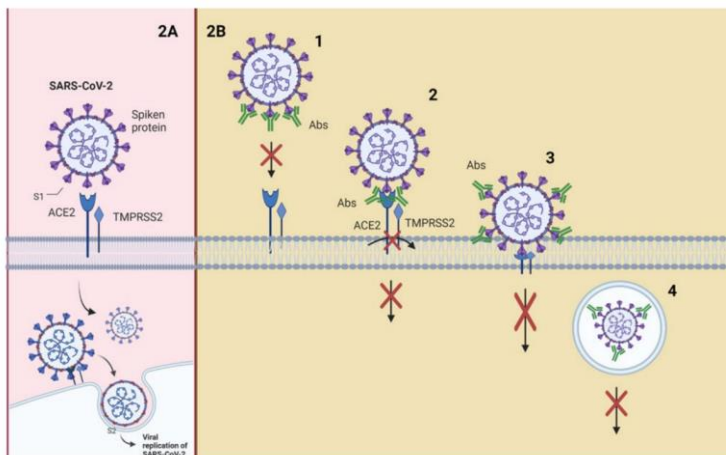
Mekanisme Netralisasi oleh Neutralizing Antibodies

RBD telah diidentifikasi sebagai target utama untuk NAbs terhadap SARS-CoV-2. RBD dari subunit S1 berinteraksi dengan enzim konversi angiotensin 2 (ACE2), reseptor sel induk utama sehingga memutus interaksi RBD-ACE2 dapat secara efektif mencegah masuknya sel virus SARS-CoV-2^{40,41}.

Mekanisme netralisasi dapat diartikan sebagai mekanisme pemblokiran tahap awal siklus sehingga virus tidak dapat bereplikasi. Mekanisme ini dapat dikategorikan sebagai penghambatan masuknya virus ke dalam sel inang dan memberikan penghambatan setelah ikatan. Mekanisme pertama yaitu NAbs yang berikatan dengan protein permukaan virus sehingga mencegah interaksi dengan reseptor sel inang dan terjadinya infeksi (replikasi). Mekanisme penghambatan yang kedua berupa NAbs yang dapat berikatan dengan epitop protein virus yang berinteraksi dengan ko-reseptor sel inang yang penting untuk infeksi virus. Hal ini dapat dicapai menjadi tiga mekanisme yaitu NAbs melekat pada reseptor virus sehingga mengakibatkan perubahan konformasi pada reseptor virus (**Gambar 1.9(1)**) atau mengakibatkan agregasi dengan beberapa virus sehingga mengurangi atau menghilangkan kemampuan perlengkapan dari virus tersebut (**Gambar 1.9(2)**), atau NAbs mencegah pertemuan virus dengan reseptor sel inang dengan berlekatan pada reseptor virus (**Gambar 1.9(3)**)⁴¹⁻⁴³.

Dalam konteks penghambatan setelah berikatan, mekanisme yang ketiga yaitu NAbs dapat berikatan dengan epitop virus yang tidak penting untuk pengikatan reseptor sel inang tetapi diperlukan untuk perubahan konformasi yang diperlukan untuk fusi membran. Dalam hal ini yaitu transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) or endosomal cysteine proteases cathepsins B (CTSL) and L (CTSB). Varian lain dari mekanisme ini adalah ketika NAbs berikatan dengan protein penting untuk pengikatan reseptor sel inang tetapi Nabs berikatan pada daerah distal epitop pada protein fusigenik sehingga mencegah fusi lengkap dari virus ke sel inang ⁴¹.

Mekanisme netralisasi keempat (**Gambar 1.9(4)**) terjadi setelah virus berada di dalam endosom. Di sini, antibodi menghambat perubahan yang diperlukan untuk fusi membran virus, secara efektif menetralkan virus. Mekanisme netralisasi setelah internalisasi ini sangat penting, terutama untuk virus yang memerlukan internalisasi dan penurunan pH untuk memicu perubahan konformasi dan fusi membran virus. Keempat mekanisme ini dilustrasikan pada **Gambar 1.9** ⁴¹.



Gambar 1.9. Empat Jenis Mekanisme Pencegahan Infeksi dari Virus oleh Neutralizing Antibodies

Diadaptasi dari ⁴¹

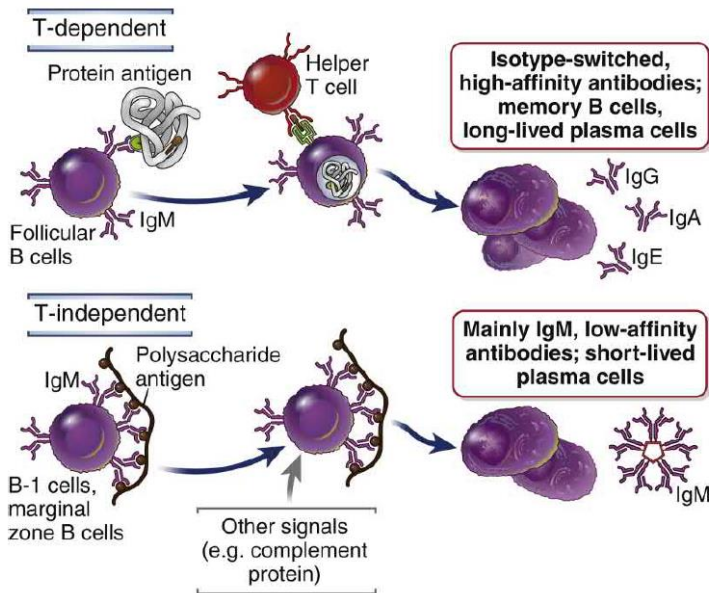
Pembentukan Neutralizing Antibodies (NAbs).

NAb dapat berasal dari sel memori B atau sel plasma, keduanya merupakan produk dari aktivasi sel B oleh paparan antigen, baik itu dari infeksi maupun vaksinasi. Sel memori B dan sel plasma ini adalah bagian dari imunitas humoral jangka panjang. Sel memori B dapat diaktifkan tanpa bantuan sel T, yang disebut juga sebagai respons sel T-independent, atau dengan bantuan sel T. ⁴³

Pada respons sel T-independent, aktivasi sel B tidak memerlukan bantuan dari sel *antigen-presenting cells* (APC) yang diaktifkan oleh sel T pembantu. Biasanya, antigen yang memicu jalur aktivasi ini adalah beberapa antigen non-protein seperti polisakarida dan lipopolisakarida, di mana penyerapan antigen ini oleh reseptor sel B

juga berfungsi sebagai inisiator. Setelah itu, sinyal dari sistem komplemen akan lebih lanjut mengaktifkan proses ini, mengubah sel B menjadi aktif. Reseptor sel B kemudian menghilang karena digantikan oleh bentuk teraktivasi sel B ini, yang berbentuk sel plasma. Sel plasma ini utamanya mengeluarkan IgM sebagai ganti reseptor sel B karena memiliki spesifitas yang sama. Namun, sel plasma ini bersifat sementara (*short-lived plasma cell*) dan memiliki kemampuan memori B yang lebih rendah dibandingkan dengan aktivasi yang dimediasi oleh sel T helper (**Gambar 1.10**)

43.



Gambar 1.10. Proses Aktivasi dari Limfosit B Menjadi *Memory Cell* B dan sel plasma dimana keduanya dapat menjadi *Neutralizing antibody*.

Diadaptasi dari ⁴⁴

Aktivasi sel B oleh sel T helper menyebabkan pembentukan kekebalan humoral jangka panjang, yang melibatkan sel memori B dan sel plasma hidup lama. Aktivasi ini juga dapat terjadi melalui dua mekanisme yang berbeda secara mendasar. Pertama, sel B mengalami aktivasi dan diferensiasi di pusat germinal yang dibantu oleh aktivasi sel T pembantu. Aktivasi sel T pembantu terjadi melalui pengenalan MHC kelas II yang telah memproses antigen yang sebelumnya ditangkap oleh sel B, yang berperan sebagai sel-presentasi antigen (APC). Proses diferensiasi ini menyebabkan peningkatan afinitas sel B terhadap antigen (dibandingkan dengan saat berikatan dengan MHC kelas II) melalui proses yang dikenal sebagai somatic hypermutation yang terjadi di pusat germinal. Selain itu, diferensiasi ini juga menghasilkan fenomena yang dikenal sebagai class switching, di mana IgM pada sel B dapat beralih menjadi IgG, IgA, dll., melalui proses yang disebut class-switch recombination (CSR) ⁴⁵.

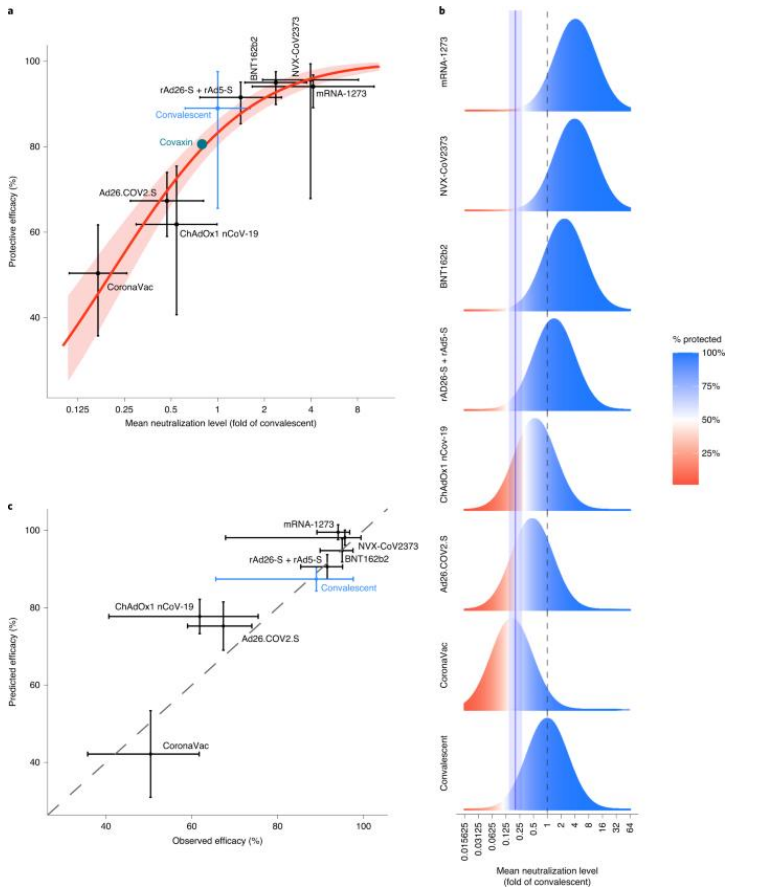
Pada penelitian yang dilakukan oleh Wang et al, ditemukan bahkan populasi Nabs dapat berasal pada kedua sel b memory ataupun long-lived plasma cell. Mereka melaporkan bahwa antibodi yang berasal dari long-lived plasma cell dapat mencegah/menetralkan infeksi dari patogen yang sama. Namun, antibodi tersebut tidak dapat mencegah reinfeksi dari varian oleh patogen. Namun, netralisasi masih dapat tercapai oleh antibody class switching oleh memory b cell terhadap varian mutant ini ^{46,47}.

Perbedaan Pembentukan Antibodi Netralisasi oleh infeksi dan vaksinasi

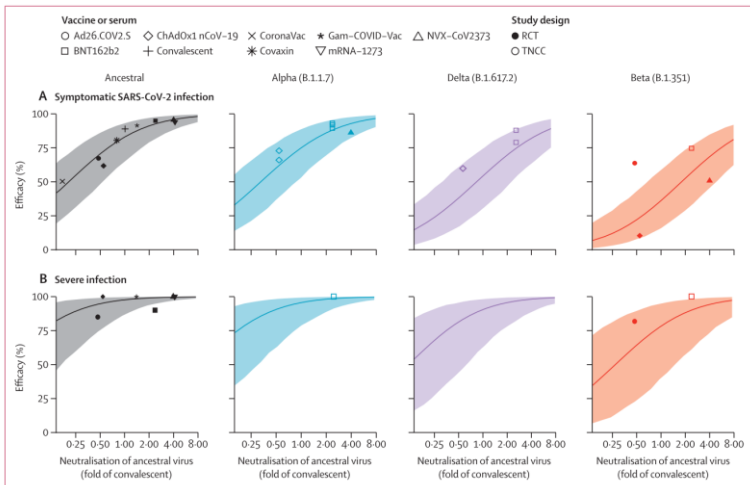
Pembentukan NAbs akibat infeksi terjadi setelah beberapa minggu setelah terjadinya infeksi. Beberapa studi melaporkan hal yang berbeda dimana pembentukan ini dapat terjadi 2 hingga 3 minggu sejak awal munculnya gejala. Lebih lanjut, dilaporkan bahwa tingkat keparahan berkorelasi positif dengan titer antibodi dan efektifitas netralisasi dari antibodi tersebut ^{48,49}. Hal ini mungkin disebabkan oleh stimulasi yang berkepanjangan dari reseptor sel B atau karena produksi interferon tipe I (IFN-I) yang tinggi selama penyakit yang parah. IFN-I memainkan peran penting dalam tahap awal respons imun terhadap virus, dan merupakan bagian dari respons bawaan. Selain itu, IFN-I menginduksi aktivasi sel dendritik dan, oleh karena itu, memungkinkan sel-sel ini untuk menyajikan antigen kepada sel-sel CD4+ dan CD8+ T yang belum tersensitisasi. Sel CD4+ T yang teraktivasi merangsang produksi antibodi spesifik oleh sel B, sedangkan sel CD8+ T bersifat sitolitik. Sehingga kemampuan netralisasi dari antibodi ini dapat menjadi prediktor keparahan pada saat seseorang terkena terinfeksi SARS-COV-2 ⁵⁰.

Jumlah dan kemampuan netralisasi dari antibodi yang dihasilkan oleh vaksinasi sangat beraneka ragam yang ditentukan oleh jenis vaksin yang digunakan. Pada suatu studi yang melakukan modeling prediksi berdasarkan dari beberapa studi, disimpulkan bahwa jenis vaksin mRNA, pemberian subunit, materi genetik dengan viral vektor mempunyai efektifitas yang sangat tinggi dalam menghasilkan NAbs dengan kemampuan netralisasi yang baik. Jenis vaksin dari virus yang diinaktivasi mempunyai efektifitas jauh lebih rendah dibandingkan dengan vaksin dengan tipe lainnya. Efektivitas oleh infeksi dan vaksinasi dapat dilihat pada gambar 8 ⁵¹.

Produksi NAbs dan efektifitasnya juga diketahui dapat menurun seiring waktu. Hal ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor: tingkat keparahan saat terinfeksi, jenis vaksinasi, dan varian atau mutasi dari SARS-CoV-2. Pada studi modeling prediksi dibawah (**Gambar 1.11**), disebutkan bahwa penurunan efikasi dari NAbs sangat tergantung dengan jumlah dan efikasi dari NAbs yang dihasilkan. Sehingga, tingkat keparahan dan jenis vaksin tentunya menentukan penurunan efikasi NAbs ini secara tidak langsung. Selain itu mutasi dari virus ini juga dilaporkan menurunkan efikasi dari NAbs (**Gambar 1.12**). Lebih lanjut, varian Omicron mempunyai kemampuan untuk menghindari NAbs khususnya pada populasi yang belum divaksinasi dengan formulasi terbaru (formulasi berdasarkan Omicron) ⁵².



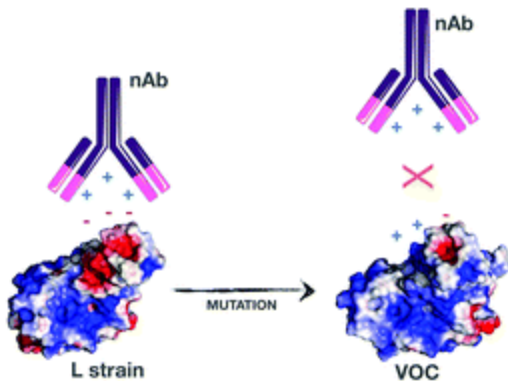
Gambar 1.11. Model Prediksi Imunitas yang Dihasilkan akibat Infeksi dan oleh Beberapa Jenis Vaksin
 Diadaptasi dari ⁵¹.



Gambar 1.12. Prediksi Penurunan Efikasi dari Imunitas Seiring Waktu yang Dipengaruhi oleh Faktor: Keparahan Infeksi Sebelumnya, Jenis Vaksin, dan Mutasi dari Virus
Diadaptasi dari ⁵²

Mutasi Virus SARS-CoV menyebabkan penghindaran (evasion) terhadap Neutralizing Antibodies

Seperti diketahui bahwa mutasi berperan besar terhadap berkurangnya imunitas. Hal ini diakibatkan oleh berkurangnya kemampuan dari sistem imun misalnya antibodi dalam mengenali antigen yang masuk. Seperti yang dijelaskan diatas, umumnya mutasi dari SARS-CoV-2 terjadi pada struktur protein S dimana telah dijelaskan juga bahwa protein ini berperan besar terhadap proses infeksi dan pengenalan respon imun khususnya *neutralizing antibodies*. Mutasi pada RBD dari protein S dapat mengurangi pengikatan antibodi dengan mengubah energi interaksi dan energi *free binding*. Mutasi yang mempunyai tingkat *evasion* yang tinggi biasanya melibatkan perubahan dari residu polar menjadi residu nonpolar, yang dapat langsung mengganggu situs pengikatan antibodi sehingga akan terjadi penurunan afinitas antara antibodi dengan virus.^{53,54}



Gambar 1.13. Ilustrasi Penghindaran *Neutralizing Antibodies* akibat Mutasi.

Pada ilustrasi ini terlihat mutasi mengakibatkan perubahan polaritas pada virus sehingga mengakibatkan menurunnya afinitas antibodi terhadap virus yang bermutasi.⁵⁴

1.3. Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah kadar titer antibodi terhadap WT dan Omicron XBB.1.5 pada individu yang menerima *booster* jika dibandingkan dengan mereka yang tidak menerima *booster*?
2. Bagaimanakah perbedaan kapasitas netralisasi antibodi terhadap WT dan Omicron XBB.1.5 di antara individu yang telah divaksinasi (tanpa dan dengan *booster*)?
3. Bagaimanakah pengaruh riwayat kemungkinan infeksi varian Omicron terhadap titer antibodi dan kapasitas netralisasi?

1.4. Hipotesis

1. Diperkirakan bahwa individu yang telah menerima *booster* vaksin akan menunjukkan kadar antibodi yang lebih tinggi terhadap varian virus asli /WT dan varian Omicron XBB.1.5 dibandingkan dengan mereka yang tidak menerima *booster*, dengan peningkatan yang lebih signifikan terlihat pada kelompok yang menerima dua kali pemberian *booster*.
2. Hipotesis kedua adalah bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dalam kapasitas netralisasi antibodi antara varian virus asli/WT dan varian Omicron XBB.1.5 di antara individu yang telah divaksinasi, dengan individu yang menerima *booster* vaksin cenderung memiliki nilai kapasitas netralisasi yang lebih tinggi, terutama pada kelompok yang menerima dua kali pemberian *booster*.
3. Terakhir, diperkirakan bahwa individu yang memiliki kemungkinan infeksi dengan varian Omicron akan menunjukkan kadar antibodi dan kapasitas netralisasi yang lebih tinggi daripada individu yang tidak memiliki kemungkinan infeksi ini

BAB II

Metode Penelitian

2.1. Desain Penelitian dan Subjek Penelitian

Penelitian ini merupakan studi *cross-sectional* yang dilakukan dengan merekrut individu berdasarkan status vaksinasi mereka, yang diklasifikasikan berdasarkan jumlah suntikan *booster*. Pemilihan sampel dilakukan secara *purposive* di Makassar, ibu kota Provinsi Sulawesi Selatan, dari November 2023 hingga Januari 2024 (Tabel 1). Kriteria inklusi meliputi individu berusia di atas 17 tahun yang telah menerima dua dosis vaksin SARS-CoV-2 yang diinaktivasi, yaitu CoronaVac® dari Sinovac, dengan interval 4 minggu sebagai vaksinasi primer. Studi ini telah disetujui oleh Komite Etik Universitas Hasanuddin (Nomor Persetujuan 182/UN4.6.4.5.31/PP36/2024).

Pengambilan darah dilakukan satu kali setelah subjek menandatangani formulir persetujuan yang diinformasikan. Penelitian ini juga mencatat riwayat vaksinasi dan infeksi sejak Januari 2022. Darah yang terkumpul disentrifugasi di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin untuk pemisahan serum. Semua serum disimpan pada suhu -80°C sebelum digunakan dalam eksperimen selanjutnya.

Tabel 2.1. Pembagian Kelompok Subjek Penelitian berdasarkan Jumlah Vaksin dan Booster yang diterima

	Vaksin	Tipe vaksin	
		Booster pertama	Booster kedua
tidak <i>booster</i> (A)	CoronaVac	-	-
<i>Booster</i> 1 kali (B)	CoronaVac	BNT162b2	-
<i>Booster</i> 2 kali (C)	CoronaVac	BNT162b2	mRNA1273

2.1. Analisis Laboratorium

Semua sampel diukur titer antibodi anti-RBD SARS-CoV-2 IgG dan anti-RBD Omicron XBB.1.5 IgG dengan menggunakan teknik *indirect* ELISA dan aktivitas netralisasi terhadap kedua strain menggunakan uji netralisasi *pseudovirus* .

2.2.1 . Pengukuran Titer Antibodi dengan ELISA

Penelitian ini menggunakan metode *Indirect* ELISA. *Indirect* ELISA pada penelitian ini dilakukan menggunakan protein RBD dari WT dan XBB.1.5 yang tersedia

secara komersial, yang telah diverifikasi melalui *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) sebagai antigen. Protein ini diperoleh dari Sino Biological, dengan nomor katalog #40591-V08H untuk WT dan #40592-V08H146 untuk XBB.1.5. Titer antibodi yang diukur diekspresikan sebagai densitas optik (Optical Density/OD) dari sampel serum.

Prosedur ELISA yang sama dengan penelitian sebelumnya dari grup ini digunakan untuk mengukur OD, yang mencerminkan kemampuan antibodi (Ab) dalam setiap sampel untuk berikatan dengan antigen yang digunakan.⁵⁵ Dalam eksperimen ini, *microplate* 96-well (dengan produk dari Corning, nomor katalog #3590) digunakan sebagai wadah reaksi. *Microplate* ini di-*coating* dengan antigen SARS-CoV-2, baik WT maupun XBB.1.5, masing-masing dengan konsentrasi 0,2 µg/mL. *Coating* dilakukan dengan cara menginkubasi *microplate* semalaman pada suhu 4°C, sehingga antigen dapat menempel pada permukaan dasar dari setiap *well*.

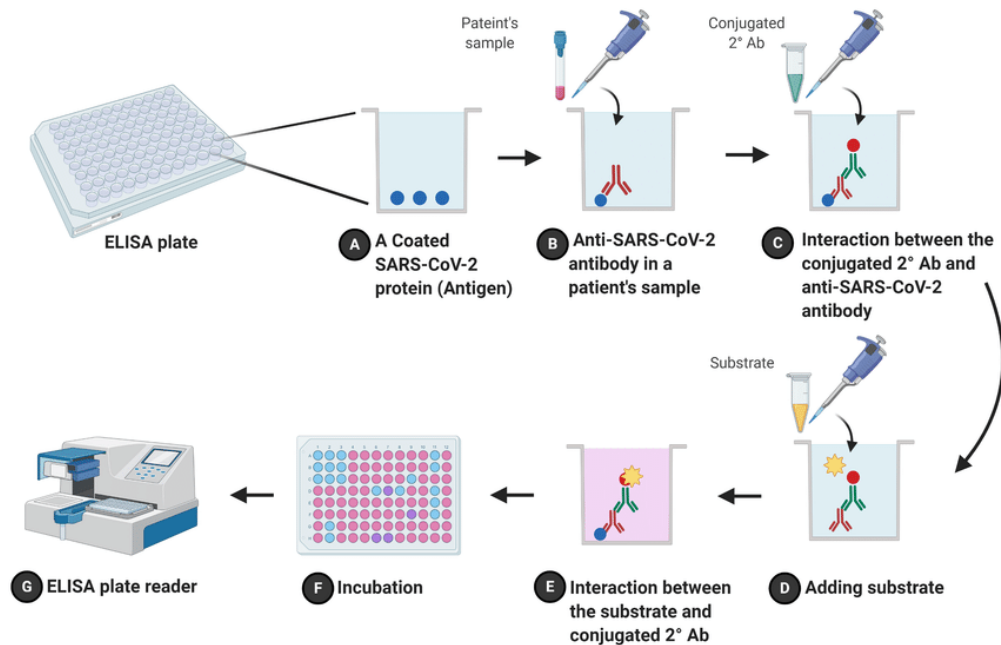
Setelah proses *coating*, pelat harus di-*blocking* untuk mencegah ikatan non-spesifik yang dapat mengganggu hasil. Proses ini dilakukan dengan menambahkan larutan 1% Bovine Serum Albumin/BSA yang dilarutkan dalam PBS (Phosphate-Buffered Saline) dengan pH 7,4 ke setiap *well*, lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. BSA berfungsi menutupi permukaan *well* yang tidak dilapisi oleh antigen, sehingga mencegah protein atau molekul lain dari sampel serum menempel secara non-spesifik pada pelat. Setelah inkubasi, *microplate* dicuci dengan PBS yang mengandung Tween-20 (PBS-T) untuk menghilangkan BSA yang tidak menempel dengan baik.

Selanjutnya, sampel serum yang akan diuji diencerkan dalam PBS yang mengandung 1% BSA dengan rasio pengenceran 1:100. Larutan serum yang telah diencerkan ini kemudian ditambahkan ke *well microplate* dan diinkubasi selama satu jam pada suhu kamar. Dalam proses ini, antibodi dalam serum yang spesifik terhadap antigen (baik WT atau XBB.1.5) akan berikatan dengan antigen yang telah dilapisi pada *well* di *microplate*.

Setelah inkubasi dengan serum, *microplate* kembali dicuci untuk menghilangkan serum yang tidak terikat. Kemudian, *microplate* diinkubasi dengan larutan antibodi sekunder yang telah dikonjugasi dengan enzim horseradish peroxidase (HRP). Antibodi sekunder ini dirancang untuk mengenali dan berikatan dengan domain Fc dari IgG manusia, sehingga hanya antibodi yang telah berikatan dengan antigen yang akan terdeteksi. Inkubasi dengan antibodi sekunder ini berlangsung selama satu jam pada suhu kamar.

Setelah inkubasi, *microplate* dicuci lagi untuk menghilangkan antibodi sekunder yang tidak terikat, dan kemudian ditambahkan substrat enzim ke setiap *well* *microplate* (100 µL per *well*). Substrat ini akan bereaksi dengan HRP, menghasilkan perubahan warna yang dapat diukur. *Microplate* kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar untuk memungkinkan perkembangan warna. Akhirnya, absorbansi diukur pada panjang gelombang 414 nm menggunakan *microplate* reader, dan hasilnya dinyatakan sebagai titer antibodi (Ab), yang menunjukkan seberapa kuat

antibodi dalam serum dapat berikatan dengan antigen yang diuji. Ilustrasi untuk indirect ELISA pada penelitian ini dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1. Prosedur Indirect ELISA

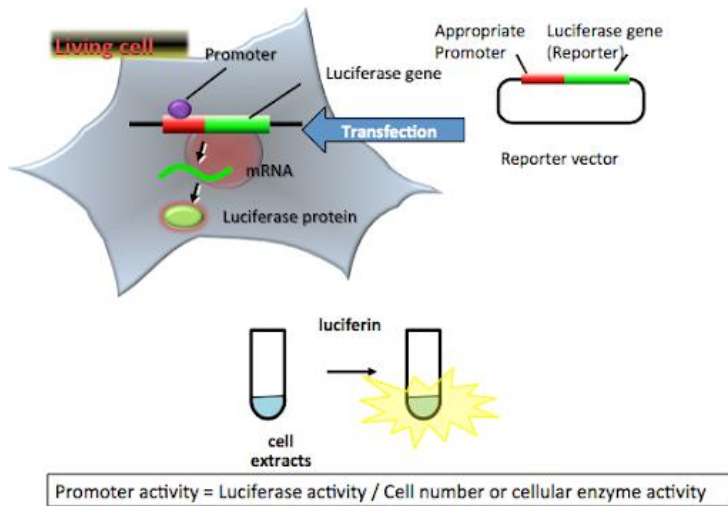
Prosedur Indirect ELISA pada penelitian ini yang dikutip dari ⁵⁶.

2.2.2. Pengukuran Kapasitas Netralisasi metode *Neutralization Assay* dengan *Luciferase Assay*

Prosedur Neutralization Assay

Untuk pengukuran kapasitas netralisasi, digunakan *pseudovirus* berbasis virus vesikular stomatitis (Vesicular Stomatitis Virus, VSV) yang mengekspresikan protein spike dari virus Wuhan-Hu, sebagaimana digunakan dalam penelitian sebelumnya ⁵⁵. Selain itu, *pseudovirus* baru direkayasa khusus untuk penelitian ini, yang mengekspresikan protein spike dari varian Omicron XBB.1.5 pada permukaannya. Pseudovirus ini merupakan virus yang tidak berbahaya dan digunakan untuk meniru perilaku virus asli dalam kondisi laboratorium.

Untuk memudahkan deteksi dan pengukuran, gen *Luciferase* disisipkan ke dalam genom *pseudovirus*. Gen ini memungkinkan *pseudovirus* menghasilkan cahaya (luminesensi) yang dapat diukur, yang nantinya akan digunakan untuk mengevaluasi tingkat infeksi. Ilustrasi tentang fungsi gen *Luciferase* dapat dilihat pada **Gambar 2.2** dibawah.



Gambar 2.2. Proses dan Fungsi Transfeksi gen *Luciferase*.

Gen *Luciferase* yang ditransfeksi (disisipkan) kedalam genom sel atau virus memungkinkan sel atau virus tersebut mengeluarkan cahaya (luminesensi) jika direaksikan dengan reagen luciferin. Pada penelitian ini, gen *Luciferase* di transfeksi kedalam genom *pseudovirus*. Ilustrasi dikutip dari ⁵⁷.

Prosedur uji dimulai dengan penyiapan *microplate* 96-*well*. Dalam setiap *well*, 2 μL serum dari sampel yang diuji diencerkan dalam 48 μL medium kultur sel. Setelah serum diencerkan, 50 μL medium yang mengandung *pseudovirus* dengan konsentrasi $3,2 \times 10^4$ TCID₅₀ per *well* ditambahkan. TCID₅₀ merupakan ukuran konsentrasi virus yang dibutuhkan untuk menginfeksi 50% dari kultur sel yang diuji, yang menunjukkan seberapa banyak virus yang digunakan dalam setiap *well*.

Sebagai kontrol, tiga *well* tidak diberi serum dan hanya diisi dengan medium dan *pseudovirus*. Kontrol ini digunakan untuk menetapkan *baseline*, yaitu tingkat infeksi yang terjadi tanpa adanya antibodi yang dapat menetralkan virus.

Setelah semua komponen ditambahkan, *microplate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Proses inkubasi ini memungkinkan antibodi dalam serum berinteraksi dan, jika efektif, menetralkan *pseudovirus*, sehingga virus tidak dapat menginfeksi sel yang akan ditambahkan kemudian.

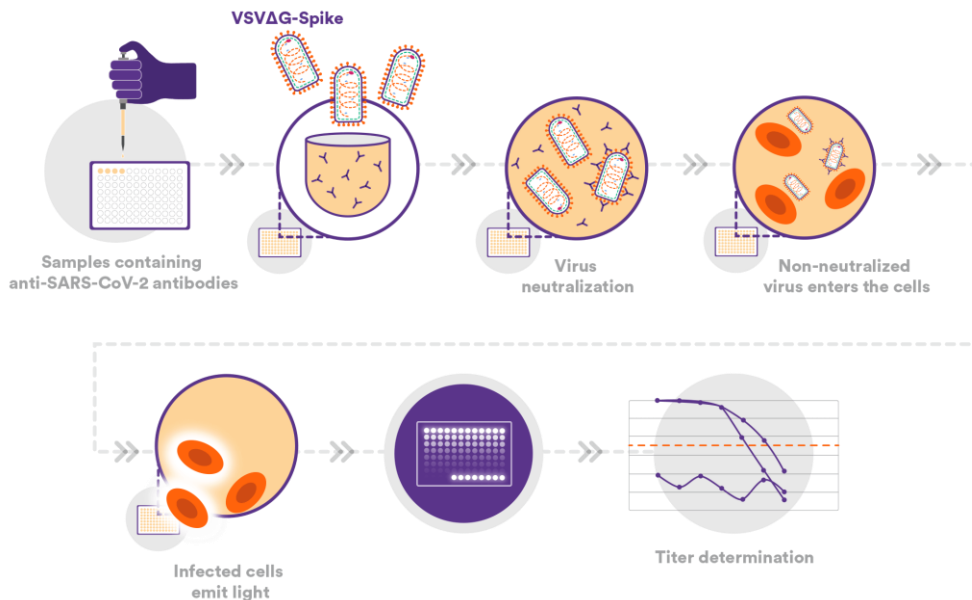
Setelah inkubasi awal, 100 μL medium yang mengandung sel 293T/hACE2+hTMPRSS2 (dengan kepadatan 2×10^4 sel per *well*) ditambahkan ke setiap *well*. Sel 293T merupakan sel manusia yang telah dimodifikasi untuk mengekspresikan reseptor ACE2 dan protease TMPRSS2, yang diperlukan oleh virus SARS-CoV-2 (dan *pseudovirus* yang digunakan) untuk memasuki sel. Sel ini digunakan untuk mengukur seberapa banyak *pseudovirus* yang berhasil menginfeksi setelah terpapar serum.

Microplate kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, memberikan waktu bagi *pseudovirus* yang tidak dinetralkan oleh antibodi untuk menginfeksi sel 293T.

Setelah periode inkubasi, Sistem Uji *Luciferase* ONE-Glo EX™ (Promega, Madison, WI, USA) digunakan untuk mengukur tingkat infeksi. Sistem ini mendeteksi luminesensi yang dihasilkan oleh gen *Luciferase* dalam *pseudovirus*. Tingkat cahaya yang dihasilkan menunjukkan seberapa banyak *pseudovirus* yang berhasil menginfeksi sel atau disebut kemampuan internalisasi dari virus. Semakin rendah tingkat luminesensi, semakin efektif antibodi dalam serum menetralkan *pseudovirus*.

Perhitungan Nilai Internalisasi Virus dan Kapasitas Netralisasi Serum

Hasil pembacaan dari Sistem Uji *Luciferase*, merupakan kemampuan internalisasi virus, dihitung dengan membandingkan luminesensi pada *well* yang mengandung serum dengan luminesensi pada *well* kontrol (yang tidak mengandung serum). Lebih lanjut, untuk mengukur kemampuan netralisasi dari serum, Nilai Netralisasi (NC) dari serum dinyatakan sebagai 100% dikurangi persentase internalisasi virus, yang mencerminkan kemampuan serum untuk menetralkan *pseudovirus*. Misalnya, jika luminesensi pada *well* dengan serum hanya 30% dari kontrol, ini menunjukkan bahwa serum memiliki kemampuan untuk menetralkan 70% dari virus yang ada, menghasilkan nilai NC sebesar 70%. Netralisasi dihitung sebagai $100\% - \% \text{ internalisasi}$. Ilustrasi untuk uji netralisasi disajikan pada **Gambar 2.3**.



Gambar 2.3. Ilustrasi Prosedur Pengukuran Kapasitas Netralisasi Prosedur pengukuran kapasitas netralisasi pada penelitian ini yang dikutip dari ⁵⁸.

2.3. Analisis Data

Analisis statistik dilakukan menggunakan GraphPad Prism versi 10.0 untuk Mac OS. Uji Kruskal-Wallis dengan uji perbandingan ganda Dunn digunakan untuk analisis kelompok. Perbandingan antara dua kelompok dilakukan dengan uji Mann-Whitney U. Analisis korelasi Spearman dan analisis regresi non-linear digunakan untuk menganalisis korelasi antara densitas optik (OD) dan persentase internalisasi ataupun netralisasi. Nilai $p < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik.