

# Buku COVID dan NETs

*by Phey Liana*

---

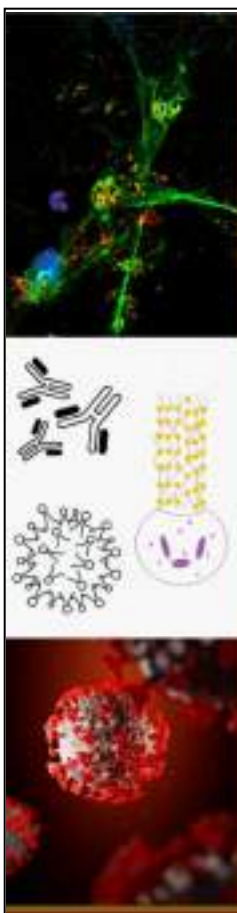
**Submission date:** 05-Oct-2022 08:07PM (UTC+0700)

**Submission ID:** 1917287518

**File name:** Full\_buku\_OK.pdf (2.98M)

**Word count:** 21401

**Character count:** 131089



# Covid-19: Aspek Virologi, Imunitas dan Inflamasi

Covid-19: Aspek Virologi, Imunitas dan Inflamasi



Phey Liana

**COVID-19:  
ASPEK VIROLOGI, IMUNITAS DAN  
INFLAMASI**

**Sanksi Pelanggaran Pasal 72  
Undang-undang Nomor 19 Tahun 2002**

**Tentang Perubahan atas Undang-Undang Nomor 12 Tahun 1997  
Pasal 44 Tentang Hak Cipta**

1. Barang siapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) atau Pasal 49 ayat (1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp. 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah)
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan atau menjual kepada umum suatu Ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah)

**COVID-19:  
ASPEK VIROLOGI, IMUNITAS DAN  
INFLAMASI**

**Phey Liana**

**Editor**

Phey Liana

Krisna Murti

Zen Hafy

Iche Andriyani Liberty

Tungki Pratama Umar



# **COVID-19: ASPEK VIROLOGI, IMUNITAS DAN INFLAMASI**

Phey Liana

UPT. Penerbit dan Percetakan  
Universitas Sriwijaya 2022  
Kampus Unsri Palembang  
Jalan Srijaya Negara, Bukit Besar Palembang 30139  
Telp.0711-360969  
Email : [unsri.press@yahoo.com](mailto:unsri.press@yahoo.com), [penerbitunsri@gmail.com](mailto:penerbitunsri@gmail.com)  
Website : [www.Unsri.Unsripress.ac.id](http://www.Unsri.Unsripress.ac.id)

Anggota APPTI No.005.140.1.6.2021  
Anggota IKAPI No. 001/SMS/96

Cetakan pertama, Agustus 2022  
xiii + 104 halaman : 16 x 24 cm

Hak cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun, baik secara elektronik maupun mekanik, termasuk memfoto, merekam, atau dengan menggunakan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari penerbit.

Hak Terbit Pada Unsri Press

**ISBN: 978-623-399-073-8**

## **PENULIS**

**dr. Phey Liana, Sp.PK**

Bagian/KSM Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium

Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang

## **TIM EDITOR**

**dr. Phey Liana, Sp.PK**

Bagian/KSM Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium  
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya  
RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang

**dr. Krisna Murti, Sp.PA(K), M.Biotech. Stud., Ph.D**

Bagian/KSM Patologi Anatomi,  
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya  
RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang

**Dr. dr. Zen Hafy, M. Biomed**

Program Studi Biomedik,  
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya  
RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang

**Dr. Iche Andriyani Liberty, S.KM, M.Kes**

Bagian Ilmu Kesehatan Masyarakat  
dan Ilmu Kedokteran Komunitas  
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

**dr.Tungki Pratama Umar**

Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya



## PRAKATA

Dunia sedang menghadapi kondisi pandemi yang disebabkan oleh virus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) dengan penyakit yang dinamai *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19). Setelah lebih dari dua tahun berkuat dengan kondisi tersebut, yang menimbulkan berbagai dampak pada kehidupan umat manusia, sejumlah keilmuan baru telah berkembang dan membuat pemahaman akan penyakit tersebut bertambah besar. Dalam bidang kedokteran, pengetahuan mengenai penyakit ini merambah baik pada aspek klinis (perjalanan penyakit, tampilan klinis dan berbagai pemeriksaannya) bahkan aspek molekuler seperti virologi dan penanda spesifiknya.

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, pendekatan terhadap COVID-19 bersifat multisektoral. Pada bidang kedokteran, pendekatan klinis sangat penting untuk diteliti karena berkaitan dengan luaran pasien. Namun demikian, mekanisme yang mendasarinya juga perlu diteliti lebih lanjut. Selain itu, pemeriksaan laboratorium yang menjadi primadona harus diketahui dengan tepat. Hal tersebut tidak terbatas dari pemeriksaan penanda laboratorium tertentu saja, namun juga harus meliputi cara penanganan sampel agar dapat diperiksa dengan optimal dan mencegah terjadinya penyebaran penyakit akibat proses penanganan yang tidak sesuai standar operasional prosedur yang berlaku.

Berkaca pada dinamika yang ditimbulkan oleh COVID-19 dan bahasannya yang tidak pernah usai, dibutuhkan literatur tambahan untuk membantu menggambarkan kondisi ini, khususnya dalam segi pendekatan kedokteran. Dengan kondisi tersebut, penulis melaksanakan penulisan buku "COVID-19: Aspek Virologi, Imunitas dan Inflamasi." Buku ini bertujuan untuk menjadi referensi tambahan dan sumber pengetahuan tambahan yang meringkas berbagai aspek esensial yang penting untuk diketahui, khususnya mengenai

penanganan COVID-19 karena pokok bahasan buku ini yang tidak hanya terbatas pada pengenalan virus dan tampilan klinisnya.

Penulis berharap buku referensi ini dapat memberikan manfaat dan menjadi sumber bacaan baik bagi para civitas akademika, peneliti, maupun dokter yang terjun langsung dalam menghadapi pandemi COVID-19 ini. Penulis juga terbuka akan berbagai saran dan masukan untuk perbaikan penulisan buku di masa depan. Tak lupa penulis menghaturkan ucapan terima kasih pada semua pihak yang telah turut berkontribusi dan penulisan dan penyusunan buku referensi ini.

Palembang, Juli 2022

TTD

Penulis

## DAFTAR SINGKATAN

ACE-2	: <i>Angiotensin Converting Enzyme-2</i>
aCL	: <i>antikardiolipin</i>
ANCA	: <i>anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i>
APTT	: <i>Activated Partial Thromboplastin Time</i>
ARDS	: <i>Acute respiratory disease syndrome</i>
ALC	: <i>absolute lymphocyte count</i>
ALT	: <i>alanine aminotransferase</i>
AST	: <i>aspartate aminotransferase</i>
AT	: <i>antitrombin</i>
AUC	: <i>Area under curve</i>
BKB1R	: <i>bradykinin receptor B1</i>
BMI	: <i>Body Mass Index</i>
BUN	: <i>Blood Urea Nitrogen</i>
C3	: <i>komplemen komponen 3</i>
C5	: <i>komplemen komponen 5</i>
CCI	: <i>Charlson comorbidity index</i>
CCL2	: <i>Chemokine (C-C Motif) Ligand 2</i>
CCL5	: <i>Chemokine (C-C Motif) Ligand 5</i>
CSS	: <i>scoring system of COVID-19</i>
CD4	: <i>Cluster Differentiation 4</i>
CD8	: <i>Cluster Differentiation 8</i>
CD38	: <i>Cluster Differentiation 38</i>
CDC	: <i>Center of Disease Control</i>
CEACAM1	: <i>Carcinoembryonic antigen-related Cell Adhesion Molecule 1</i>
cfDNA	: <i>cell free-DNA</i>
CFR	: <i>Case Fatality Rate</i>
CI	: <i>Confidence Interval</i>
CK-MB	: <i>Creatine kintase-myocardial band isoenzyme</i>
COVID-19	: <i>Coronavirus disease 2019</i>
COPS	: <i>COVID-19 prognosis score</i>
CPAP	: <i>continuous positive airway pressure</i>
CRP	: <i>C-Reactive Protein</i>
CRS	: <i>Cytokine Release Syndrome</i>
CT Scan	: <i>Computerized Tomography Scan</i>
CT value	: <i>Cycle Treshold value</i>
CXCL1	: <i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1</i>
CXCL5	: <i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 5</i>
CXCL8	: <i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 8</i>
DABK	: <i>des-Arg9 bradykinin</i>
DAMP	: <i>damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	: <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DIC	: <i>Disseminated intravascular coagulation</i>

DMVs	: <i>Double Membrane Vesicles</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase I	: <i>Deoxyribonuclease I</i>
DNase1L3	: <i>Deoxyribonuclease 1-like 3</i>
GAS6	: <i>growth arrest specific protein 6</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GSAID	: <i>Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data</i>
HIF-1 $\alpha$	: <i>Hypoxia-Inducible Factor-1<math>\alpha</math></i>
his-DNA	: <i>histon DNA</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA-DR	: <i>Human Leukocyte Antigen-DR</i>
HR	: <i>hazard Ratio</i>
H3cit	: <i>Citrullinated histone H3</i>
HWF	: <i>Hierarchically well formulated</i>
ICU	: <i>Intensive Care Unit</i>
IFN $\gamma$	: <i>Interferon <math>\gamma</math></i>
IgA	: <i>Imunoglobulin A</i>
IgG	: <i>Imunoglobulin G</i>
IgM	: <i>Imunoglobulin M</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-1 $\beta$	: <i>Interleukin-1 beta</i>
IL-2	: <i>Interleukin-2</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-8	: <i>Interleukin-8</i>
IL-17A	: <i>Interleukin-17 Alfa</i>
IRF3	: <i>interferon regulatory transcription factor-3</i>
ISARIC	: <i>International Severe Acute Respiratory and emerging Infections Consortium</i>
IVIG	: <i>Intravenous Immunoglobulin Therapy</i>
LA	: <i>Lupus antikoagulan</i>
LDH	: <i>Lactat dehydrogenase</i>
LDIB	: <i>low-density inflammatory band</i>
LGALS9	: <i>locus for the transcript soluble galactoside-binding lectin 9</i>
LPS	: <i>lipopolisakarida</i>
MCP-1	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
MERS	: <i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
MERS-CoV	: <i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
MIP-2	: <i>Macrophage Inflammatory Protein-2</i>
MOI	: <i>multiplicities of infection</i>
MPO	: <i>myeloperoxidase</i>
MPO-DNA	: <i>myeloperoxidase-DNA</i>
mRNA	: <i>Messenger RNA</i>
NAAT	: <i>Nucleic Acid Amplification Test</i>
NADPH	: <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphute</i>
NE	: <i>Neutrofil elastase</i>

NETs	: <i>neutrophil extracellular traps</i>
NK Cell	: <i>Natural Killing Cell</i>
NLR	: <i>Neutrofil limfosit rasio</i>
NO	: <i>nitric oxide</i>
NOX	: <i>NADPH oksidase</i>
ORF	: <i>Open Reading Frame</i>
PAD4	: <i>Peptidylarginine Deaminase 4</i>
PAF	: <i>Platelet activating factor</i>
PAMPs	: <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PaO <sub>2</sub>	: <i>Partial pressure of O<sub>2</sub></i>
PC	: <i>Protein C</i>
PEEP	: <i>Posiive End Expiratory Pressure</i>
PF4	: <i>Platelet factor 4</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PMA	: <i>phorbol myristate acetate</i>
PPI	: <i>Program pengendalian infeksi</i>
PPOK	: <i>Penyakit Paru Obstruktif Kronik</i>
PS	: <i>Protein S</i>
PT	: <i>Prothrombin Time</i>
RLR	: <i>RIG-I-like receptor</i>
ROC	: <i>Receiver Operating Characteristic</i>
rt-RT PCR	: <i>Real time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SARI	: <i>Severe Acute Respiratory Infection</i>
SARS	: <i>Severe acute respiratory syndrome</i>
SARS-CoV-2	: <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
sAXL	: <i>soluble AXL receptor tyrosine kinase</i>
SEM	: <i>Scanning electron microscope</i>
SIRS	: <i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SpO <sub>2</sub>	: <i>Saturasi Oksigen</i>
STEMI	: <i>ST segment elevation myocardial infarction</i>
TAT	: <i>Trombin-antitrombin</i>
T <sub>c</sub>	: <i>T cytotoxic</i>
TCM	: <i>Tes cepat molekuler</i>
TEM	: <i>transmission electron microscope</i>
TF	: <i>Tissue factor</i>
Th	: <i>T helper</i>
TLR	: <i>Toll-like receptor</i>
5-RSS2	: <i>Transmembran Protease Serin 2</i>
α	: <i>Tumour Necrotizing Factor α</i>
VoC	: <i>Variant of concern</i>
VoI	: <i>Variant of interest</i>
vWF	: <i>faktor Von Willebrand</i>
WGS	: <i>Whole Genome Sequencing</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
WBC	: <i>White blood cell</i>

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	iii
PENULIS	v
TIM EDITOR	vi
PRAKATA	vii
DAFTAR SINGKATAN	ix
DAFTAR ISI	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
Struktur virus, taksonomi, dan filogeni SARS CoV-2	1
Proses Replikasi SARS CoV-2	6
Kesimpulan	8
Daftar Pustaka	9
BAB II VARIAN SARS-COV-2: JENIS, PROSES MUTASI, DAMPAK DAN METODE DETEKSI	10
Jenis Varian SARS CoV-2	10
Mekanisme Terbentuknya Varian	22
Deteksi Varian	29
Skrining Varian	34
Kesimpulan	40
Daftar Pustaka	40
BAB III ETIOPATOGENESIS COVID-19	46
Kesimpulan	52
Daftar Pustaka	52
BAB IV DIAGNOSIS INFEKSI SARS-COV-2	54
Anamnesis dan Pemeriksaan Fisik	54
Pemeriksaan Laboratorium	57
Kesimpulan	64
Daftar Pustaka	64
BAB V PRA-ANALITIK DAN PEMERIKSAAN SAMPEL PADA INFEKSI SARS-COV-2	67
Jenis Uji dan Teknis Pemeriksaan Sampel	67
Pengambilan, Pengemasan dan transportasi sampel	72
Kesimpulan	77
Daftar Pustaka	77

<b>BAB VI <i>NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETS)</i></b>	
<b>DAN KAITANNYA DENGAN COVID-19</b>	<b>79</b>
Struktur dan Sintesis NETs	79
Pemeriksaan NETs	85
NETs dan Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)	89
Kesimpulan	98
Daftar Pustaka	99

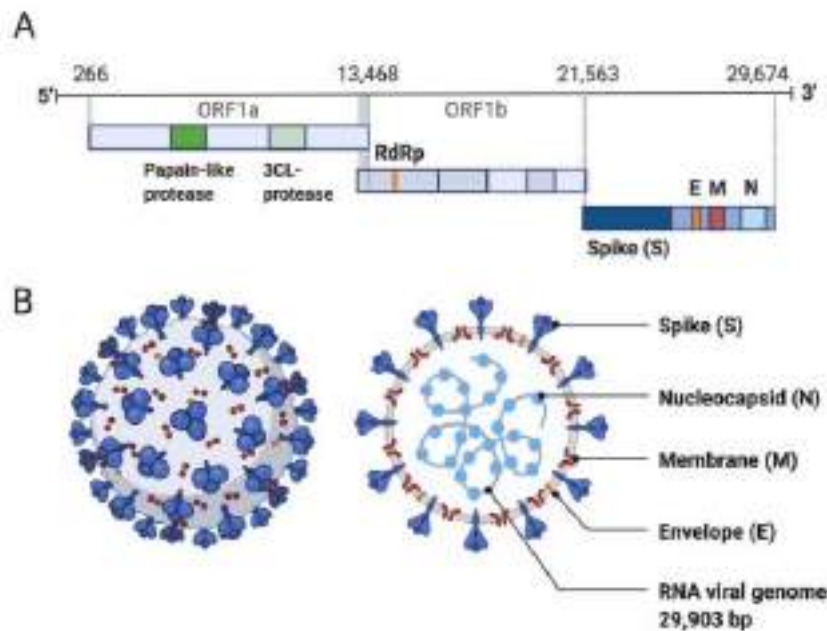
## BAB I PENDAHULUAN

SARS-CoV-2 sebagai penyebab COVID-19 merupakan salah satu virus yang termasuk ke dalam famili Coronaviridae (Coronavirus). Famili ini dicirikan dengan bahan genetik berupa *ribonucleic acid* (RNA) untai tunggal positif, memiliki kapsul dan tidak bersegmen. Terdapat empat struktur protein struktural utama yang membentuk virus dari famili tersebut, yaitu protein N (nukleokapsid), glikoprotein M (membran), glikoprotein S (*spike*), dan protein E (*envelope*).<sup>1</sup>

### Struktur virus, taksonomi, dan filogeni SARS-CoV-2

Proses virulensi Coronavirus berkaitan dengan protein struktural dan protein non struktural yang dimiliki. Virus Corona menyediakan messenger RNA (mRNA) yang dapat membantu proses translasi dari proses replikasi/transkripsi. Gen yang berperan dalam proses replikasi/transkripsi ini mencakup 2/3 dari rangkaian RNA 5'-end dan dua *Open Reading Frame* (ORF) yang tumpang tindih, yaitu ORF1a dan ORF1b. Bagian 1/3 lainnya dari rangkaian RNA virus, yang tidak berperan dalam proses replikasi/transkripsi, berperan dalam mengkode 4 protein struktural.<sup>2</sup> Protein *spike* (protein S) akan berikatan dengan reseptor inang dan menjadi jalan masuk virus ke dalam sel, terutama dengan adanya *receptor binding domain* (RBD). Sementara itu, protein E pada virus memiliki peran krusial pada patogenitas virus. Protein E akan memicu pengumpulan dan pelepasan virus.<sup>3</sup> Struktur virus SARS-CoV-2 ditampilkan pada Gambar 1.



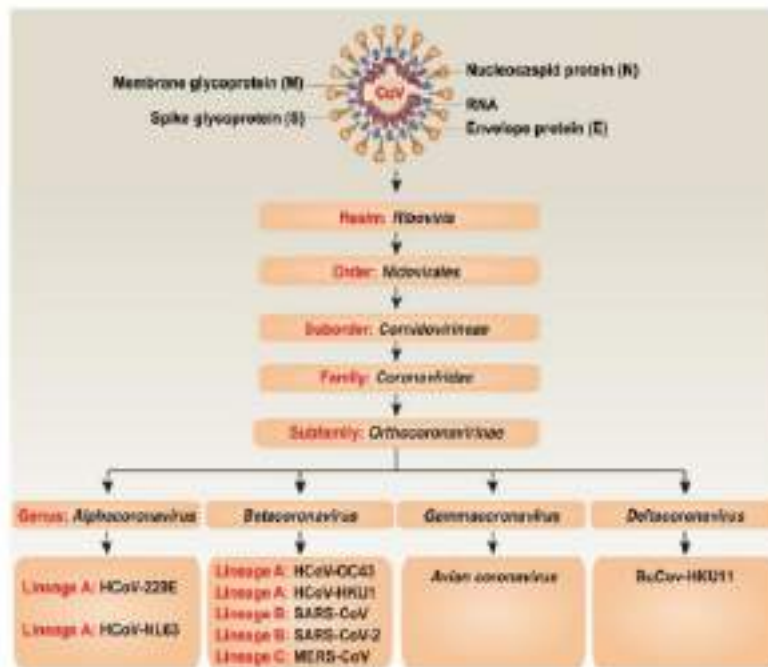


Gambar 1. Struktur kapsid dan genom SARS-CoV-2.<sup>4</sup>

(A) Struktur genomik Coronavirus terdiri atas tiga regio utama. *Open reading frames* (ORFs) 1a dan 1b yang mengandung dua poliprotein yang mengkodekan protein nonstruktural (nsp). Protein tersebut mengandung enzim seperti RNA polymerase dependen RNA (RdRp). Sementara, sisa 1/3 bagian mengandung protein structural, yaitu *spike* (S), *envelope* (E), *membrane* (M), dan nukleokapsid (N) proteins. (B) Struktur fisik virion Coronavirus, termasuk komponen yang ditentukan oleh protein structural S, E, M, dan N.

Dalam klasifikasi lebih lanjut, Coronavirus dapat digolongkan ke dalam ordo Nidovirales. Virus tersebut dapat mengakibatkan berbagai penyakit baik pada hewan (zoonosis) seperti kelelawar dan pangolin, maupun pada manusia. Saat ini terdapat empat genus Coronavirus yang telah diidentifikasi, yaitu *alphacoronavirus*, *betacoronavirus*, *gammacoronavirus*, dan *deltacoronavirus*. SARS-CoV-2 tergolong ke dalam genus *betacoronavirus*, serupa dengan

wabah terdahulu seperti *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) dan *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) (betacoronavirus).<sup>1</sup> Skema ringkas mengenai klasifikasi Coronavirus (taksonomi) ditampilkan pada Gambar 2. Sementara itu, perbandingan utama antara SARS-CoV, MERS-CoV, dan SARS-CoV-2 ditampilkan pada Tabel 1.



Gambar 2. Skema Coronavirus dan klasifikasi taksonomi.<sup>5</sup>

Tabel 1. Perbandingan Kasus COVID-19, MERS, dan SARS.<sup>5</sup>

Parameter	COVID-19 (SARS-CoV-2)	MERS (MERS-CoV)	SARS (SARS-CoV)
<b>Epidemiologi</b>			
Waktu penemuan pertama	Desember 2019	Juni 2012	November 2002
Tempat penemuan	Wuhan, RRC	Jeddah, Arab Saudi	Fushan, RRC
Riwayat perjalanan	Ya	Ya	Ya
Kasus konfirmasi	434.097.166 (27-2-2022)	2.494	8.096
Kasus kematian	5.943.604 (1,37%; 27-2-2022)	858 (34%)	744 (9,2%)
Penyebaran	Hewan ke manusia, kemudian menyebar manusia ke manusia	Hewan ke manusia, kemudian menyebar manusia ke manusia	Hewan ke manusia, kemudian menyebar manusia ke manusia
Transmisi utama	<i>Airborne</i> , kontak	<i>Airborne</i> , kontak	<i>Airborne</i> , kontak
Transmisi dari pasien ke tenaga kesehatan	Ya	Ya	Ya
Periode epidemik (bulan)	Masih berlangsung	>39	8
Risiko kontrol infeksi	Tinggi	Tinggi	Tinggi
Status saat ini	Aktif	Sedikit kasus baru	Kasus baru (-)
Masa inkubasi (hari)	4-7	2-15	2-14
Tingkat infeksius, angka reproduksi dasar ( $R_0$ )	1,4-6,47	0,3-1,3	2,2-3,7
<b>Virologi</b>			
Hospes alami	Kelelawar	Kelelawar	Kelelawar
Hospes intermediet	Pangolin	Unta	Musang
Hospes manusia	SARS-CoV-2	MERS-CoV	SARS-CoV
Garis keturunan	Beta-CoV <i>lineage</i> B	Beta-CoV <i>lineage</i> C	Beta-CoV <i>lineage</i> B
Ukuran genom	29,9 kb	30,1 kb	27,9 kb
Reseptor yang digunakan	ACE2	DPP4	ACE2

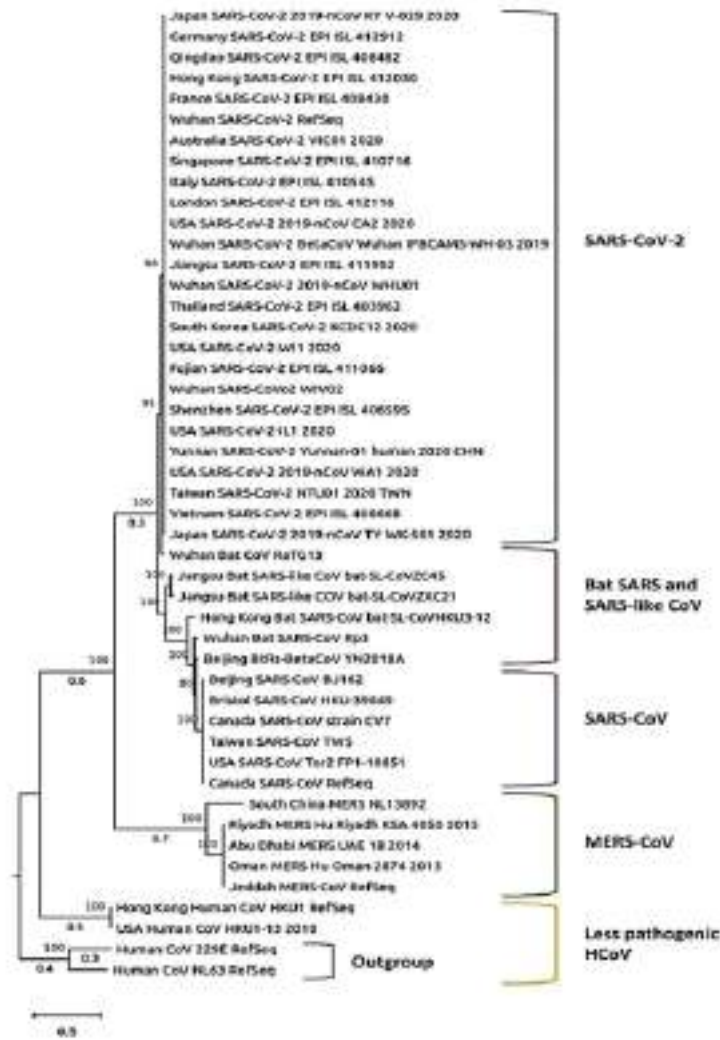
Tabel 1. Perbandingan Kasus COVID-19, MERS, dan SARS (Lanjutan).<sup>5</sup>

Parameter	COVID-19 (SARS-CoV-2)	MERS (MERS-CoV)	SARS (SARS-CoV)
<b>Tampilan klinis</b>			
Gejala utama	Demam, batuk, mudah lelah, sesak nafas, gejala gastrointestinal	Demam, batuk, mudah lelah, sesak nafas, gagal ginjal akut	Demam, batuk, mudah lelah, sesak nafas
Temuan laboratorium	Hitung sel darah abnormal, koagulasi abnormal, disfungsi organ, badai sitokin		
CT scan	Bayangan <i>patchy</i> bilateral atau kekeruhan <i>ground glass</i> pada paru-paru		
Kasus berat	Sepsis dan syok sepsis		
<b>Tatalaksana klinis</b>			
Prinsip pendekatan	Terapi suportif awal dan pemantauan berkala	Terapi suportif awal dan pemantauan berkala	Terapi suportif awal dan pemantauan berkala
Terapi spesifik	Tidak (namun beberapa sudah diuji coba dan diimplementasikan dalam berbagai pedoman), seperti Molnupiravir	Tidak	Tidak
Vaksin	Ada	Tidak	Tidak
Prinsip pendekatan	Terapi suportif awal dan pemantauan berkala	Terapi suportif awal dan pemantauan berkala	Terapi suportif awal dan pemantauan berkala

Catatan: Data disesuaikan dengan perkembangan situasi COVID-19, terdapat sejumlah modifikasi.

Betacoronavirus pada umumnya memiliki bentuk yang bundar dengan beberapa pleomorfik. Diameternya antara 60-140 nm. Berdasarkan analisis filogenetik, virus ini termasuk ke dalam subgenus Sarbecovirus, seperti coronavirus yang menyebabkan SARS pada 2002-2004 silam. Berdasarkan hal inilah *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* memberikan nama SARS-

CoV-2 bagi virus penyebab COVID-19.<sup>1</sup> Struktur filogeni virus ini ditampilkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Pohon filogeni berdasarkan sekuens genom 48 Coronavirus dari 18 negara. Filogeni tersebut meliputi SARS-CoV-2, SARS-CoV, *human coronavirus* (HCoV), *bat SARS* (SARS kelelawar), *SARS-like CoV*, dan MERS-CoV.<sup>6</sup>

7

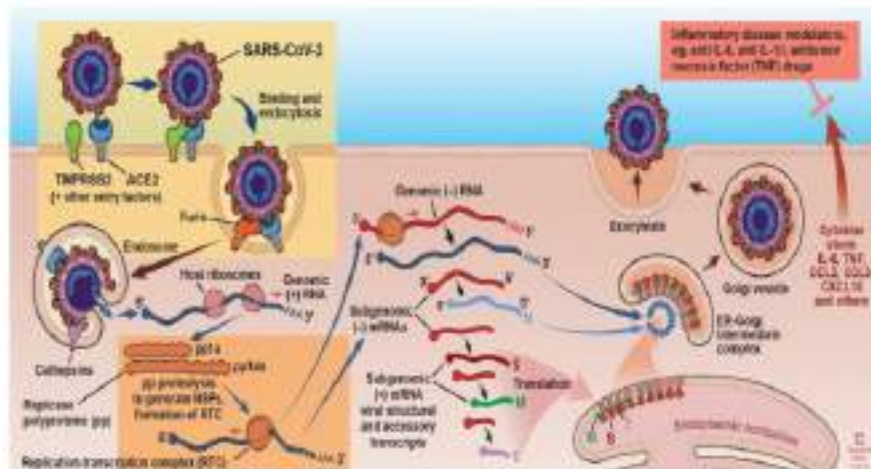
### Proses replikasi SARS CoV-2

Proses replikasi SARS-CoV-2<sup>7</sup> mulai dengan masuknya virus melalui ikatan dengan reseptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) dan pembelahan oleh enzim protease serin TMPRSS2. Tahapan tersebut<sup>7</sup> memungkinkan fusi bahan genetik virus dengan membran inang. Protease seluler lainnya, seperti furin memfasilitasi masuknya virus yang prosesnya bergantung pada pH melalui jalur endositik. Jalur masuk yang dominan bersifat spesifik antar sel dan bergantung pada ketersediaan protease tertentu.<sup>7</sup>

7

Pasca pelepasan membran (*uncoating*) dan pelepasan RNA virus ke dalam sitoplasma, translasi open reading frame 1a (ORF1a<sup>7</sup>) dan ORF1ab menghasilkan poliprotein ppla dan pplab. Hal ini diproses oleh protease virus (dikodekan oleh ORF1a) untuk menghasilkan 16<sup>7</sup> protein nonstruktural. Pembentukan kompleks replikasi-transkriptase (replicase-transcriptase complex, RTC) RNA menggunakan membran yang dihasilkan oleh retikulum endoplasma (ER) kasar. RTC mendorong sintesis RNA negatif. Salinan penuh RNA negatif dari genom menyediakan template untuk pembentukan genom lengkap RNA positif. Transkripsi selanjutnya menghasilkan subset RNA subgenomik, termasuk yang mengkodekan semua protein struktural dan aksesoris. Protein struktural yang diterjemahkan dan RNA genomik dirakit ke dalam nukleokapsid virus dan envelope pada kompartemen perantara retikulum endoplasma-Golgi, dan kemudian dilepaskan secara eksositosis. Proses replikasi virus SARS-CoV-2 ditampilkan pada Gambar 4.<sup>7</sup>





Gambar 4. Skema replikasi SARS-CoV-2.<sup>7</sup>

## Kesimpulan

Virus SARS-CoV-2 sebagai penyebab pandemi COVID-19 merupakan organisme yang tergolong dalam kelompok Betacoronavirus. Secara umum, struktur virus ini serupa dengan pendahulunya seperti SARS-CoV dan MERS-CoV, dengan adanya empat protein struktural utama, yaitu protein N (nukleokapsid), glikoprotein M (membran), glikoprotein S (*spike*), dan protein E (*envelope*). Replikasi dan invasi virus ini sangat bergantung pada reseptor ACE2 yang dapat dijumpai pada berbagai jaringan tubuh manusia.

## Daftar Pustaka

1. Eff ARY. SARS-Cov-2: Virologi dan Target Obat. *Arch Pharm*. 2021;3(2):73–85.
2. Fitriani NI. Tinjauan pustaka Covid-19: virologi, patogenesis, dan manifestasi klinis. *J Med Malahayati*. 2020;4(3):194–201.
3. Di Gennaro F, Pizzol D, Marotta C, Antunes M, Racalbuto V, Veronese N, et al. Coronavirus diseases (COVID-19) current status and future perspectives: a narrative review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(8):2690.
4. Li C, He Q, Qian H, Liu J. Overview of the pathogenesis of COVID-19. *Exp Ther Med*. 2021;22(3):1011.
5. Tang D, Comish P, Kang R. The hallmarks of COVID-19 disease. *PLoS Pathog*. 2020;16(5):e1008536.
6. Helmy YA, Fawzy M, Elawad A, Sobieh A, Kenney SP, Shehata AA. The COVID-19 pandemic: a comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. *J Clin Med*. 2020;9(4):1225.
7. Bergmann CC, Silverman RH. COVID-19: Coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Cleve Clin J Med*. 2020;87(6):321–7.



## **BAB II**

### **VARIAN SARS-COV-2: JENIS, PROSES MUTASI, DAMPAK DAN METODE DETEKSI**

Semua virus, termasuk SARS-CoV-2 dengan proses penyebaran dan perkembangannya sangat berpotensi mengalami diversifikasi akibat perubahan genetik yang terjadi, terutama terkait dengan mutasi.<sup>1,2</sup> Mutasi dapat berkembang melalui interaksi dengan mutagen eksternal seperti radiasi ultraviolet, ion logam, maupun faktor internal yang mampu mengubah struktur genetik SARS-CoV-2.<sup>3</sup> Perubahan tersebut bermanifestasi pada terbentuknya sejumlah varian yang berpotensi menimbulkan perubahan baik pada struktur virus, gejala klinis, tingkat keparahan, maupun tingkat kemampuan deteksinya.

#### **Jenis Varian SARS-CoV-2**

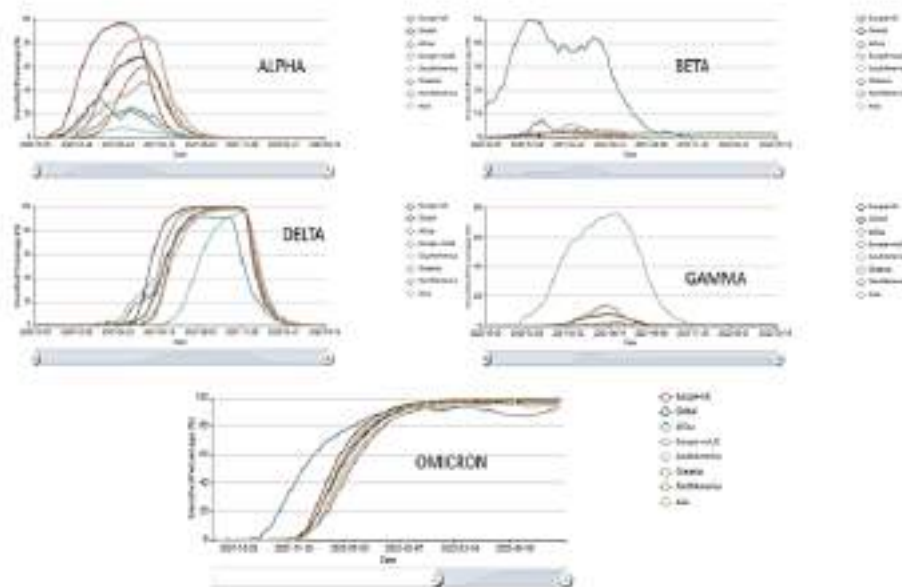
##### *Variant of Concerns (VoC)*

Varian jenis adalah bentuk varian SARS-CoV-2 yang memenuhi definisi VoI (pada bahasan selanjutnya) dan, melalui penilaian komparatif, telah terbukti terkait dengan satu atau lebih perubahan berikut pada tingkat signifikansi kesehatan masyarakat global, yaitu: (1) Peningkatan transmisi atau perubahan yang merugikan terkait epidemiologi COVID-19; (2) Peningkatan virulensi atau perubahan tampilan klinis penyakit; ATAU (3) Penurunan efektivitas pendekatan kesehatan masyarakat dan tindakan sosial atau diagnostik yang tersedia, termasuk vaksin dan terapi.<sup>1</sup> Sejumlah VoC ditampilkan pada Tabel 1. Sementara itu, situasi terkini mengenai perkembangan dan penyebaran VoC ditampilkan pada Gambar 1.

Tabel 1. Jenis *Variant of Concern* yang telah ditetapkan WHO.<sup>1</sup>

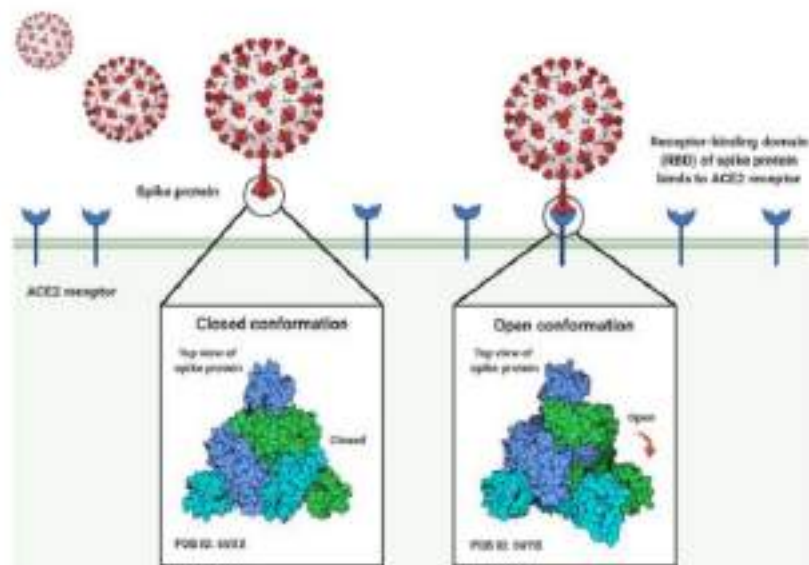
Label	Garis keturunan Pango	Asal GISAID; Nexstrain	Penambahan asam amino	Sampel pertama	Tanggal penetapan
<b>Alpha</b>	B.1.1.7 <sup>2</sup>	GRY; 20I (V1)	+S:484K +S:452R	Britania Raya, September 2020	18-12-2020
<b>Beta</b>	B.1.351	GH/501Y.V2; 20H (V2)	+S:L18F	Afrika Selatan, Mei 2020	18-12-2020
<b>Gamma</b>	P.1	GR/501Y.V3; 20J (V3)	+S:681H	Brazil, November 2020	11-1-2021
<b>Delta</b>	B.1.617.2 <sup>3</sup>	G/478K.V1; 21 A	+S:417N	India, Oktober 2020	11-5-2021
<b>Omicron*</b>	B.1.1.529	GRA; 21K, 21L, 21M	+S:R346K	Multi negara, November 2021	26-11-2021

Catatan: GISAID = *Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data*



Gambar 1. Situasi terkini varian SARS-CoV-2 (hingga 16 Mei 2022).<sup>4</sup>

Varian tersebut menunjukkan adanya sejumlah perubahan pada struktur genetik virus SARS-CoV-2. Ditemukan adanya 23 mutasi disertai perubahan 17 asam amino (varian B.1.1.7 dan 501Y.V2) serta 35 mutasi disertai perubahan 17 asam amino pada varian P.1) (Tabel 2). Data menunjukkan bahwa varian Alpha merupakan yang paling banyak ditemui dan setidaknya dijumpai pada 154 negara, yang terutama paling sering ditemui di Amerika Utara dan Eropa.<sup>5</sup> Varian lain, yaitu Delta telah ditemukan di 78 negara dengan 4.500 sekuens varian.<sup>6</sup> Sementara itu, setidaknya 13 negara telah melaporkan adanya varian Beta.<sup>7</sup> Di Indonesia, semua varian tersebut telah terdeteksi.<sup>8</sup> Semua jenis varian tersebut menunjukkan adanya mutasi N501Y yang mengubah asam amino asparagin (N) ke tirosin (Y) pada posisi 501 di domain pengikat reseptor. Mutasi tersebut menimbulkan peningkatan afinitas pengikatan ke reseptor ACE2 (Gambar 2) yang akhirnya meningkatkan transmisi virus, keparahan penyakit, risiko reinfeksi (tidak terbentuknya imunitas alami), dan penurunan efektivitas vaksin (tidak terbentuknya imunitas yang diinduksi vaksin).<sup>9</sup> Beberapa mutasi yang terkait dengan varian yang telah diidentifikasi dapat dijumpai pada Tabel 2.



Gambar 2. Perubahan konformasi tiga dimensi protein *spike* pada SARS-CoV-2 terkait pengikatannya ke reseptor ACE2 manusia.<sup>10</sup>

Tabel 2. Mutasi yang mendasari temuan varian SARS-CoV-2.<sup>7,11,12</sup>

Garis keturunan	Mutasi yang mendasari
B.1.1.7	orf1ab:T1001I; orf1ab:A1708D; orf1ab:I2230T; del:11288;9; del:21765;6; del:21991;3; S:N501Y; S:A570D; S:P681H; S:T716I; S:S982A; S:D1118H; Orf8:Q27 <sup>*</sup> ; Orf8:R52I; Orf8:Y73C; N:D3L; N: S235F
B.1.351/501Y-V2	E:P71L; N:T205I; orf1a:K1655N; S:D80A; S:D215G; S:K417N; S:E484K; S:N501Y; S:E484K
B.1.1.529	S: A67V, Δ69–70, T95I, G142D, Δ143–145, Δ211, L212I, 214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F RBD: K417N, Q493R, N501Y, Y505H

Secara umum, temuan mengenai varian mengindikasikan perubahan terkait kemampuan virus dalam bertahan terhadap sistem imun atau pengobatan yang tersedia. Studi menunjukkan bahwa dari

setidaknya 106 mutasi yang diteliti, sepuluh di antaranya menunjukkan penurunan sensitivitas terhadap plasma konvalesen atau antibodi penetralisir, dengan hanya satu (D614G+I472V) menunjukkan kombinasi peningkatan *fitness* replikasi dan penurunan sensitivitas terhadap antibodi.<sup>13</sup> Sementara itu, mengenai penghindaran terhadap antibodi monoklonal bamlanivimab ditemukan pada tiga varian, dengan tambahan satu varian (E406W) yang mampu menghindari aktivitas *dual* antibodi, yaitu casirivimab dan imdevimab.<sup>14</sup> Selain itu, kasus resistensi obat remdesivir juga jarang ditemukan, dengan persentase sebesar 0,002%.<sup>15</sup>

Studi menunjukkan bahwa varian B.1.351 merupakan tipe yang paling resisten terhadap antibodi monoklonal dan plasma konvalesen, diikuti P.1 dan B.1.1.7. Resistensi ini sejalan dengan hierarki yang terkait mutasi genetik pada domain amino terminal (NTD) dan receptor-binding domain (RBD) yang mengubah faktor antigenik protein S. Pada kasus varian B.1.351 ditemukan mutasi supersite NTD (delesi 242–244) serta mutasi tripel (K417N-E484K-N501Y RBD), sementara mutasi lebih terbatas dijumpai pada P.1 dan B.1.1.7. Identifikasi mutasi tunggal berupa K417N, E484K, dan N501Y pada RBD menunjukkan adanya konsekuensi terhadap netralisasi antibodi dan interaksi dengan reseptor ACE2. Pemantauan yang ketat harus dilakukan, termasuk pada sejumlah hewan terkait (sifat Coronavirus adalah zoonotik) untuk memberikan pemahaman lebih baik terkait kompleksitas penyakit dan mencegah kejadian luar biasa di masa depan.<sup>16</sup>

Pada dasarnya, munculnya varian yang disampaikan di atas mengharuskan adanya surveilans genomik untuk identifikasi dini

varian masa depan. Potensi varian untuk menyebabkan hilangnya imunitas, baik pasca paparan maupun vaksinasi membuat pengembangan vaksin jenis baru yang mampu menghadapi netralisasi yang ditimbulkan virus sebagai prioritas.<sup>9</sup> Sejumlah ringkasan mengenai dampak varian SARS-CoV-2 terhadap kondisi pandemi dirangkum pada Tabel 3.



Tabel 3. Ringkasan Aktivitas Variant of Concern SARS-CoV-2, 8.11.17

Parameter	Variant of Concern				
	Alpha	Beta	Gamma	Delta	Omicron
Transmisi	Peningkatan transmisi dan <i>secondary attack rate</i>	Peningkatan transmisi	Peningkatan transmisi	Peningkatan transmisi dan <i>secondary attack rate</i>	Peningkatan transmisi infeksius dibanding Delta)
Keparahan penyakit	Peningkatan risiko rawat inap, kemungkinan meningkatkan risiko keparahan dan kematian	Kemungkinan peningkatan risiko rawat inap (belum terkonfirmasi)	Kemungkinan peningkatan risiko rawat inap (belum terkonfirmasi)	Peningkatan risiko rawat inap	Risiko rawat inap rendah, kebutuhan dan perawatan ICU varian sebelumnya transmisi yang tinggi
Risiko reinfeksi	Netralisasi terjaga, risiko reinfeksi tampak tidak mengalami perubahan	Reduksi netralisasi, respon sel T masih baik	Reduksi netralisasi menengah	Reduksi netralisasi	Reduksi netralisasi
Dampak terhadap metode diagnostik	Tidak ditemukan terhadap RT-PCR dan antigen. Dampak terbatas pada kegagalan penargetan gen S	Tidak ditemukan	Belum dilaporkan	Belum dilaporkan	<i>Spike Gene Target</i> (S-dropout) pada Omicron BA.1, tidak B.A.2. Secara umum berdampak.
Efek terhadap vaksinasi	Proteksi tetap terjaga pada semua luaran pasien (ringan-berat). Kemampuan reduksi menurun 10-20% pada vaksin Astra Zeneca, Moderna, Pfizer, SinoVac, jenis lain tidak berdampak bermakna.	Proteksi terjaga pada kasus berat, menurun pada kasus simptomatik (bukti terbatas). Penurunan efikasi vaksin hingga >20%-30% pada Astra Zeneca, Gamaleya-Sputnik V, Janssen, Moderna, NovaVax, Pfizer, SinoVac.	Dampak tidak jelas (bukti terbatas). Kemampuan reduksi menurun 10-20% pada vaksin Astra Zeneca, Gamaleya-Sputnik V, Janssen, Moderna, Pfizer, SinoVac.	Proteksi terjaga untuk kasus berat, kemungkinan menurun terhadap kasus simptomatik dan risiko infeksi (bukti terbatas). Penurunan efikasi hingga $\geq 30\%$ pada SinoVac, Astra Zeneca dan Moderna.	Proteksi terjaga untuk berat, virus menghindari sistem tubuh, dapat met walaupun mendapatkan <i>booster</i> . Perilaku rendah pada Sinopharm, Sputnik Johnson& Johnson

### *Variant of Interest (VoI)*

Berdasarkan kriteria WHO, VoI merujuk pada jenis varian SARS-CoV-2 yang memenuhi definisi berikut: (1) mengalami perubahan genetik yang diperkirakan atau diketahui mempengaruhi karakteristik virus seperti penularan, keparahan penyakit, penghindaran imunitas, penghindaran diagnostik atau terapeutik; DAN (2) diidentifikasi sebagai penyebab penularan komunitas yang signifikan atau menjadi sumber beberapa kluster COVID-19 di banyak negara dengan prevalensi relatif yang meningkat bersamaan dengan peningkatan jumlah kasus dari waktu ke waktu, atau dampak epidemiologis nyata lainnya yang menunjukkan risiko terhadap kesehatan masyarakat global.<sup>8</sup> Sejumlah bentuk VoI ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Jenis *Variant of Interest* yang telah ditetapkan WHO hingga Februari 2022.<sup>1</sup>

Label	Garis keturunan Pango	Asal GISAID, Nexstrain	Sampel pertama	Tanggal penetapan
Lambda	C.37	GR/452Q.V1, 21G	Peru, Desember 2020	14-6-2021
Mu	B.1.621	GH, 21H	Kolombia, Januari 2021	30-8-2021

Catatan: GISAID = *Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data*

Klasifikasi jenis varian sangat beragam dan terkait dengan kebijakan di masing-masing negara, sebagai contoh, *United States Center for Disease Control and Prevention* (CDC) menyatakan bahwa tidak ada lagi varian yang tergolong VoI.<sup>18</sup> Selain itu, WHO juga meletakkan beberapa varian yang telah ditetapkan sebelumnya sebagai



6C atau VoI ke dalam *Variants Under Monitoring* (VUM). VUM adalah varian SARS-CoV-2 dengan perubahan genetik yang diduga mempengaruhi karakteristik virus yang menunjukkan indikasi menimbulkan risiko di masa depan, tetapi belum terdapat bukti dampak fenotipik atau epidemiologis yang jelas saat ini, sehingga memerlukan proses pemantauan dan penilaian ulang sambil menunggu bukti baru.<sup>1</sup> Sejumlah VoI, antara lain Kappa: B.1.617.1; Iota: B.1.526; Eta: B.1.525; serta Epsilon: B.1.427/B.1.429 telah diubah statusnya sebagai VUM. Sementara itu, beberapa varian telah dikeluarkan dari daftar VUM karena potensinya yang dianggap tidak berbahaya, seperti varian Zeta: P.2 dan Theta: P.3.<sup>1</sup>

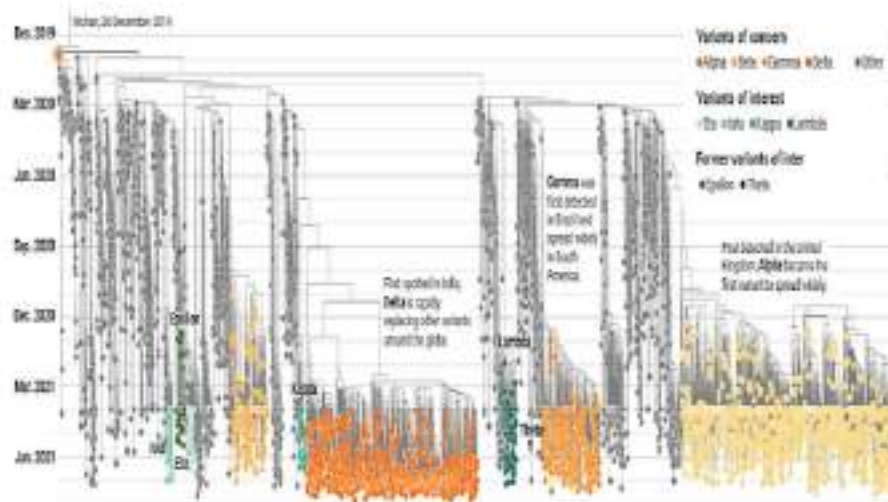
Pada dasarnya, varian SARS-CoV-2 terdiri atas dua tipe utama, yaitu tipe L dan tipe S) yang dibedakan dengan dua *single nucleotide polypeptides* (SNPs) yang terletak pada situs 8.782 dan 28.144. Virus tipe L lebih sering dijumpai (pada 70% *strain*), sementara tipe S hanya membentuk 30% *strain*. Namun demikian, virus tipe S dinyatakan sebagai *ancestor* SARS-CoV-2.<sup>19</sup> Walaupun demikian, belum ada bukti pasti mengenai perbedaan kemampuan transmisi dan virulensi antar kedua tipe virus tersebut.<sup>10</sup>

Setiap varian SARS-CoV-2 memiliki potensi menimbulkan malapetaka, baik yang telah terbukti maupun masih perlu penelitian lebih lanjut. Rangkuman mengenai aktivitas varian terhadap berbagai aspek dalam perspektif pandemi COVID-19 dapat dilihat pada Tabel 5. Gambaran filogeni varian yang telah dideteksi ditampilkan pada Gambar 3.

Tabel 5. Gambaran Umum Varian SARS-CoV-2.<sup>20</sup>

Parameter	Varian awal	VoI	VoC
<b>Tanda dan gejala</b>			
- Batuk	28%		35%
- <i>Fatigue</i>	29%		32%
- Sakit kepala	30%		32%
- Myalgia	21%		25%
- Nyeri tenggorokan	19%		22%
- Demam	20%		22%
- Ageusia	19%		16%
- Anosmia	19%		15%
<b>Transmisi penyakit</b>	Ya	Tidak	Ya
<b>Keparahan penyakit</b>	Kurang	Kurang	Lebih
<b>Kegagalan diagnostik</b>	Tidak	Tidak	Tidak
<b>Pengobatan</b>		Reduksi potensial pada antibodi monoklonal	Dampak minimal (B.1.1.7); menengah (P.1, B.1.351); signifikan (B.1.427, B.1.429) terhadap terapi dan antibodi monoklonal
<b>Efektivitas vaksin</b>	Efektif	Reduksi potensial	Dampak minimal (varian B.1.1.7), reduksi menengah pada varian lain

Catatan: VoI = *Variant of Interest*, VoC = *Variant of Concern*



Gambar 3. Varian SARS-CoV-2 yang telah terdeteksi.<sup>21</sup>

Perubahan asam amino (D614G) di luar RBD cenderung menyebabkan virus lebih infeksius, namun belum ada bukti bahwa virus menjadi lebih resisten terhadap antibodi. Selain itu, ablasi situs glikosilasi mempengaruhi reaktivitas terhadap antibodi, disertai dengan infektivitas yang dimiliki. Hal tersebut dapat mempengaruhi replikasi dan imunitas yang diinduksi vaksin pada SARS-CoV-2.<sup>13</sup>

Pendekatan yang dikembangkan untuk menghadapi varian ini dapat dibagi menjadi pendekatan komunitas dan vaksinasi. Pendekatan komunitas telah dilaksanakan melalui program kesehatan masyarakat seperti memakai masker dan menjaga jarak. Sementara itu, vaksin khusus yang terutama menggunakan metode mRNA telah diujikan dalam menghadapi perkembangan varian SARS-CoV-2,<sup>22</sup> yaitu BNT162b2. Vaksin ini terutama digunakan untuk menetralkan mutan N501 dan Y501. Selain itu, vaksin vektor adenovirus ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) juga dinyatakan efektif untuk

menghadapi varian B.1.1.7 dan non-B.1.1.7. Pembuatan vaksin ini dapat disesuaikan dengan sekuens genomik varian SARS-CoV-2 yang telah diidentifikasi.<sup>23</sup> Salah satu pilar terpenting yang harus dilaksanakan juga berupa surveilans genomik dan karakterisasi varian virus baru untuk dapat memetakan potensi penanganan varian SARS-CoV-2.<sup>24</sup>

Sejumlah pendekatan potensial lain dihipotesiskan dapat membantu penanganan masalah varian SARS-CoV-2 ini. Hal tersebut meliputi *targeted therapy* pada *receptor binding domain* (RBD) subunit 1, interupsi pembentukan endosom (dengan obat antimalaria, makrolid, Camostat, atau inhibitor *A disintegrin and metalloprotease 17* (ADAMI7) serta interupsi genom VoC SARS-CoV-2 (dengan Remdesivir, Ribaverin dan Galidesivir).<sup>25</sup>

#### *Variants under monitoring (VUM)*

6

Golongan terakhir ini merupakan varian SARS-CoV-2 dengan perubahan genetik yang diperkirakan dapat mempengaruhi karakteristik virus dengan sejumlah indikasi yang memungkinkan timbulnya risiko kesehatan di masa depan, namun bukti fenotipik atau epidemiologi yang tersedia saat ini belum jelas dan membutuhkan pemantauan lanjutan serta pemeriksaan ulangan untuk menarik kesimpulan dari bukti-bukti yang tersedia. Pemahaman dampak varian ini diperkirakan dapat terjadi secara cepat dan penentuan varian untuk dimasukkan ke tingkatan lebih lanjut atau dikeluarkan dari pemantauan juga diperkirakan segera terjadi. Sejumlah VUM yang dinyatakan oleh WHO ditampilkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Jenis *Variant Under Monitoring* yang ditetapkan WHO hingga Bulan Februari 2022.<sup>1</sup>

Garis keturunan Pango	Asal GISAID, Nexstrain	Sampel pertama	Tanggal penetapan
B.1.1.318	GR, -	Banyak negara, Januari 2021	2 Juni 2021
C.1.2	GR, -	Afrika Selatan, Mei 2021	1 September 2021
B.1.640	GH/490R, -	Banyak negara, September 2021	22 November 2021

### Mekanisme Terbentuknya Varian

Varian SARS-CoV-2 yang terdeteksi merupakan bentuk perubahan pada virus yang didasari oleh proses mutasi. SARS-CoV-2 yang tergolong virus dengan bahan genetik asam ribonukleat (RNA) memiliki sifat replikasi yang sangat rentan, sehingga diversitasnya sangat beragam.<sup>26</sup> Rasio mutasi pada virus yang tergolong dalam kelompok *human coronavirus* ini dapat mencapai  $10^4$  substitusi per situs per tahun, angka yang termasuk menengah-tinggi dibandingkan virus RNA untai tunggal lain.<sup>27</sup> Mekanisme rekombinasi yang terjadi akibat dua virus atau lebih yang menginvasi sel yang sama dapat merubah fungsi *host*, virulensi, infiltrasi imun *host*, dan resistensi antivirus. Secara umum, rekombinasi terjadi melalui dua tipe, yaitu *antigenic shift* (virus bersegmen seperti Influenza) maupun rekombinasi tertentu pada virus tidak bersegmen seperti *Coronavirus*.<sup>28</sup>

Proses mutasi bertujuan untuk menghadapi seleksi alam dan pada dasarnya akan memberikan dampak pada tiap fase dalam siklus hidup virus, meliputi penempelan, penetrasi, *uncoating*, replikasi



(biosintesis), perakitan (maturasi), serta pelepasan.<sup>26,29</sup> Proses mutasi pada SARS-CoV-2 didasari oleh beberapa mekanisme yang meliputi:

a. Substitusi asam amino yang mengubah epitop

Perubahan sifat biofisik residu epitop secara langsung menurunkan kemampuan pengikatan antibodi. Contohnya, antibodi penetralisir 4A8 membentuk jembatan garam dengan *spike* residu protein K147 dan K150, dan yang akhirnya cenderung menghambat pengikatan antibodi. Substitusi asam amino E484K telah menunjukkan dampak pada efektivitas antibodi monoklonal dan aktivitas penetralisir plasma konvalesen. Posisi asam amino ini telah ditunjukkan sebagai bagian dari rangka antibodi, selain itu perubahan muatan akibat penggantian residu glutamat dengan lisin dapat berpotensi menurunkan pengikatan antibodi.<sup>30</sup>

b. Meningkatkan aviditas pengikatan reseptor

Substitusi yang secara individual meningkatkan afinitas pengikatan reseptor dapat mengubah keseimbangan pengikatan antara glikoprotein dan antibodi penetralisir yang mendukung interaksi aviditas yang lebih tinggi antara glikoprotein dan reseptor seluler. Substitusi *spike* asam amino N501Y, yang meningkatkan afinitas pengikatan ACE 2, terutama muncul pada individu yang diobati dengan plasma konvalesen, berpotensi sebagai sarana penghindaran imun.<sup>30,31</sup>

c. Perubahan glikosilasi

Glikan adalah molekul gula besar yang dapat melindungi epitop dari ikatan antibodi. Glikan terkait-N biasanya menonjol dalam perlindungan terhadap epitop glikoprotein permukaan virus, meskipun glikan terkait-O juga dapat berkontribusi. Substitusi

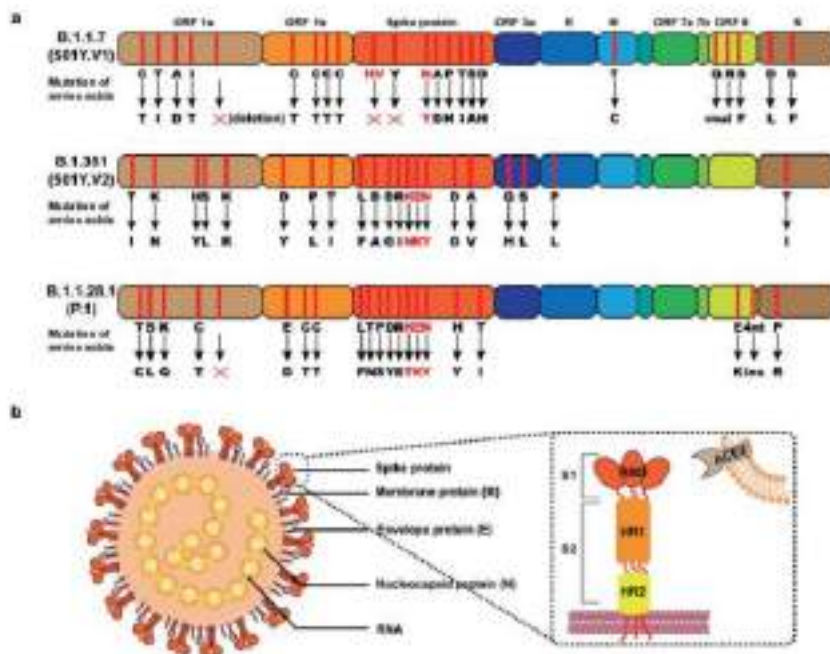
dapat memberikan motif glikosilasi terkait-N tambahan. Perolehan glikan yang meniru epitop selama evolusi virus influenza manusia telah dijelaskan dengan baik.<sup>30,32,33</sup>

d. Delesi dan insersi

Delesi atau insersi residu berpotensi mengubah konformasi epitop, menurunkan pengikatan antibodi. Beberapa delesi pada *spike* domain amino terminal (NTD) yang mempengaruhi pengenalan oleh antibodi penetralisir telah dideskripsikan. Secara *in vitro*, insersi multiresidu pada *spike* NTD telah ditemukan sebagai faktor baru kontributor penghindaran virus dan antibodi poliklonal pada plasma konvalesens.<sup>30,34</sup>

e. Efek struktural alosterik

Seperti delesi dan insersi, substitusi asam amino di luar rangka epitop dapat mempengaruhi pengikatan antibodi dengan mengubah konformasi protein sedemikian sehingga tampilan epitop mengalami perubahan. Pada *spike* NTD, perubahan ikatan disulfida dianggap mengurangi pengikatan beberapa antibodi monoklonal melalui mekanisme alosterik ini.<sup>35</sup>



Gambar 4. Informasi varian SARS-CoV-2. (a) Mutasi asam amino terperinci dari varian SARS-CoV-2 (B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28.1) dengan mutasi kunci ditandai dengan warna merah. (b) Struktur utama SARS-CoV-2, termasuk protein *spike*, protein membran, protein *envelope*, protein nukleokapsid, dan Asam Ribonukleat (RNA). Sebagai protein transmembran, *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) berfungsi sebagai titik masuk utama ke dalam sel bagi SARS-CoV-2.<sup>30</sup>

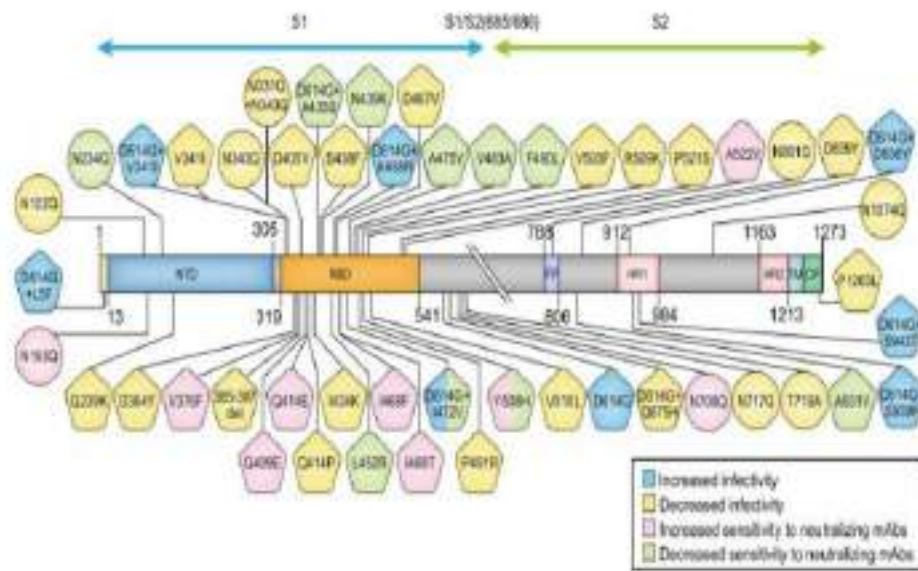
Beberapa komponen mutasi utama telah diidentifikasi pada SARS-CoV-2 dan tiap-tiap mutasi memiliki keunikan serta potensi tertentu. Daftar mutasi utama tersebut dirangkum pada Tabel 7. Sementara, ringkasan skematik mengenai dampak mutasi dapat dilihat pada Gambar 5.



Tabel 7. Mutasi utama pada SARS-CoV-2.<sup>37</sup>

Regio genom	Protein	Mutasi	Penanda	Peran
<i>Leader</i>		Nukelotid		
<b>5'UTR</b>		C251T	<i>Clade G</i>	Tidak tertranskripsi
		Asam amino		
<b>orf1ab</b>	NSP1		Mutasi berlebih	Penghindaran imun
	NSP2	T265I		
	NSP3	F106F	<i>Clade G</i>	Inflamason
			<i>Silent</i>	Interaksi
	NSP6	L37F	<i>Clade V</i>	Imunitas bawaan
		L3606F		Interaksi
	NSP12	P323L	<i>Clade G</i>	RNA- dependent RNA polymerase
	NSP13	P504L Y541C		Helikase
	NSP14			
<i>Spike</i>	S	D614G	Tidak dalam RBD	Infektivitas ↓ Viral load saluran pernafasan atas ↑
			<i>Clade G</i>	
		N439K	Dalam RBD	Infektivitas ↑
		Delesi		
<b>orf3a</b>	Viropozin	Q57H G215V	USA <i>Clade V</i>	Pelepasan seluler virus Virulensi Replikasi virus
<b>orf8</b>	ORF8	L84S Delesi	<i>Clade S</i>	Respon imun <i>host</i> Protein imunogenik
<b>Nukleo- kapsid</b>	N	R203K R202K G204R	<i>Clade GR</i> Ke-3 mutasi terkait	Infektivitas dan replikasi ↑
<b>orf10</b>		Delesi		Tidak esensial

Catatan: NSP, protein non-struktural; ORF, *open reading frame*; RBD, *receptor-binding domain*.



Gambar 5. Ilustrasi Skematik Perubahan Asam Amino pada Protein *Spike*. Pada gambar berikut ditampilkan perubahan asam amino yang menyebabkan setidaknya perubahan infektivitas dan netralisasi sebesar empat kali lipat terhadap antibodi monoklonal.<sup>38</sup>

Studi epidemiologis di Amerika Serikat menunjukkan adanya beberapa mutasi kunci yang diidentifikasi pada situs spesifik SARS-CoV-2. Hal tersebut meliputi;

- ORF1a, perubahan treonin ke isoleusin (T85I) pada 48,79% sekuens; perubahan leusin ke fenilalanin (L89F) pada 12,98% sekuens.<sup>39</sup>
- ORF1b, perubahan prolin ke leusin (P323L) pada 82,03% sekuens.<sup>39</sup>
- ORF2, perubahan asam aspartat ke glicin (D614G) pada 80,76% sekuens.<sup>39</sup>
- ORF3a, perubahan glutamin ke histidin (Q57H) pada 57,62% sekuens.<sup>39</sup>

e. Ig-like (ORF8) dan nukleokapsid (ORF9), perubahan S24L dan L84S pada 15% sekuens serta perubahan P199L dan P67S pada 10% sekuens.<sup>39</sup>

Data di Indonesia menunjukkan bahwa 30 dari 106 isolat (28,3%) identik dengan Wuhan-Hu-1, varian SARS-CoV-2 yang pertama kali ditemukan. Selain itu, terdapat 43 mutasi titik pada gen *spike* dengan 27 di antaranya menyebabkan perubahan asam amino yang bersifat unik (tidak ditemukan di negara lain). Mutasi tersebut meliputi T22P, S116C, N185Y, dan K811I yang hanya ditemukan di Indonesia. Sementara itu, 60 isolat yang diamati menunjukkan adanya mutasi global D614G.<sup>40</sup> Perbedaan mutasi khusus yang spesifik antar varian SARS-CoV-2 ditampilkan pada Tabel 8.

Tabel 8. Temuan mutasi antar varian SARS-CoV-2.<sup>41</sup>

Variasi <i>spike</i> asam amino	Alpha B.1.1.7	Beta B.1.351	Gamma B.1.1.28	Delta B.1.617	Omicron B.1.1529
ΔH69-V70	X				X
ins214EPE					X
S371L/S373P					X
L452R				X	
N501Y	X	X	X	X	X
K417T			X		
K417N		X			(X)
E484K		X	X		
E484Q	(X)				
E484A					X
P681H	X				X
P681R				X	
T478K				X	

### Deteksi Varian

Metode utama deteksi varian adalah menggunakan *sequencing* untuk mengurutkan material genetik virus. Namun demikian, proses *sequencing* ini membutuhkan waktu yang lama dan berpotensi menimbulkan beban bagi kesehatan masyarakat terkait upaya karantina yang keras dan proses *follow-up* pasien yang dicurigai membawa suatu varian SARS-CoV-2. Metode diagnosis berbasis *sequencing* yang dapat diterapkan sebagai *point-of-care testing*, seperti teknologi *pore-based* dapat berkontribusi dalam diagnosis, penemuan varian, dan deteksi mutan baru pada masa depan.<sup>42</sup> Alur deteksi panel genotipik terhadap varian SARS-CoV-2 dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Alur deteksi panel genotipik terhadap varian SARS-CoV-2.<sup>43</sup>

### *Whole genome sequencing*

Whole genome sequencing (WGS) merupakan metode penting untuk proses karakterisasi virus secara genetik. Proses ini menggunakan pendekatan *amplicon* maupun *shotgun sequencing* yang memungkinkan pengurutan seluruh genom virus untuk dibandingkan dengan strain yang telah menyebar.<sup>44</sup> Proses ini dapat mendeteksi VoC secara efisien karena sifatnya yang tidak bias. Proses ini memakan banyak sumber daya dan dapat memakan waktu beberapa hari untuk mendapatkan hasil.<sup>45</sup>

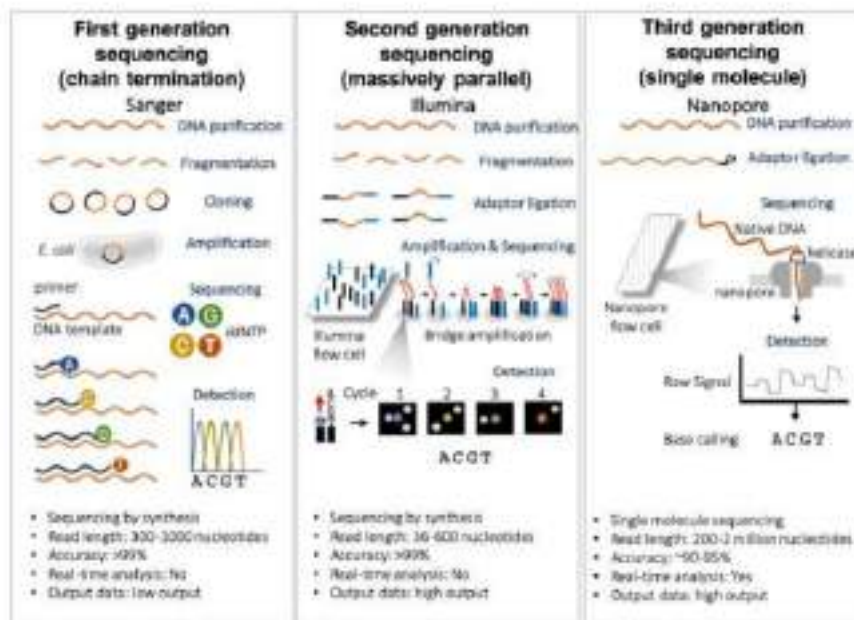
Analisis *sequencing* setidaknya terdiri atas tiga generasi dan mulai dikembangkan sejak tahun 1977 oleh Sanger, dkk. serta pada tahun 1980 oleh Maxam, dkk. *Sequencing* generasi pertama dilaksanakan berdasarkan metode Sanger dan Maxam-Gilbert, namun permasalahan waktu dan biaya menghambat perkembangan metode ini secara lebih lanjut. Generasi kedua yang dikembangkan meliputi teknik Roche/454 (2005), Illumina/Solexa (2006) dan ABI/SOLiD (2007). Metode tersebut dapat memberikan bacaan yang lebih pendek

dan banyak (jutaan), menurunkan *cost*, serta tidak memerlukan proses elektroforesis pada deteksinya. Generasi selanjutnya, yaitu generasi ketiga hadir karena adanya permasalahan amplifikasi DNA yang menghambat waktu eksekusi pada *sequencing* generasi kedua. Generasi ketiga yang antara lain terdiri atas *Pacific biosciences SMRT sequencing* serta *MinION sequencing* (Oxford Nanopore *sequencing*) menawarkan kelebihan tambahan, terutama pada biaya yang lebih murah serta persiapan sampel yang lebih mudah (tidak perlu amplifikasi).<sup>46</sup> Tabel 9 menunjukkan perbedaan antar metode *sequencing*, sementara gambaran skematik mengenai perbedaan antar masing-masing *sequencing* ditampilkan pada Gambar 7.

Tabel 9. Perbandingan generasi antar metode *sequencing*.<sup>47</sup>

	Generasi pertama	Generasi kedua	Generasi ketiga
<b>Teknologi dasar</b>	Pemisahan berdasarkan ukuran dari fragmen DNA <i>end-labeled</i> spesifik	<i>Wash-and-scan SBS</i>	<i>Single molecule real time sequencing</i>
Resolusi	Rata-rata dari banyak kopi molekul DNA	Rata-rata dari banyak kopi molekul DNA	Molekul DNA tunggal
Akurasi <i>raw read</i>	Tinggi	Tinggi	Lebih rendah
Panjang bacaan	Moderat (800-1.000 <i>base pair</i> / bp)	Pendek (umumnya jauh lebih pendek dibandingkan Sanger <i>sequencing</i> , generasi pertama)	>1.000 bp
Jumlah aliran sampel ( <i>throughput</i> )	Rendah	Tinggi	Tinggi
Biaya	Tinggi per basa, rendah per <i>running</i>	Rendah per basa, tinggi per <i>running</i>	Rendah per basa, tinggi per <i>running</i>
Metode <i>sequencing</i> RNA	<i>cDNA sequencing</i>	<i>cDNA sequencing</i>	<i>Direct RNA sequencing</i>
Waktu tunggu	Jam	Beberapa hari	<1 hari
Persiapan sampel	Relatif kompleks, tidak perlu amplifikasi PCR	Kompleks, perlu amplifikasi PCR	Bervariasi
Analisis data	Rutin	Kompleks (terkait volume data yang besar dan bacaan yang pendek)	Kompleks
Hasil primer	<i>Base calls</i> dengan nilai kualitas	<i>Base calls</i> dengan nilai kualitas	<i>Base calls</i> dengan nilai kualitas





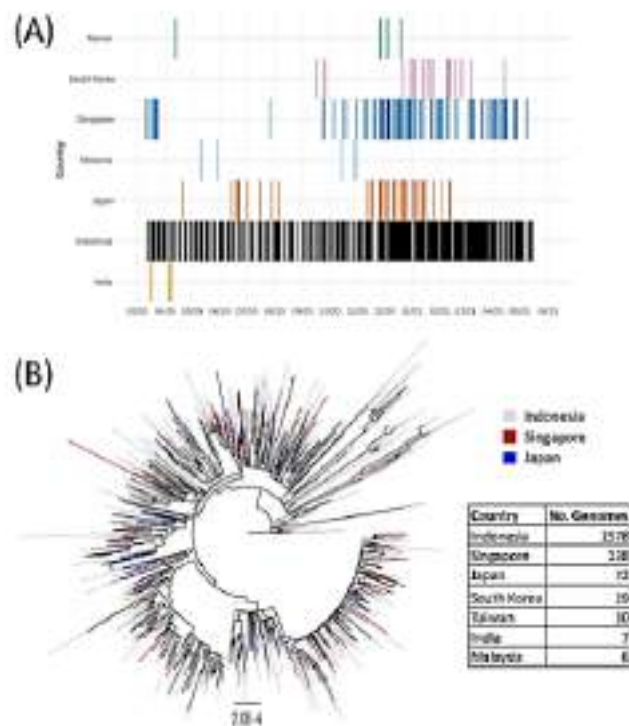
Gambar 7. Skema perbandingan antar generasi *sequencing*.<sup>48</sup>

Di Indonesia, salah satu lembaga yang melakukan pemeriksaan WGS adalah lembaga biomolekuler Eijkman. Data terbaru menunjukkan adanya setidaknya 1.346 sekuens WGS yang telah diidentifikasi dari 15 provinsi di Indonesia, dengan proporsi terbesar dari provinsi Jawa Barat (314 sekuens; 23,3%).<sup>49</sup> Penelitian lain untuk melakukan *profiling* genom SARS-CoV-2 di Indonesia menunjukkan temuan seperti Gambar 8.

#### *Sanger* atau *partial next generation sequencing (NGS) amplicon-based sequencing*

Sanger atau NGS *amplicon-based sequencing* merupakan metode alternatif identifikasi VoC. Dengan teknik ini, seluruh atau sebagian gen S yang ditargetkan untuk menjalani sequencing dapat dianalisis secara genetik. Metode NGS memiliki tantangan dalam

pencapaian, seperti peralatan regrading WGS dan analisis bioinformatika. Pada deteksi varian B.1.351/501Y.V2 ditemukan adanya profil mutasi yang bervariasi, sehingga disarankan untuk menggunakan set minimum: D80A, D215G, E484K, N501Y, A701V.<sup>45</sup> NGS maupun WGS dapat digunakan untuk proses pelacakan penyebaran penyakit, selain pemantauan evolusi dan diversifikasi virus.<sup>50</sup>



Gambar 8. Analisis filogenetik genom SARS-CoV-2 yang ditemukan di Indonesia (total: 1830) berdasarkan data yang diunduh dari GISAID pada 1 Juni 2021. A) Perjalanan perkembangan varian terkait dari Indonesia berdasarkan negara yang diamati. B) Pohon filogenetik yang berakar pada genom Indonesia yang paling awal diidentifikasi.<sup>51</sup>

### Skrining Varian

Sebagai alternatif metode *sequencing* yang membutuhkan waktu dan sumber daya yang besar, sejumlah alternatif telah dikembangkan

untuk melakukan proses deteksi varian. Prinsipnya, semua metode berikut hanya menjadi skrining dan tidak bisa menjadi baku emas (perlu dilakukan *cross-check* dengan teknik *sequencing* di atas). Metode alternatif tersebut meliputi:

a. Tes berbasis *Real-time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

Strategi ini terutama bermanfaat bila prevalensi VoC sudah cukup banyak di daerah yang diperiksa. Deteksi menggunakan metode ini terutama menargetkan gen S, namun terkadang juga disertai kegagalan deteksi terutama pada varian B.1.1.7/501Y.V1. Pada varian tersebut, terjadi delesi pada posisi nt207-212 yang menyebabkan teknik ini bermanfaat sebagai skrining varian tersebut karena temuan tersebut. Di sisi lain, varian ini menunjukkan sinyal positif pada ORF1 dan RT-PCR yang menargetkan gen N. Kegagalan deteksi untuk gen S (*S-gene target failure*, SGTF) tidak eksklusif pada varian B.1.1.7/501Y.V1 dan dapat mendeteksi varian jenis lain (non-VoC). Namun, *S-gene target failure* tidak ditemukan pada varian 501Y.V2 dan kemungkinan besar juga pada P.1.<sup>45</sup> SGTF ini sendiri adalah gambaran khas pada hasil pemeriksaan *real time* PCR dimana gen target selain gen S akan terdeteksi, namun demikian gen S tersebut tidak dapat terdeteksi, sebagai contoh pada penggunaan reagen *Taqpath COVID-19\**, deteksi gen N dan ORF1ab dapat dilaksanakan pada kasus dengan nilai  $Ct \leq 30$ , sementara itu gen S tetap tidak terdeteksi.<sup>52</sup> Assay lain seperti S-L450R juga telah dikembangkan, dan walaupun pada awal penyusunannya digunakan untuk mendeteksi varian B.1.427/429, saat ini metode ini sudah mendeteksi adanya varian baru berupa B.1.526.1.<sup>53</sup>

Berkaitan dengan varian terbaru virus SARS-CoV-2, yaitu Omicron, pemeriksaan skrining dengan metode SGTF telah turut diberdayakan. Pemeriksaan ini terutama bertujuan untuk mendeteksi mutasi His69\_Val70del, suatu mutasi berupa delesi asam amino 69-70 pada protein *Spike* SARS-CoV-2 yang menyebabkan kegagalan deteksi gen S pada pemeriksaan *real time* PCR dengan penggunaan reagen tertentu (seperti *TaqPath COVID-19\**). Walaupun delesi asam amino 69-70 ini juga ditemukan pada *variants of concern* (VOC) terdahulu seperti varian Alpha, kemampuan deteksinya masih cukup bisa diandalkan pada kasus COVID-19 akibat SARS-CoV-2 varian Omicron. Namun demikian, penilaian SGTF disarankan untuk dilaksanakan bila nilai  $Ct \leq 30$  untuk menargetkan gen virus selain S. Hal tersebut bertujuan untuk menghindari kemungkinan kesalahan interpretasi, karena kegagalan deteksi gen S dapat terjadi akibat rendahnya kadar RNA virus pada specimen yang diperiksa dan bukan akibat adanya mutase tertentu, terutama pada varian Omicron.<sup>52</sup>

Analisis varian terutama difokuskan pada jenis varian terbanyak saat ini, yaitu Omicron B.1.1.529. Persentase setiap subvarian Omicron yang memiliki delesi asam amino 69-70 dapat berbeda secara signifikan. Data pada tanggal 31 Januari 2022 menunjukkan bahwa subvariant BA.1 memiliki persentase delesi asam amino 69-70 tertinggi (96,8%), diikuti oleh BA.1.1 (95,9%), BA.3 (88,2%) serta terendah pada BA.2 dengan hanya 0,1 % delesi.<sup>52</sup> Keseluruhan interpretasi hasil pemeriksaan yang mencerminkan SGTF dapat dilihat pada Tabel 10.

Selain metode SGTF di atas, *multiplex RT-PCR* juga dapat dilaksanakan. Teknik ini mengkombinasikan penargetan pada gen E dan/atau N dan/atau ORF-1 yang dapat dikombinasikan dengan gen S (meliputi N501Y, 69-70del, K417N, dan E484K serta V1176F) sehingga skrining dapat dilakukan dalam satu kali percobaan.<sup>54,55</sup> Pada prinsipnya, hasil RT-PCR harus tetap divalidasi dengan *sequencing* dan tidak boleh diinterpretasikan secara berlebihan.<sup>45</sup> Walaupun demikian, potensinya sangat baik karena deteksi varian bisa dilaksanakan dalam waktu 24 jam (bahkan hingga dua jam)<sup>56</sup> sejak diagnosis COVID-19 dan terus menunjukkan angka *positivity rate* yang terus meningkat (dimulai dari 3,2%) sejalan dengan pertumbuhan eksponensial pada berbagai negara.<sup>57</sup>

**Tabel 10.** Interpretasi pemeriksaan *Real Time PCR* SGTF dengan reagen Taqpath COVID-19\* (*Cut-off* nilai Ct sebesar  $\leq 37$ ).<sup>5</sup>

Gen target		Interpretasi		Kemungkinan varian
		N	S	
Terdeteksi (Ct $\leq 30$ )	Terdeteksi i (Ct $\leq 30$ )	Tidak terdeteksi	<b>Positif SARS-CoV-2, SGTF terdeteksi</b> (delesi asam amino 69-70)	<i>Omicron</i> dengan delesi (contoh: BA.1, BA.1.1, BA.2)
Terdeteksi (Ct $> 30$ )	Terdeteksi i (Ct $> 30$ )	Tidak terdeteksi	<b>Positif SARS-CoV-2, SGTF inconclusive</b> (SGTF tidak dapat ditentukan karena jumlah RNA virus rendah). Masih terdapat kemungkinan gen S tidak mengalami delesi 69-70 (gen S tidak terdeteksi akibat kadar RNA virus yang rendah pada spesimen)	<b>Kemungkinan varian dapat ditentukan</b> karena RNA virus sedikit.
Terdeteksi (Ct $\leq 37$ ) atau tidak terdeteksi	Terdeteksi (Ct $\leq 37$ ) atau tidak terdeteksi	Terdeteksi (Ct $\leq 37$ )	<b>Positif SARS-CoV-2, SGTF tidak terdeteksi</b> (tidak ditemukan delesi asam amino 69-70 pada gen S)	<ul style="list-style-type: none"> <li><b><i>Omicron</i> tanpa delesi</b> (contoh: <i>Omicron</i> BA.2)</li> <li><b>Varian selain <i>Omicron</i></b></li> </ul>
Terdeteksi (Ct $\leq 37$ )	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi	<b>Positif SARS-CoV-2, SGTF inconclusive</b> (delesi asam amino 69-70 gen S tidak dapat ditentukan karena salah satu gen ORF1ab dan N tidak terdeteksi). Deteksi kedua gen ORF1ab dan N diperlukan untuk menentukan SGTF.	<b>Kemungkinan varian dapat ditentukan.</b>
Tidak terdeteksi	Terdeteksi i (Ct $\leq 37$ )	Tidak terdeteksi	<b>Negatif SARS-CoV-2</b>	Positif SARS-CoV-2



b. Skrining *assay Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*

Skrining substitusi asam amino dengan penargetan SNP dapat dilakukan berbasis RT-PCR untuk mendeteksi mutasi protein S Pemeriksaan berbasis *Nucleic Acid Amplification Test (NAAT)* tersebut dapat mendeteksi mutasi secara spesifik, dan disesuaikan dengan pola khusus pada antar varian, seperti mutasi N501Y dan HV69-70del. Pada proses ini diperlukan kontrol positif yang tepat dan telah divalidasi terhadap varian-varian yang akan dideteksi oleh reagen yang digunakan.<sup>58</sup> Deteksi SNP mampu menjadi metode skrining yang cepat (<1 jam) dan lebih murah untuk memperkirakan prevalensi varian dengan mutasi spesifik pada komunitas, dengan hasil untuk menentukan kemungkinan varian virus pada sampel. Skrining ini disertai dengan rasio kegagalan deteksi sebesar rata-rata 19,4% (*range* 4-32%).<sup>43</sup> Metode ini juga bisa menggunakan analisis *melting curve*. Analisis ini dikembangkan untuk mengidentifikasi substitusi asam amino, seperti delesi HV69-70del, K417N, N439K, Y453F, E484K, N501Y, A570D, D614G, P681H atau V1176F.<sup>43</sup> Contoh hasil deteksi varian menggunakan SNP ditampilkan pada Gambar 9.



Gambar 9. Pemetaan genom varian SARS-CoV-2 dengan Teknik SNP.<sup>43</sup>



c. *Reverse transcription loop-mediated* dan *transcription-mediated amplification isothermal amplification (RT-LAMP)*

Metode *Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)* dan *transcription-mediated amplification (TMA)* pada mesin *Panther Hologic* dapat menjadi metode deteksi molekuler alternatif terhadap SARS-CoV-2. Metode tersebut memberikan manfaat terkait kecepatan deteksi dan sumber daya yang digunakan dengan tetap menjaga tingkat sensitivitas dan spesifitas, walaupun saat ini belum ada protokol pasti untuk membedakan antar varian yang diujikan.<sup>59</sup>

### **Kesimpulan**

Mutasi virus SARS-CoV-2 menimbulkan berbagai dampak, salah satunya terbentuknya varian baru. Perubahan genetik yang terjadi mendasari munculnya varian yang berpotensi menyebabkan beban tambahan pada pelayanan kesehatan dengan peningkatan tingkat penularan, penurunan efektivitas terapi, maupun penurunan kemampuan vaksinasi yang telah digencarkan. Deteksi varian sangat penting dilaksanakan untuk memetakan kewaspadaan baru. *Sequencing* adalah metode utama dalam proses deteksi varian tersebut.

### **Daftar Pustaka**

1. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants [Internet]. 2022 [cited 2022 Feb 24]. Available from: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>.
2. Duarte CM, Jamil T, Gojobori T, Alam I. Detection of SARS-CoV-2 variants requires urgent global coordination. *Int J Infect Dis*. 2021;109:50–3.
3. Sanjuán R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol life Sci*.

2016;73(23):4433–48.

4. Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data. Tracking of Variants [Internet]. 2022 [cited 2022 May 21]. Available from: <https://www.gisaid.org/hcov19-variants/>.
5. Twohig KA, Nyberg T, Zaidi A, Thelwall S, Simmathamby MA, Aliabadi S, et al. Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 delta (B. 1.617. 2) compared with alpha (B. 1.1. 7) variants of concern: a cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2021;S1473-3099(21)00475-8. Available from: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(21\)00475-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(21)00475-8).
6. Tareq AM, Emran T Bin, Dhama K, Dhawan M, Tallei TE. Impact of SARS-CoV-2 delta variant (B. 1.617. 2) in surging second wave of COVID-19 and efficacy of vaccines in tackling the ongoing pandemic. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2021;1–2. Available from: <https://dx.doi.org/10.1080/21645515.2021.1963601>.
7. O'Toole Á, Hill V, Pybus OG, Watts A, Bogoch II, Khan K, et al. Tracking the international spread of SARS-CoV-2 lineages B. 1.1. 7 and B. 1.351/501Y-V2 [version 2; peer review: 3 approved]. *Wellcome Open Res*. 2021;6:121.
8. World Health Organization. COVID-19 Weekly Epidemiological Update, Edition 58, 21 September 2021 [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 25]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19--21-september-2021>.
9. Abdool Karim SS, de Oliveira T. New SARS-CoV-2 variants—clinical, public health, and vaccine implications. *N Engl J Med*. 2021;384(19):1866–8.
10. Awadasseid A, Wu Y, Tanaka Y, Zhang W. SARS-CoV-2 variants evolved during the early stage of the pandemic and effects of mutations on adaptation in Wuhan populations. *Int J Biol Sci*. 2021;17(1):97.
11. Sharma V, Rai H, Gautam DNS, Prajapati PK, Sharma R. Emerging evidence on Omicron (B. 1.1. 529) SARS-CoV-2 variant. *J Med Virol*. 2022;1–10.
12. VanBlargan LA, Errico JM, Halfmann PJ, Zost SJ, Crowe JE, Purcell LA, et al. An infectious SARS-CoV-2 B. 1.1. 529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. *Nat Med*. 2022;1–6.
13. Li Q, Wu J, Nie J, Zhang L, Hao H, Liu S, et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell*. 2020;182(5):1284–94.
14. Starr TN, Greaney AJ, Addetia A, Hammon WW, Choudhary MC, Dingens AS,

- et al. Prospective mapping of viral mutations that escape antibodies used to treat COVID-19. *Science* (80- ). 2021;371(6531):850–4.
15. Martin R, Li J, Parvangada A, Perry J, Cihlar T, Mo H, et al. Genetic conservation of SARS-CoV-2 RNA replication complex in globally circulating isolates and recently emerged variants from humans and minks suggests minimal pre-existing resistance to remdesivir. *Antiviral Res.* 2021;188:105033.
  16. Wang R, Zhang Q, Ge J, Ren W, Zhang R, Lan J, et al. Analysis of SARS-CoV-2 variant mutations reveals neutralization escape mechanisms and the ability to use ACE2 receptors from additional species. *Immunity.* 2021;54(7):1611–21.
  17. Mahase E. Covid-19: How many variants are there, and what do we know about them? *BMJ.* 2021;374.
  18. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 26]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html>.
  19. Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev.* 2020;7(6):1012–23.
  20. Vasireddy D, Vanaparthi R, Mohan G, Malayala SV, Atluri P. Review of COVID-19 Variants and COVID-19 Vaccine Efficacy: What the Clinician Should Know? *J Clin Med Res.* 2021;13(6):317.
  21. Kupferschmidt K. Evolving threat. *Science* (80- ). 2021;373(6557):844–9.
  22. Darby AC, Hiscox JA. Covid-19: variants and vaccination. *BMJ.* 2021;372:n771.
  23. Moore JP, Offit PA. SARS-CoV-2 vaccines and the growing threat of viral variants. *Jama.* 2021;325(9):821–2.
  24. Parwanto MLE. Response to mutation and variants of the SARS-CoV-2 gene. *Universa Med.* 2021;40(2):77–8.
  25. Khateeb J, Li Y, Zhang H. Emerging SARS-CoV-2 variants of concern and potential intervention approaches. *Crit Care.* 2021;25:244.
  26. Badley AD. The Yin and Yang of SARS-CoV-2 Mutation and Evolution. In: *Mayo Clinic Proceedings.* Elsevier; 2021. p. 863–5.
  27. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490–502.

28. Simon-Loriere E, Holmes EC. Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(8):617–26.
29. Lucianus J. Introduksi Genetika Molekular Virus. *Maranatha J Med Heal.* 2010;3(1):148097.
30. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(7):409–24.
31. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Dingens AS, et al. Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell.* 2020;182(5):1295–310.
32. Watanabe Y, Berndsen ZT, Raghvani J, Seabright GE, Allen JD, Pybus OG, et al. Vulnerabilities in coronavirus glycan shields despite extensive glycosylation. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–10.
33. Silver ZA, Antonopoulos A, Haslam SM, Dell A, Dickinson GM, Seaman MS, et al. Discovery of O-linked carbohydrate on HIV-1 envelope and its role in shielding against one category of broadly neutralizing antibodies. *Cell Rep.* 2020;30(6):1862–9.
34. McCarthy KR, Rennick LJ, Nambulli S, Robinson-McCarthy LR, Bain WG, Haidar G, et al. Recurrent deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. *Science (80- ).* 2021;371(6534):1139–42.
35. McCallum M, De Marco A, Lempp FA, Tortorici MA, Pinto D, Walls AC, et al. N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell.* 2021;184(9):2332–47.
36. Zhou W, Wang W. Fast-spreading SARS-CoV-2 variants: challenges to and new design strategies of COVID-19 vaccines. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):226.
37. Banoun H. Evolution of SARS-CoV-2: Review of Mutations, Role of the Host Immune System. *Nephron.* 2021;145:392–403.
38. Wang L, Wang L, Zhuang H. Profiling and characterization of SARS-CoV-2 mutants' infectivity and antigenicity. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5:185.
39. Tasakis RN, Samaras G, Jamison A, Lee M, Paulus A, Whitehouse G, et al. SARS-CoV-2 variant evolution in the United States: High accumulation of viral mutations over time likely through serial Founder Events and mutational bursts. *PLoS One.* 2021;16(7):e0255169.

40. Gaffar S, Rahmani SAF, Hardianto A. Mutation and Phylogenetic Analysis of Spike Glycoprotein of Indonesian Isolates of Severe-Acute-Respiratory-Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Maj Kedokt Bandung-Mkb-Bandung Med J.* 2021;53(1):38–47.
41. World Health Organization. Methods for the detection and characterisation of SARS-CoV-2 variants: first update, 20 December 2021 [Internet]. World Health Organization. Regional Office for Europe; 2021. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Methods-for-the-detection-and-characterisation-of-SARS-CoV-2-variants-first-update.pdf>.
42. Chakraborty D, Agrawal A, Maiti S. Rapid identification and tracking of SARS-CoV-2 variants of concern. *Lancet.* 2021;397(10282):1346–7.
43. Harper H, BurrIDGE A, Winfield M, Finn A, Davidson A, Matthews D, et al. Detecting SARS-CoV-2 variants with SNP genotyping. *PLoS One.* 2021;16(2):e0243185.
44. European Centre for Disease Prevention and Control. Sequencing of SARS-CoV-2: first update [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 30]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Sequencing-of-SARS-CoV-2-first-update.pdf>.
45. World Health Organization. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 30]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340067/WHO-EURO-2021-2148-41903-57493-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
46. Kchouk M, Gibrat J-F, Elloumi M. Generations of sequencing technologies: from first to next generation. *Biol Med.* 2017;9(3):1000395.
47. Mestan KK, Ilkhanoff L, Mouli S, Lin S. Genomic sequencing in clinical trials. *J Transl Med.* 2011;9(1):222.
48. Patterson JD, Wongsurawat T, Rodriguez A. A glioblastoma genomics primer for clinicians. *Med Res Arch.* 2020;8(2):1–17.
49. Lembaga Biologi Molekuler Eijkman. Penelitian Whole Genome Sequencing SARS-CoV-2 [Internet]. 2021. Available from: <http://covid19.eijkman.go.id/capaian-kinerja/sars-cov-2-wgs/>.
50. Chiara M, D'Erchia AM, Gissi C, Manzari C, Parisi A, Resta N, et al. Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities. *Brief Bioinform.* 2021;22(2):616–30.
51. Cahyani I, Putro EW, Ridwanuloh AM, Wibowo S, Hariyatun H, Syahputra G,

et al. Genome Profiling of SARS-CoV-2 in Indonesia, ASEAN and the Neighbouring East Asian Countries: Features, Challenges and Achievements. *bioRxiv* [Internet]. 2021;1–23. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.07.06.451270v1.full.pdf>.

52. Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Dan Kedokteran Laboratorium Indonesia. Panduan Interpretasi Hasil Pemeriksaan Real Time PCR S Gene Target Failure (SGTF) Sars-CoV-2 [Internet]. 2022 [cited 2022 Feb 25]. Available from: <https://www.pdspatclin.or.id/post/panduan-interpretasi-hasil-pemeriksaan-real-time-pcr-s-gene-target-failure-sgtf-sars-cov-2>.
53. Wang H, Jean S, Eltringham R, Madison J, Snyder P, Tu H, et al. Mutation-specific SARS-CoV-2 PCR Screen: Rapid and Accurate Detection of Variants of Concern and the Identification of a Newly Emerging Variant with Spike L452R Mutation. *J Clin Microbiol*. 2021;JCM-00926.
54. Vega-Magaña N, Sánchez-Sánchez R, Hernández-Bello J, Venancio-Landeros AA, Peña-Rodríguez M, Vega-Zepeda RA, et al. RT-qPCR Assays for Rapid Detection of the N501Y, 69-70del, K417N, and E484K SARS-CoV-2 Mutations: A Screening Strategy to Identify Variants With Clinical Impact. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:434.
55. Korukluoglu G, Kolukirik M, Bayrakdar F, Ozgumus GG, Altas AB, Cosgun Y, et al. 40 minutes RT-qPCR Assay for Screening Spike N501Y and HV69-70del Mutations. *BioRxiv* [Internet]. 2021;1–17. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.26.428302v1.full.pdf>.
56. Lownik JC, Farrar JS, Way GW, McKay A, Roychoudhury P, Greninger AL, et al. Fast SARS-CoV-2 Variant Detection Using Snapback Primer High-Resolution Melting. *Diagnostics*. 2021;11(10):1788.
57. Matic N, Lowe CF, Ritchie G, Stefanovic A, Lawson T, Jang W, et al. Rapid Detection of SARS-CoV-2 Variants of Concern, Including B. 1.1. 28/P. 1, British Columbia, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(6):1673.
58. World Health Organization. Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities: interim guidance, 25 June 2021 [Internet]. World Health Organization; 2021. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-lab-testing-2021.1-eng>.
59. Thi VLD, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LPM, Kirrmaier D, et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med*. 2020;12(556):eabc7075.

### BAB III

## ETIOPATOGENESIS COVID-19

Virus SARS-CoV-1 dan SARS-CoV-2 (penyebab COVID-19), seperti kebanyakan virus, memasuki sel melalui endositosis, sehingga memungkinkan mereka untuk menargetkan sel untuk masuk melalui fusi dengan membran plasma.<sup>1</sup> Proses masuknya virus ke dalam sel berlangsung dalam tiga langkah, yaitu pengikatan, pembelahan, dan fusi. Protein *spike* virus akan mengikat sel inang melalui reseptor atau titik masuk yang dikenali.

Virus dalam genus beta coronavirus, yang termasuk dalam SARS-CoV-2, diketahui berikatan dengan beberapa protein seperti protein CEACAM1, *5-N-acetyl-9-O-acetyl neuraminic acid*, dan *angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)*.<sup>2</sup> Pengenalan ini didorong oleh domain di subunit S1. SARS-CoV2 memiliki afinitas tinggi terhadap ACE2 manusia, yang diekspresikan terutama dalam epitel dan jaringan kardiovaskular dan ginjal, serta berbagai sel dan jaringan lainnya.<sup>3</sup> Proses pengikatan dipandu oleh struktur molekul protein *spike*, yang terstruktur dalam tiga segmen: ektodomain, jangkar transmembran, dan ekor intraseluler. Ektodomain membentuk struktur seperti mahkota pada membran virus dan mengandung dua subdomain yang dikenal sebagai subunit S1 dan S2. Domain S1 (N-terminal) membentuk kepala mahkota dan berisi motif pengikatan reseptor, sementara domain S2 (C-terminal) membentuk tangkai yang menopang kepala. Subunit S1 memandu pengikatan virus ke sel inang, di sisi lain, subunit S2 memandu proses fusi.<sup>4</sup>



Pasca pengikatan subunit S1 ke titik masuk virus, protein *spike* Coronavirus sering dipecah pada batas S1/S2 menjadi subunit S1 dan S2 oleh protease inang.<sup>5</sup> *Priming* proteolitik ini penting untuk mempersiapkan protein S untuk menjalani fusi. Mirip dengan SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 menunjukkan redundansi yang dicirikan kegiatan protease inang untuk membelah protein S (28). Protease transmembran serin protease-2 (TMPRSS-2) dan *cathepsin B/L* telah menunjukkan peranan untuk memediasi *priming* proteolitik protein SARS-CoV-2 S, dan penghambatan enzim ini sepenuhnya menghambat masuknya virus secara *in vitro*. Protease lain juga diketahui membelah batas S1/S2 termasuk TMPRSS-4, tripsin, furin, dan *human airway trypsin-like protease* (HAT).<sup>4</sup>

SARS-CoV-2 dapat melewati membran mukosa, terutama mukosa nasal dan laring, kemudian memasuki paru-paru melalui traktus respiratorius. Selanjutnya, virus akan menyerang organ target yang mengekspresikan *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2), seperti paru-paru, jantung, sistem renal dan traktus gastrointestinal.<sup>6</sup> Protein S pada SARS-CoV-2 memfasilitasi masuknya virus ke dalam sel target melalui reseptor ACE2, dan bergantung pada *priming* protein S ke protease selular, yaitu TMPRSS2.<sup>7</sup>

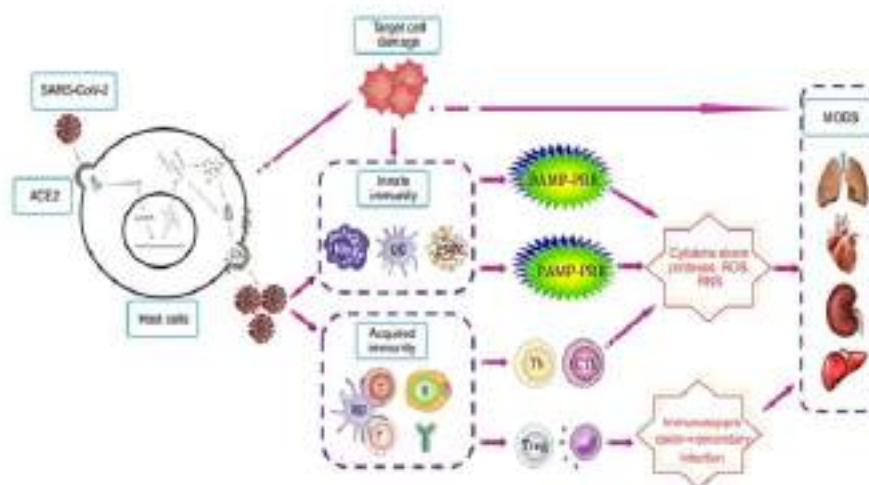
Antigen SARS-CoV-2 kemudian dapat merangsang imunitas humoral dan seluler tubuh, yang dimediasi oleh sel T dan B, selain oleh sistem imun bawaan melalui *RIG-I like receptors*, *NOD-like receptors*, dan *Toll-like receptors*. Hal ini selanjutnya akan menstimulasi produksi interferon (IFN), serta memicu munculnya efektor antivirus seperti sel CD8+, sel *Natural Killer* (NK), dan makrofag.<sup>8</sup>

Pola munculnya antibodi terhadap SARS-CoV memiliki pola produksi IgM dan IgG yang khas, yaitu antibodi IgM spesifik menghilang pada akhir minggu ke-12, sedangkan antibodi IgG dapat bertahan lama, menunjukkan peran protektif yang dimiliki. Laporan terbaru menunjukkan jumlah sel CD4 $\beta$ T dan CD8 $\beta$ T dalam darah perifer pasien yang terinfeksi SARS-CoV-2 berkurang secara signifikan, sedangkan status aktivasinya terjadi berlebihan, terbukti dengan proporsi HLA-DR yang tinggi (CD4 3,47%) dan CD38 (CD8 39,4%). Demikian pula, respons fase akut pada pasien dengan SARS-CoV ditunjukkan dengan penurunan berat dari sel CD4 $\beta$ T dan CD8 $\beta$ T.<sup>9</sup>

Infeksi dari virus mampu memproduksi reaksi imun yang berlebihan pada inang. Pada beberapa kasus, terjadi reaksi yang secara keseluruhan disebut "badai sitokin". Badai sitokin merupakan peristiwa reaksi inflamasi berlebihan dimana terjadi produksi sitokin yang berlebihan dan dalam jumlah yang banyak sebagai respon dari suatu infeksi. Hal ini menyebabkan terjadinya lonjakan sitokin proinflamasi dan kemokin (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-8, MCP-1, IL-1  $\beta$ , CCL2, CCL5, dan interferon) melalui aktivasi makrofag dan limfosit. Pelepasan sitokin ini memicu aktivasi sel imun adaptif seperti sel T, neutrofil, dan sel NK, bersamaan dengan terus terproduksinya sitokin proinflamasi. Hal tersebut menyebabkan kerusakan paru baik pada bagian epitel dan endotel yang menimbulkan *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) dan kegagalan multi organ.<sup>6</sup>

Bukti terbaru turut menunjukkan bahwa SARS-CoV-2 dapat memanfaatkan struktur spesifik sel endotel untuk memasuki sistem sirkulasi. Permukaan luminal (bagian dalam) endotelium dilapisi dengan glikokaliks, jaringan antara protein dan karbohidrat yang

terikat membran dan terlarut, terutama proteoglikan dan glikoprotein. Ketebalan glikokaliks bervariasi dari 0,5 mm di kapiler hingga 4,5 mm di arteri karotis dan membentuk jaringan yang melokalisasi sinyal yang diturunkan dari endotel dan plasma ke dinding pembuluh darah bagian dalam.<sup>4</sup> Heparan sulfat adalah proteoglikan dominan dalam glikokaliks, mewakili 50 hingga 90% kandungan proteoglikan glikokaliks.<sup>10</sup> Protein *spike* SARS-CoV-2 dapat mengikat langsung ke heparan sulfat, yang salah satunya berperan sebagai molekul *scaffolding* untuk memfasilitasi pengikatan ACE2 dan masuknya virus ke dalam sel endotel. Situs pengikatan heparan sulfat juga telah diidentifikasi di dekat situs pengikatan ACE2 pada RBD virus, dan dari pemodelan ditunjukkan bahwa pengikatan terkait heparan sulfat menghasilkan konformasi terbuka yang memfasilitasi pengikatan ACE2 pada permukaan sel. Heparan sulfat juga dapat berinteraksi dengan situs pembelahan proteolitik S1/S2 dan situs pengikatan lainnya untuk meningkatkan afinitas pengikatan.<sup>4</sup> Secara umum, skema patogenesis COVID-19 yang diperantarai oleh SARS-CoV-2 diringkas pada Gambar 1.



Gambar 1. Skema patogenesis COVID-19. Virus SARS-CoV-2 menargetkan sel dengan protein S yang dimiliki dan kemudian berikatan dengan reseptor ACE2, bereplikasi dan bersatu dalam sel target sebelum dikeluarkan secara ekstraseluler. Molekul pensinyalan inflamasi dilepaskan oleh sel terinfeksi dan dapat memicu jejas organ melalui sistem imun bawaan maupun spesifik.<sup>11</sup>

Selain patogenesis yang telah disampaikan, fitur penting terkait SARS-CoV-2 adalah kemampuannya untuk menghindari aktivitas sistem imun manusia. Hal ini dasarnya diawali oleh sifat infeksi virus SARS-CoV-2 yang menargetkan epitel sehingga membantu virus melewati penghalang fisik seperti mukus yang membentuk sistem kekebalan tidak spesifik. Setelah virus berhasil menyusup ke sel inang, kemampuannya sangat baik dalam menghindari deteksi oleh sistem imun. Hal ini terutama terkait interaksi virus dengan makrofag CD163 dan CD681 yang berfungsi sebagai reservoir virus yang membantu melindungi SARS-CoV dari respon imun bawaan.<sup>4</sup> Kurangnya replikasi virus aktif ini memungkinkan SARS-CoV-2 untuk lolos dari respon imun bawaan karena berkurangnya kadar RNA virus yang terdeteksi,



memungkinkan virus menghindari sel *natural killer* (NK) dan *Toll-like receptor* (TLR).<sup>12</sup> Bahkan selama proses replikasi, SARS-CoV-1 mampu menutupi genomnya dari deteksi oleh sistem imun. Hal ini karena virus tersebut dapat menginduksi pengembangan vesikel membran ganda yang melindungi deteksi RNA oleh sistem imun manusia.<sup>4</sup>

Data-data menunjukkan bahwa Coronavirus juga dapat mengganggu respon imun inang, bukan hanya menghindarinya. Contohnya, virulensi SARS-CoV-2 dapat ditingkatkan oleh nsp1, yang dapat menekan ekspresi gen inang dengan menghentikan penerjemahan mRNA dan menginduksi pembelahan endonukleolitik serta degradasi mRNA.<sup>13</sup> SARS-CoV-2 juga menghindari respon imun dengan mengganggu induksi pensinyalan interferon tipe I (IFN), suatu mekanisme yang menimbulkan resistensi seluler terhadap infeksi virus.<sup>14</sup> SARS-CoV-1 menggunakan metode seperti *ubiquitination* dan degradasi molekul adaptor sensor RNA *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS) dan *tumor necrosis factor receptor-associated factor* (TRAF) 3/6. Sementara itu, MERS-CoV menurunkan regulasi presentasi antigen melalui major histocompatibility complex (MHC) kelas I dan MHC kelas II, yang mengarah pada pengurangan aktivasi sel T. Mekanisme penghindaran ini dapat memfasilitasi infeksi sistemik. Coronavirus seperti SARS-CoV-1 juga dapat menghindari respon imun humoral melalui mekanisme lain, seperti menghambat jalur sitokin atau presentasi antigen yang menurunkan regulasi oleh sel.<sup>4</sup>

Periode inkubasi perkembangan kasus COVID-19 berkisar antara 3-14 hari. Pada tahap ini, kadar leukosit dan limfosit cenderung

normal atau sedikit menurun, serta pasien belum merasakan gejala. Selanjutnya, virus mulai menyebar melalui aliran darah, terutama menuju ke organ yang mengekspresikan ACE2 dan pasien mulai merasakan gejala ringan. Empat sampai tujuh hari dari gejala awal, kondisi pasien mulai memburuk dengan ditandai oleh timbulnya sesak, menurunnya limfosit, dan perburukan lesi di paru. Jika fase ini tidak teratasi, dapat terjadi ARDS, sepsis, dan komplikasi lain.<sup>6</sup>

### **Kesimpulan**

Perkembangan penyakit COVID-19 adalah suatu proses yang kompleks. Virus ini memasuki sel tubuh melalui tiga langkah, yaitu pengikatan, pembelahan, dan fusi pada sejumlah reseptor seperti CEACAM1, *5-N-acetyl-9-O-acetyl neuraminic acid*, dan *angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)*. Pasca memasuki tubuh manusia, virus ini memiliki kemampuan untuk menghindari pengenalan oleh sistem imun. Akhirnya, pada fase lanjut, berbagai komplikasi yang berpotensi mematikan dapat terjadi.

### **Daftar Pustaka**

1. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci*. 2020;117(21):11727–34.
2. Kim C-H. SARS-CoV-2 evolutionary adaptation toward host entry and recognition of receptor O-Acetyl sialylation in virus–host interaction. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4549.
3. Salamanna F, Maglio M, Landini MP, Fini M. Body localization of ACE-2: On the trail of the keyhole of SARS-CoV-2. *Front Med*. 2020;7:935.
4. Rando HM, MacLean AL, Lee AJ, Lordan R, Ray S, Bansal V, et al. Pathogenesis, symptomatology, and transmission of SARS-CoV-2 through analysis of viral genomics and structure. *Msystems*. 2021;6(5):e00095-21.

5. Tang T, Jaimes JA, Bidon MK, Straus MR, Daniel S, Whittaker GR. Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike at the S1/S2 boundary; potential role of proteases beyond furin. *ACS Infect Dis*. 2021;7(2):264–72.
6. Di Gennaro F, Pizzol D, Marotta C, Antunes M, Racialbuto V, Veronese N, et al. Coronavirus diseases (COVID-19) current status and future perspectives: a narrative review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(8):2690.
7. Handayani D, Hadi DR, Isbaniah F, Burhan E, Agustin H. Corona virus disease 2019. *J Respirologi Indones*. 2020;40(2):119–29.
8. Allegra A, Di Gioacchino M, Tonacci A, Musolino C, Gangemi S. Immunopathology of SARS-CoV-2 infection: immune cells and mediators, prognostic factors, and immune-therapeutic implications. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13):4782.
9. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal*. 2020;10(2):102–8.
10. Kim SH, Kearns FL, Rosenfeld MA, Casalino L, Papanikolas MJ, Simmerling C, et al. GlycoGrip: Cell Surface-Inspired Universal Sensor for Betacoronaviruses. *ACS Cent Sci*. 2021;8:22–42.
11. Li C, He Q, Qian H, Liu J. Overview of the pathogenesis of COVID-19. *Exp Ther Med*. 2021;22(3):1011.
12. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, Rotola A, Rizzo R. SARS-CoV-2 Spike 1 Protein Controls Natural Killer Cell Activation via the HLA-E/NKG2A Pathway. *Cells*. 2020;9(9):1975.
13. Borišek J, Spinello A, Magistrato A. Molecular Basis of SARS-CoV-2 Nsp1-Induced Immune Translational Shutdown as Revealed by All-Atom Simulations. *J Phys Chem Lett*. 2021;12(48):11745–50.
14. Min Y-Q, Huang M, Sun X, Deng F, Wang H, Ning Y-J. Immune evasion of SARS-CoV-2 from interferon antiviral system. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;19:4217–25.



## **BAB IV**

### **DIAGNOSIS INFEKSI SARS-COV-2**

Infeksi COVID-19 dapat menimbulkan berbagai spektrum gejala, baik dari gejala ringan, sedang atau berat, atau pada beberapa kasus bersifat asimtomatik. Gejala klinis utama yang timbul adalah demam (suhu  $>38^{\circ}\text{C}$ ), batuk dan kesulitan bernapas. Diperkirakan pada setengah dari pasien dapat timbul sesak dalam satu minggu. Pada kasus berat perburukan secara cepat dan progresif, seperti ARDS, syok septik, asidosis metabolik yang sulit dikoreksi dan perdarahan atau disfungsi sistem koagulasi dalam beberapa hari. Pada beberapa pasien, gejala yang muncul ringan, bahkan tidak disertai dengan demam. Kebanyakan pasien memiliki prognosis baik, dan sebagian kecil mengalami kondisi kritis bahkan meninggal.<sup>1</sup>

#### **Anamnesis dan Pemeriksaan Fisik**

Pada anamnesis gejala yang dapat ditemukan meliputi tiga gejala utama: demam, batuk kering (sebagian kecil berdahak) dan sulit bernapas atau sesak. Namun demikian, demam dapat tidak didapatkan pada beberapa keadaan, terutama pada usia geriatri atau pada mereka dengan imunokompromis. Gejala tambahan lainnya yaitu nyeri kepala, nyeri otot, lemas, diare dan batuk darah. Pada beberapa kondisi dapat terjadi tanda dan gejala infeksi saluran napas akut berat (*Severe Acute Respiratory Infection-SARI*). Definisi SARI yaitu infeksi saluran napas akut dengan riwayat demam (suhu  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) dan batuk dengan *onset* dalam 10 hari terakhir serta perlu perawatan di

rumah sakit. Tidak adanya demam tidak mengeksklusikan infeksi virus.<sup>1</sup>

Pada pemeriksaan fisik dapat ditemukan tampilan tergantung ringan atau beratnya keadaan pasien. Hal ini dapat dilihat dari kesadaran (kompos mentis atau penurunan kesadaran), tanda-tanda vital (frekuensi nadi meningkat, frekuensi napas meningkat, tekanan darah normal atau menurun, suhu tubuh meningkat, saturasi oksigen dapat normal atau turun), retraksi otot pernafasan. Pada pemeriksaan fisik paru didapatkan inspeksi dapat tidak simetris statis dan dinamis, fremitus raba mengeras, redup pada daerah konsolidasi, suara napas bronkovesikuler atau bronkial dan ronki kasar.<sup>1</sup> Ringkasan manifestasi klinis serta kriteria gejala pasien Covid-19 dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kriteria Gejala Pasien Covid-19.<sup>2,3</sup>

Kriteria gejala	Penjelasan
Asimtomatik	Pasien tidak menunjukkan gejala apapun. Merupakan kondisi paling ringan.
Sakit ringan	Gejala non-spesifik (seperti demam, batuk, nyeri tenggorokan, hidung tersumbat, malaise, anoreksia, <i>fatigue</i> , nafas pendek, sakit nyeri otot, mual dan muntah, anosmia, atau agusia) tanpa adanya tanda pneumonia virus maupun hipoksia. Pada pasien usia <b>1</b> <i>immunocompromised</i> dapat terjadi gejala atipikal (tingga penurunan kesadaran, mobilitas menurun, diare, hilang nafsu makan, delirium) tidak disertai demam). SpO <sub>2</sub> > 95% dengan udara ruangan.
Sakit sedang (pneumonia ringan)	<b>1</b> <b>Pasien Remaja atau Dewasa:</b> klinis pneumonia (demam, batuk, dispnea) tanpa tanda pneumonia berat (SpO <sub>2</sub> > 93% pada udara ruangan). <b>Anak:</b> pneumonia ringan (batuk atau kesulitan bernapas + napas cepat dan/atau retraksi dinding dada). Kriteria nafas cep frekuensi napas pada <2 bulan: ≥60x/menit; 2–11 bulan: ≥50x/menit; 1–5 tahun: ≥40x/menit tanpa tanda pneumonia berat.
Sakit berat (Pneumonia berat / ISPA berat)	<b>1</b> <b>Pasien remaja atau dewasa</b> dengan demam atau dalam pengawasan infeksi saluran napas, ditambah satu dari: frekuensi n x/menit, distress pernapasan berat, atau saturasi oksigen (SpO <sub>2</sub> ) <93% pada udara ruangan. <b>Pasien anak</b> dengan batuk atau kesulitan bernapas (tanda klinis pneumonia), ditambah setidaknya satu dari berikut ini: (1) sianosis atau SpO <sub>2</sub> <93%; (2) distress pernapasan berat (nafas cepat, <i>grunting</i> , tarikan dinding dada yang berat); (3) tanda bawah pneumonia berat); ketidakmampuan menyusu atau minum, letargi atau penurunan kesadaran, atau kejang. <b>1</b> Tanda lain dari pneumonia yaitu: tarikan dinding dada, takipnea: <2 bulan, ≥60x/menit; 2–11 bulan, ≥50x/menit; 1–5 tahun, ≥40x/menit; >5 tahun, ≥30x/menit.
Sakit kritis	Diagnosis ini berdasarkan klinis; pencitraan dada dapat membantu penegakan diagnosis dan dapat menyinkronkan komplikasi. <b>1</b> <b>Pasien</b> dengan <b>Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)</b> , sepsis dan syok sepsis, atau kondisi lainnya yang membutuhkan panjang hidup seperti ventilasi mekanik atau terapi vasopresor Onset: baru terjadi atau perburukan dalam waktu satu minggu Pencitraan dada (CT scan toraks, atau ultrasonografi paru) Onasitas bilateral, efusi pleura yang tidak dapat dijelaskan penyebabnya, kolaps paru, kolaps lobus atau nodul. Faktor lain yang menyinkronkan bahwa penyebab edema bukan akibat hidrostatis jika tidak ditemukan faktor <b>1</b> <b>1</b> <b>1</b> <b>1</b> • ARDS ringan: 200 mmHg <PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ≤ 300 mmHg (dengan PEEP atau continuous positive airway pressure (CPAP) ≥5 cmH <sub>2</sub> O tidak diventilasi) • ARDS sedang: 100 mmHg <PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ≤ 200 mmHg dengan PEEP ≥5 cmH <sub>2</sub> O, atau yang tidak diventilasi) • ARDS berat: PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ≤ 100 mmHg dengan PEEP ≥5 cmH <sub>2</sub> O, atau yang tidak diventilasi) Ketika PaO <sub>2</sub> tidak tersedia, SpO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ≤315 mengindikasikan ARDS (termasuk pasien yang tidak diventilasi)

## **Pemeriksaan Laboratorium**

Peranan laboratorium klinik sangat penting dalam upaya penanggulangan kasus infeksi SARS-CoV-2. Kegunaan pemeriksaan laboratorium tersebut beragam, mulai dari proses skrining, penegakan diagnosis, stratifikasi tingkat gejala penyakit, risiko komplikasi hingga prognosis pasien. Berbagai pemeriksaan yang dapat dilaksanakan terkait dengan infeksi SARS-CoV-2 ditampilkan pada bahasan berikut.

### *Pemeriksaan Hematologi dan Kimia Klinik*

Pemeriksaan hematologi adalah suatu bentuk pemeriksaan penunjang yang berperan dalam membantu proses diagnostik serta dapat menilai tingkat keparahan penyakit dan memprediksi risiko pada pasien COVID-19. Kelainan hematologi yang diamati pada pasien COVID-19 sebagian besar meliputi gangguan pada sistem imunitas, yaitu limfopenia. Peranan pemeriksaan hematologi tersebut juga dapat memprediksi keparahan kasus COVID-19, termasuk leukositosis dan neutrofilia.<sup>4</sup>

Berbagai parameter pemeriksaan darah lengkap dan rutin yang diujikan dinyatakan memiliki kepentingan klinis. Pemeriksaan tersebut meliputi kadar leukosit, neutrofil (termasuk persentase), limfosit (termasuk persentase), monosit (termasuk persentase), eosinofil, basofil, *platelet*, hemoglobin, rasio neutrofil-limfosit (*neutrophil-lymphocyte ratio*, NLR), rasio monosit-limfosit (*monocyte-lymphocyte ratio*, MLR), rasio *platelet*-limfosit (*platelet-lymphocyte ratio*, PLR).<sup>5-7</sup> Suatu studi menunjukkan bahwa MLR memiliki akurasi terbaik untuk membedakan pasien COVID-19

terhadap subjek sehat.<sup>6</sup> Sementara itu, nilai NLR memiliki peranan yang luas, dengan kemampuannya untuk membantu diagnosis dan penilaian prognosis karena adanya dinamika kadar NLR pada saat perawatan yang dikaitkan dengan disfungsi sistem imun.<sup>8</sup>

Penanda kerusakan organ dan inflamasi juga dapat menunjukkan peranan yang bermakna dalam menunjukkan kondisi penyakit COVID-19. Pemeriksaan tersebut meliputi kadar *C-reactive protein* (CRP), laktat dehidrogenase (LDH), *aspartate aminotransferase* (AST), *alanine aminotransferase* (ALT).<sup>5,6</sup> Variasi umumnya dikaitkan dengan perubahan usia, antara lain peningkatan AST, bilirubin total, bilirubin direk, globulin, kreatinin, *Blood Urea Nitrogen* (BUN), kreatin kinase, *Creatine kinase-myocardial band isoenzyme* (CK-MB), LDH, mioglobin, CRP dan prokalsitonin berdasarkan kelompok usia. Sementara, penurunan terkait kelompok usia ditemukan pada albumin, Laju Filtrasi Glomerulus (LFG) menurun seiring dengan peningkatan usia. Pada dasarnya, gangguan fungsi organ yang ditunjukkan dengan penanda-penanda di atas dapat dijumpai terutama terkait dengan peningkatan keparahan penyakit COVID-19.<sup>9</sup>

#### *Pemeriksaan Indikator Hemostasis*

Dua indikator hemostasis yang rutin diperiksa, yaitu fibrinogen dan D-dimer ditemukan meningkat pada pasien COVID-19 dan menjadi penanda kondisi hiperkoagulasi. Selain itu, juga dapat ditemukan adanya perpanjangan *prothrombin time* (PT) dan trombositopenia (relatif jarang), suatu tanda fibrinolisis sekunder, selain peningkatan D-dimer.<sup>10</sup> Di sisi lain, temuan trombosit juga

dapat berupa trombofilia, yang dapat pula menyebabkan defisiensi *inherited protein C (PC)*, *protein S (PS)*, dan *antitrombin (AT)*.<sup>11</sup> Perubahan indikator koagulasi tersebut dihubungkan dengan proses koagulasi intravaskular diseminata (*Disseminated intravascular coagulation, DIC*). Koagulopati terkait COVID-19 secara klinis dapat dilihat dari keterlibatan paru-paru dan trombosis, serta perubahan-perubahan yang telah disampaikan di atas.<sup>12</sup>

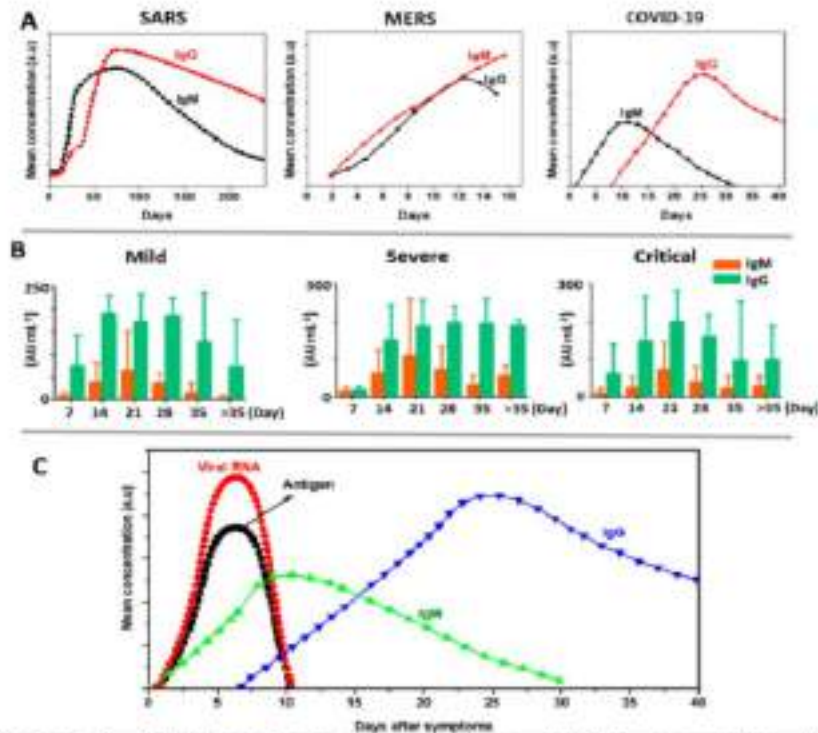
Penanda koagulasi lain juga ditemukan mengalami kelainan pada kasus koagulopati yang diperantarai oleh COVID-19. Beberapa temuan meliputi peningkatan kadar faktor V, VIII, serta faktor Von Willebrand (vWF). Perubahan tersebut dikaitkan dengan proses inflamasi, sesuai dengan peranan faktor-faktor ini sebagai reaktan fase akut. Perubahan ditemukan sejalan dengan keparahan penyakit, gangguan sel endotel, serta peningkatan risiko trombosis vena.<sup>10</sup> Temuan lain ditujukan pada perubahan kadar antibodi IgA antikardiolipin (aCL), antibodi IgA dan IgG anti-b2 glikoprotein I, maupun antikoagulan lupus (LA).<sup>12</sup>

### *Imunoserologi*

Tes serologis merupakan uji yang mendeteksi antigen dan antibodi yang ditujukan untuk mengetahui adanya virus. Terkhusus pada virus SARS-CoV-2, temuan serupa dengan keluarga coronavirus lain diharapkan dapat muncul, yaitu ditandai dengan periode jeda 14-28 hari setelah timbulnya penyakit sampai antibodi muncul dalam serum pasien.<sup>13</sup> Kekuatan respon antibodi tergantung pada beberapa faktor seperti usia, status gizi, keparahan penyakit, dan obat-obatan atau infeksi tertentu yang dapat menekan sistem imun manusia.<sup>14</sup>



Dinamika antigen dan antibodi pada infeksi SARS-CoV-2 dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 1. Profil serologi pasien dengan infeksi coronavirus. (A) Gambaran kadar Immunoglobulin M (IgM) dan Immunoglobulin G (IgG) pada kasus Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), Middle East Respiratory Syndrome (MERS) dan Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). (B) Profil IgM dan IgG kasus COVID-19 dengan kondisi penyakit berdasarkan derajat ringan, berat, dan kritis. (C) Temuan dinamika RNA virus, antigen (dalam sampel nasofaring) dan antibodi (dalam darah) dalam tubuh seseorang setelah infeksi SARS-CoV-2.<sup>15</sup>

Seperti yang telah disampaikan sebelumnya, selain pemeriksaan antigen, uji serologi juga meliputi pemeriksaan antibodi terhadap SARS-CoV-2. Pemeriksaan ini hanya bertujuan untuk mendukung diagnosis COVID-19 atau komplikasinya pada pasien suspek COVID-19 dengan gejala klinis khas yang tidak terkonfirmasi secara NAAT



2

dengan adanya serokonversi atau peningkatan titer antibodi dari spesimen *paired sera* (pengambilan spesimen di masa akut dan konvalesen di minggu ke 2-4) maupun pasien dengan *multisystem inflammatory syndrome* dan sindrom yang dicurigai sebagai sekuele dari COVID-19 lainnya. Tujuan pemeriksaan ini juga dapat dilaksanakan untuk skrining calon donor plasma konvalesen serta kepentingan epidemiologi.<sup>16</sup>

Pemeriksaan antibodi secara *laboratory-based test* dapat menilai kadar antibodi secara kualitatif, semikuantitatif dan kuantitatif. Pemeriksaan ini dapat menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) atau *Chemiluminescence Immunoassay* (CLIA) dengan sampel berupa serum, plasma, *whole blood*, dan *dried blood spots*. Reagen yang tersedia saat ini dapat memeriksa kadar total antibodi, IgG dan/atau IgM terhadap protein S / N / S-RBD. Saat ini sudah tersedia reagen *multiplex assay* yang dapat mendeteksi antibodi terhadap protein *immunodominant* (protein N dan protein S).<sup>16</sup>

#### *Uji Diagnostik*

Hingga saat ini, pemeriksaan diagnostik pada kasus COVID-19 terutama bergantung pada penggunaan tes deteksi molekuler/NAAT (*Nucleic Acid Amplification Test*) seperti RT-PCR (termasuk Tes Cepat Molekuler/TCM yang digunakan untuk pemeriksaan TB dan mesin PCR Program HIV AIDS dan PIMS yang digunakan untuk memeriksa *Viral Load HIV*) sebagai baku emas.<sup>2</sup> Pada kasus tertentu, pemeriksaan serologis juga dapat dilaksanakan (seperti tes diagnostik cepat dengan *rapid antigen*), terutama pada daerah dengan sumber

daya terbatas atau waktu tunggu yang terlalu lama (>24 jam). Namun demikian, walaupun terdapat hasil laboratorium yang negatif dengan adanya gejala klinis yang dicurigai mengarah pada COVID-19, pendekatan klinis dapat digunakan untuk menegakkan keputusan klinis (terutama tatalaksana).<sup>17</sup>

Pemeriksaan diagnostik alternatif untuk deteksi SARS-CoV-2 adalah menggunakan RT *loop-mediated isothermal amplification* (RT-LAMP). Pemeriksaan ini berdasarkan pada nanoteknologi untuk mendeteksi partikel virus sesuai tingkat turbiditas atau kalorimetri atau pengukuran fluoresensi. Kelebihan teknik ini adalah kemudahan pemeriksaan dan rendahnya gangguan latar belakang pemeriksaan. Namun demikian, pemeriksaan ini memiliki keterbatasan utama, yaitu harus adanya pengalaman pemeriksa, serta optimisasi interpretasi dan reaksi.<sup>18</sup>

#### *Parameter laboratorium dan prognosis pasien COVID-19*

Berbagai pemeriksaan laboratorium, mulai dari pemeriksaan hematologi rutin hingga faktor koagulasi memiliki peranan yang luas pada kasus COVID-19, khususnya menentukan prognosis pada awal awitan penyakit. Hal ini didasari kemampuan penanda-penanda tersebut dalam mendeteksi inflamasi atau infeksi berat.<sup>19</sup> Selain itu, pada meta-analisis terdapat hasil penurunan hitung trombosit yang terjadi secara signifikan pada kasus COVID-19 sehingga dapat berperan sebagai faktor penentu diagnosis dan prognosis. Perbedaan juga dijumpai pada hitung leukosit, neutrofil, limfosit, D-dimer dan CRP, yang juga menunjukkan peranan indikator tersebut pada prognosis COVID-19.<sup>20</sup> D-dimer terutama juga dihubungkan dengan

kejadian buruk berupa tromboemboli vena (emboli pulmonal dan trombosis vena dalam) yang dapat menyebabkan perburukan prognosis pasien.<sup>21</sup>

Data-data yang didapatkan dapat menyusun berbagai sistem skoring untuk penentuan prognosis awal pasien COVID-19, khususnya pada yang bergejala klinis berat/kritis. WHO melalui *International Severe Acute Respiratory and emerging Infections Consortium* (ISARIC) mengembangkan *4C mortality score*. Skor mortalitas ini mencakup variabel usia, jenis kelamin, jumlah komorbiditas, kecepatan pernafasan, saturasi oksigen perifer, tingkat kesadaran, kadar urea dan *C-reactive protein* (CRP) (rentang skor 0–21). Didapatkan pasien dengan skor lebih atau sama 15 mempunyai risiko mortalitas sebesar 62% dibandingkan pasien dengan skor tiga atau kurang yang hanya 1 %.<sup>22</sup>

Beberapa negara telah turut mengembangkan skoring sendiri berdasarkan kondisi yang berkembang di daerahnya. Penelitian dari Korea memperkenalkan COVID-19 *prognosis score* (COPS). Pada penelitian ini digunakan enam parameter: usia tua, demensia, penyakit ginjal kronik, dispnoe, gangguan mental, dan *absolute lymphocyte count* (ALC) <1000/mm yang menjadi dasar penentuan *survival rate*. Akhirnya, terdapat empat kelompok risiko, yaitu risiko rendah (*low-risk*) dengan skor 0-2, risiko sedang (*intermediate-risk*) dengan skor 3, risiko tinggi (*high-risk*) dengan skor 4 dan risiko sangat tinggi (*very high-risk*) dengan skor 5-7.<sup>23</sup> Penelitian lainnya dari China mengembangkan skor yang dikenal dengan *scoring system of COVID-19* (CSS). CSS menilai variabel usia tua, penyakit jantung koroner, persentase limfosit, prokalsitonin dan D-dimer sebagai faktor

independen kematian pasien. Shang, dkk kemudian membagi pasien menjadi dua kelompok yaitu kelompok risiko rendah (skor 0-2) dan kelompok risiko tinggi (skor >2).<sup>24</sup> Penilaian ini dapat mempermudah klinisi untuk proses penanganan pasien serta dapat menurunkan morbiditas dan mortalitas kasus COVID-19.

### **Kesimpulan**

Diagnosis COVID-19 melibatkan gabungan dari aspek klinis (anamnesis, pemeriksaan fisik) serta penunjang laboratorium. Berdasarkan kombinasi pendekatan di atas, stratifikasi derajat penyakit dan risiko yang dialami dapat dilaksanakan. Pemeriksaan diagnosis utama hingga saat ini masih menggunakan tes deteksi asam nukleat (bahan genetik virus) dengan RT-PCR sebagai pemeriksaan utamanya.

### **Daftar Pustaka**

1. Burhan E, Isbaniah F, Susanto AD, Yoga T, Aditama, Soedarsono, et al. *Pneumonia Covid-19: Diagnosis & Penatalaksanaan di Indonesia*. Jakarta: Perhimpunan Dokter Paru Indonesia; 2020.
2. Sugihantono A, Burhan E, Samuedro E, Aryati, Rinawati W, Sitompul PA, et al. *Pedoman Pencegahan dan Pengendalian Coronavirus Disesase*. Revisi 5. Aziza L, Aqmarina A, Ihsan M, editors. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2020.
3. Burhan E, Susanto AD, Nasution SA, Ginanjar E, Pitoyo CW, Susilo A, et al. *PEDOMAN TATALAKSANA COVID-19*. 4th ed. Burhan E, Susanto AD, Isbaniah F, Nasution SA, Ginanjar E, Pitoyo CW, et al., editors. Jakarta: Perhimpunan Dokter Paru Indonesia (PDPI)/Perhimpunan Dokter Spesialis Kardiovaskular Indonesia (PERKI)/Perhimpunan Dokter Spesialis Penyakit Dalam Indonesia (PAPDI)/Perhimpunan Dokter Anestesiologi dan Terapi Intensif Indonesia (PERDATIN)/Ikatan Dokter An; 2022.
4. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus

- disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(7):1063–9.
5. Ferrari D, Motta A, Strollo M, Banfi G, Locatelli M. Routine blood tests as a potential diagnostic tool for COVID-19. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(7):1095–9.
  6. Peng J, Qi D, Yuan G, Deng X, Mei Y, Feng L, et al. Diagnostic value of peripheral hematologic markers for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A multicenter, cross-sectional study. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(10):e23475.
  7. Tanni F, Akker E, Zaman MM, Figueroa N, Tharian B, Hupart KH. Eosinopenia and COVID-19. *J Osteopath Med*. 2020;120(8):504–8.
  8. Fu J, Kong J, Wang W, Wu M, Yao L, Wang Z, et al. The clinical implication of dynamic neutrophil to lymphocyte ratio and D-dimer in COVID-19: A retrospective study in Suzhou China. *Thromb Res*. 2020;192:3–8.
  9. Zhao M, Wang M, Zhang J, Gu J, Zhang P, Xu Y, et al. Comparison of clinical characteristics and outcomes of patients with coronavirus disease 2019 at different ages. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(11):10070.
  10. Devreese KMJ. COVID-19-related laboratory coagulation findings. *Int J Lab Hematol*. 2021;43:36–42.
  11. Connors JM. Thrombophilia testing and venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1177–87.
  12. Aggarwal M, Dass J, Mahapatra M. Hemostatic abnormalities in COVID-19: an update. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2020;1–11.
  13. Hueston L, Kok J, Guibone A, McDonald D, Hone G, Goodwin J, et al. The antibody response to SARS-CoV-2 infection. *Open forum Infect Dis*. 2020;7(9):ofaa387.
  14. Ahmad T, Chaudhuri R, Joshi MC, Almatroudi A, Rahmani AH, Ali SM. COVID-19: The emerging immunopathological determinants for recovery or death. *Front Microbiol*. 2020;11:2815.
  15. Augustine R, Das S, Hasan A, Abdul Salam S, Augustine P, Dalvi YB, et al. Rapid antibody-based COVID-19 mass surveillance: relevance, challenges, and prospects in a pandemic and post-pandemic world. *J Clin Med*. 2020;9(10):3372.
  16. Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium Indonesia. Revisi Panduan Tatalaksana Pemeriksaan Antibodi SARS-CoV-2. 123/PP-PATKLIN/V/2021 Indonesia; 2021.

17. Zayed RA, Omran D, Zayed AA. COVID-19 clinical and laboratory diagnosis overview. *J Egypt Public Health Assoc.* 2021;96(1):1–5.
18. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater.* 2021;20(5):593–605.
19. Lagadinou M, Salomou E, Zareifopoulos N, Marangos M, Gogos C, Velissaris D. Prognosis of COVID-19: changes in laboratory parameters. *Le Infez Med.* 2020;28(Suppl. 1):89–95.
20. Soraya GV, Ulhaq ZS. Crucial laboratory parameters in COVID-19 diagnosis and prognosis: an updated meta-analysis. *Med Clin (Barc).* 2020;155(4):143–51.
21. Liu Y, Cai J, Wang C, Jin J, Qu L. Incidence, prognosis, and laboratory indicators of venous thromboembolism in hospitalized patients with coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2021; 9(5):1099-1111.e6.
22. Knight SR, Ho A, Pius R, Buchan I, Carson G, Drake TM, et al. Risk stratification of patients admitted to hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: development and validation of the 4C Mortality Score. *bmj.* 2020;370.
23. Lee D-G. Prognosis Score System to Predict Survival for COVID-19 Cases: a Korean Nationwide Cohort Study. *J Med Internet Res.* 2021;23(2):e26257.
24. Shang Y, Liu T, Wei Y, Li J, Shao L, Liu M, et al. Scoring systems for predicting mortality for severe patients with COVID-19. *EClinicalMedicine.* 2020;24:100426.



## **BAB V**

### **PRA-ANALITIK DAN PEMERIKSAAN SAMPEL PADA INFEKSI SARS-COV-2**

#### **Jenis Uji dan Teknis Pemeriksaan Sampel**

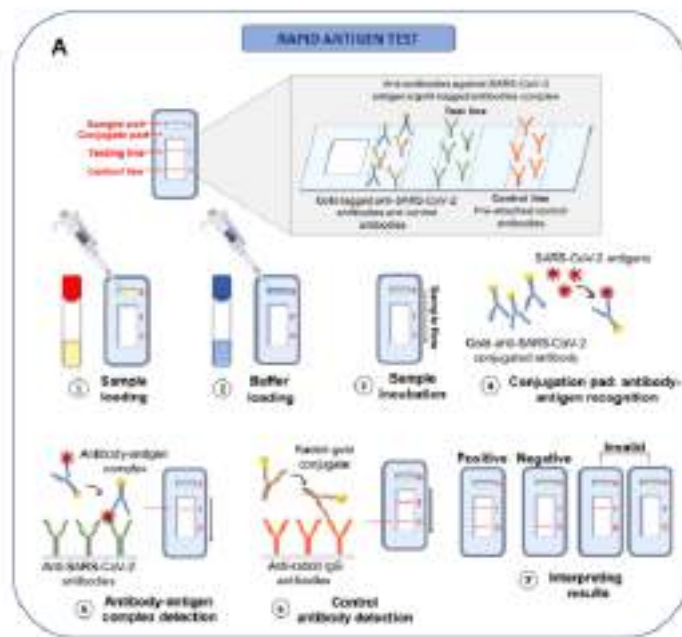
##### *Pemeriksaan Antigen SARS CoV-2*

Pengujian diagnostik untuk mendeteksi antigen menggunakan spesimen saluran pernafasan atas atau saliva merupakan suatu metode diagnostik yang dikembangkan menguji infeksi SARSCoV-2 dengan mendeteksi protein virus (contoh: nukleoprotein). Tes ini lebih cepat dan murah dibandingkan tes amplifikasi asam nukleat (NAAT) dengan RT-PCR. Deteksi antigen akan bekerja paling baik pada pasien dengan viral load tinggi, pada awal awitan infeksi, serta pada prevalensi SARS-CoV-2  $\geq 5\%$  (terkait nilai prediksi positif yang lebih tinggi). Rekomendasi penggunaan deteksi cepat antigen ini perlu memenuhi sejumlah syarat seperti sensitivitas minimal 80% dan spesifisitas 97% serta pemeriksaan *nucleic acid amplification tests* (NAAT), terutama berupa *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) memiliki akses yang sulit atau tidak tersedia.<sup>1</sup> Temuan sensitivitas tertinggi ditemukan bila sampel diambil dari nares anterior dibandingkan dari nasofaring, orofaring, turbin media, maupun saliva.<sup>2</sup>

Pengambilan spesimen dilaksanakan melalui jalur *swab* baik nasofaring maupun orofaring. Prosedur pengambilan spesimen dilaksanakan berdasarkan beberapa tahapan sebagai berikut: (a) penggunaan APD sesuai standar (disarankan level 3), (b) penggunaan swab yang terbuat dari dakron/rayon steril dengan tangkai plastik atau



jenis *flocked swab* (tangkai lebih lentur), (c) pastikan tidak ada obstruksi (hambatan pada lubang hidung), (d) masukkan secara perlahan *swab* ke dalam hidung, pastikan posisi *swab* pada septum bawah hidung, secara perlahan-lahan ke bagian nasofaring, (e) lakukan *swab* kemudian laksanakan gerak memutar secara perlahan, kemudian lakukan pengetesan pada aparatus yang tersedia.<sup>3</sup> Proses deteksi antigen SARS-CoV-2 menggunakan alat tes cepat dapat dilihat pada gambar berikut.



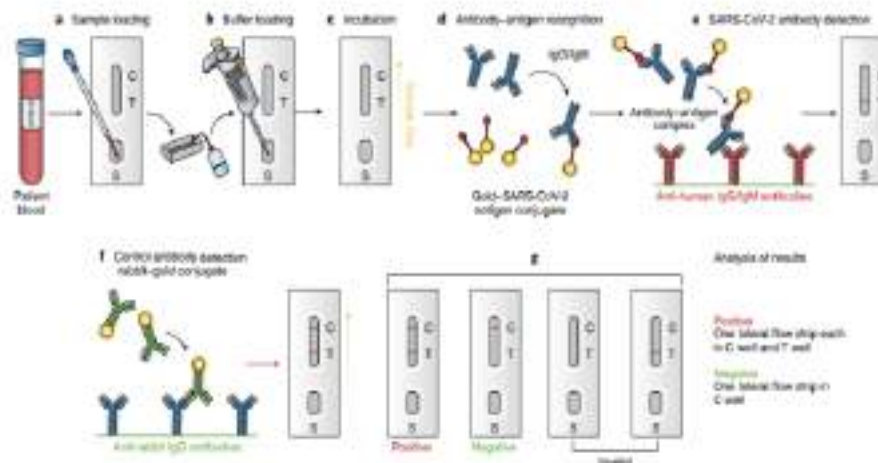
Gambar 1. Pemeriksaan *rapid antigen*. Gambar di atas menunjukkan alur kerja pada pemeriksaan *rapid antigen* SARS-CoV-2 melalui *lateral flow immunoassay*. Alur dimulai dari pengambilan sampel (umumnya dengan *swab* nasofaring), penambahan *buffer*, inkubasi sampel serta pembacaan hasil.<sup>4</sup>

#### *Pemeriksaan Antibodi terhadap SARS CoV-2*

Uji lainnya pada COVID-19 adalah pemeriksaan antibodi terhadap SARS-CoV-2 (Gambar 2). Pemeriksaan ini hanya bertujuan

2

untuk mendukung diagnosis COVID-19 atau komplikasinya pada pasien suspek COVID-19 dengan gejala klinis khas yang tidak terkonfirmasi secara NAAT dengan adanya serokonversi atau peningkatan titer antibodi dari spesimen *paired sera* (pengambilan spesimen di masa akut dan konvalesen di minggu ke 2-4) maupun pasien dengan *multisystem inflammatory syndrome* dan sindrom yang dicurigai sebagai sekuele dari COVID-19 lainnya. Tujuan pemeriksaan ini juga dapat dilaksanakan untuk skrining calon donor plasma konvalesen serta kepentingan epidemiologi.<sup>5</sup>



Gambar 2. Tes yang mendeteksi antibodi spesifik SARS-CoV-2 menggunakan membran nitroselulosa. a–e, tahapan tindakan; f, gambaran deteksi antigen; g, tes positif ditandai temuan pita berwarna pada kolom kontrol (C) dan tes (T), sementara bila hanya C yang berwarna, maka hasil tes adalah negatif. Kolom C harus positif untuk menyatakan hasil bersifat valid.<sup>6</sup>

Pemeriksaan antibodi secara *laboratory-based test* dapat menilai kadar antibodi secara kualitatif, semikuantitatif dan kuantitatif. Pemeriksaan ini dapat menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) atau *Chemiluminescence Immunoassay* (CLIA) dengan sampel berupa serum, plasma, *whole*

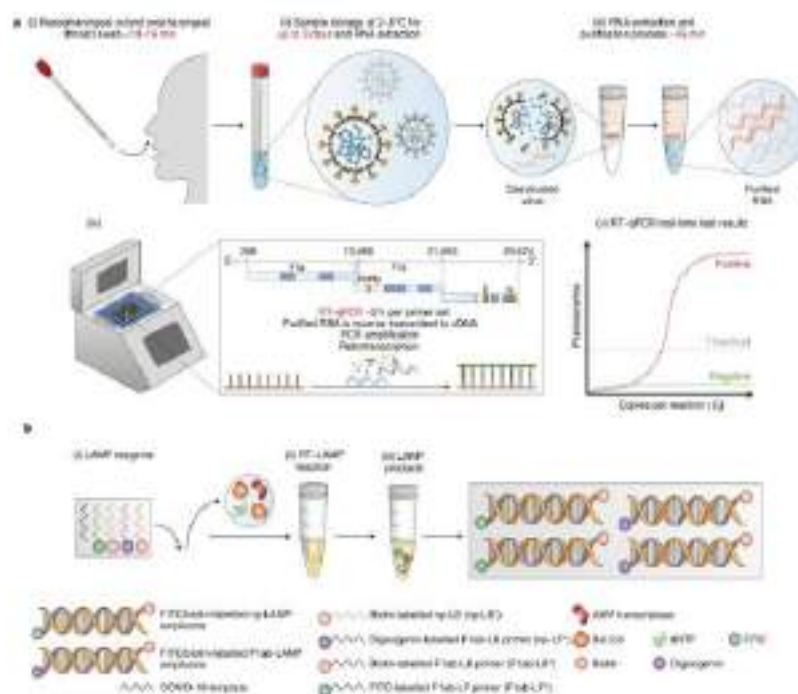
*blood*, dan *dried blood spots*. Reagen yang tersedia saat ini dapat memeriksa kadar total antibodi, IgG dan/atau IgM terhadap protein S / N / S-RBD. Saat ini sudah tersedia reagen *multiplex assay* yang dapat mendeteksi antibodi terhadap protein *immunodominant* (protein N dan protein S).<sup>5</sup>

#### *Pemeriksaan Materi Genetik SARS CoV-2*

Hingga saat ini, pemeriksaan diagnostik pada kasus COVID-19 terutama bergantung pada penggunaan tes deteksi molekuler/NAAT (*Nucleic Acid Amplification Test*) seperti RT-PCR (termasuk Tes Cepat Molekuler/TCM yang digunakan untuk pemeriksaan TB dan mesin PCR Program HIV AIDS dan PIMS yang digunakan untuk memeriksa *Viral Load HIV*) sebagai baku emas.<sup>7</sup> Pada kasus tertentu, pemeriksaan serologis juga dapat dilaksanakan (seperti tes diagnostik cepat dengan *rapid antigen*), terutama pada daerah dengan sumber daya terbatas atau waktu tunggu yang terlalu lama (>24 jam). Namun demikian, walaupun terdapat hasil laboratorium yang negatif dengan adanya gejala klinis yang dicurigai mengarah pada COVID-19, pendekatan klinis dapat digunakan untuk menegakkan keputusan klinis (terutama tatalaksana).<sup>8</sup>

Pemeriksaan diagnostik alternatif untuk deteksi SARS-CoV-2 adalah menggunakan RT *loop-mediated isothermal amplification* (RT-LAMP). Pemeriksaan ini berdasarkan pada nanoteknologi untuk mendeteksi partikel virus sesuai tingkat turbiditas atau kalorimetri atau pengukuran fluoresensi. Kelebihan teknik ini adalah kemudahan pemeriksaan dan rendahnya gangguan latar belakang pemeriksaan. Namun demikian, pemeriksaan ini memiliki keterbatasan utama, yaitu

harus adanya pengalaman pemeriksa, serta optimisasi interpretasi dan reaksi. Tes ini menggunakan kertas/strip sebagai *platform* mikrofluidik untuk deteksi virus dengan penambahan zat fluoresens untuk mendeteksi hasil dari reaksi katalisasi.<sup>6</sup> Teknis pemeriksaan RT-PCT dan RT-LAMP dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pemeriksaan diagnostik pada kasus COVID-19. (a) Uji RT-PCR. Uji ini diawali swab nasofaring untuk mengumpulkan sampel pasien. Selanjutnya, RNA diekstraksi dari cairan yang mengandung sel yang terinfeksi SARS-CoV-2 dan partikel virus bebas dan kemudian ditranskripsikan secara terbalik membentuk DNA komplemen (cDNA) dan diamplifikasi untuk mendeteksi asam nukleat virus. Daerah yang dilestarikan dari gen RdRp dan E adalah segmen virus subgenomik yang diamplifikasi dengan probe fluorogenik oleh qPCR. (b) Uji RT-LAMP (amplifikasi isothermal). Metode ini digunakan untuk menjadi alternatif tes RT-PCR. Pengujian ini sama sensitifnya dengan PCR standar, mampu mendeteksi <10 salinan virus per reaksi.<sup>6</sup> Catatan: dNTP, deoksiribonukleosida 5'-trifosfat.



### Pengambilan, pengemasan dan transpor sampel

Pengambilan sampel harus memperhatikan keamanan, khususnya bagi tenaga kesehatan. Bagi tenaga kesehatan yang mengambil spesimen atau bekerja dalam jarak <6 kaki (sekitar 183 cm) dari pasien suspek COVID-19 harus menerapkan kewaspadaan standar dengan alat pelindung diri yang adekuat, meliputi masker N95 atau respirator yang lebih tinggi (atau *face mask* jika respirator tidak tersedia), pelindung mata, sarung tangan dan *gown*. Penggunaan *face mask* adalah kewajiban selama berada di fasilitas kesehatan.<sup>9</sup> Gambaran alat pelindung diri pada proses pengambilan sampel pernafasan dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 4. Skema alat pelindung diri (APD) tingkat 3. Alat pelindung diri ini dapat digunakan pada beberapa situasi, antara lain pengambilan sampel pernafasan (swab nasofaring dan orofaring), kegiatan yang berisiko menimbulkan aerosol, maupun pada saat pelaksanaan tindakan operasi pada pasien suspek, *probable*, maupun konfirmasi COVID-19. APD level 3 terdiri atas masker N95 atau setara, *coverall/gown*, sepatu (disarankan *boots*), pelindung mata (*google*), *face shield*, sarung tangan karet steril sekali pakai, *headcap*, serta apron.<sup>10</sup>

Pengambilan spesimen harus disesuaikan dengan tampilan klinis dan *onset* gejala. Setidaknya, pemeriksaan harus menggunakan sampel dari saluran pernafasan. Pada tahap awal, dilaksanakan pengambilan sampel dari saluran pernafasan atas, khususnya pada kasus infeksi awal dengan menggunakan kombinasi pemeriksaan *swab* nasofaring (Gambar 5) dan orofaring. Sementara itu, pemeriksaan sampel dari saluran pernafasan bawah dapat digunakan pada tahap lanjut perkembangan COVID-19 atau pada pasien dengan hasil pemeriksaan sampel saluran pernafasan atas yang negatif walaupun dengan kecurigaan klinis COVID-19 yang kuat. Pemeriksaan tersebut harus dilakukan dengan hati-hati karena memiliki risiko aerosolisasi yang tinggi.<sup>11</sup> Ringkasan mengenai lokasi pengambilan sampel ditampilkan pada Tabel 1.

Saat ini, pemeriksaan dari sampel lain (terutama cairan oral) telah dikembangkan, khususnya untuk pemeriksaan massal. Pengambilan sampel tersebut dapat dilakukan baik dari cairan orofaring posterior/saliva melalui meludah atau *drooling* (pengumpulan) maupun menggunakan pipet atau spons khusus. Namun demikian, sensitivitas dan spesifitasnya memiliki variasi yang lebar.<sup>11</sup>

Selain spesimen di atas, penelitian terbaru turut menunjukkan adanya potensi dari sampel lain. Sampel berupa feses dapat dipertimbangkan bila *onset* gejala sudah berlangsung setidaknya dua minggu dengan hasil pemeriksaan sampel saluran pernafasan negatif. Spesimen dari serum juga dapat diperiksa dan harus *paired* (satu pada fase akut, satu pada masa *convalescent*, sekitar 2-4 minggu dari sampel awal untuk mendeteksi serokonversi pada titer antibodi.



Sementara itu, pada sampel postmortem, dapat dilaksanakan pengambilan sampel secara *swab*, biopsi jarum maupun autopsi jaringan tubuh (termasuk paru-paru) untuk pemeriksaan histopatologi dan mikrobiologi.<sup>11</sup>

Tabel 1. Pengambilan sampel untuk pemeriksaan kasus COVID-19.<sup>9,12</sup>

	Tes	Jenis sampel	Waktu
Pasien	NAAT	Saluran nafas bawah - Sputum - Aspirat trakea - <i>Bronchoalveolar lavage</i> - Cairan pleura - Biopsi paru Saluran nafas atas - Swab orofaring/nasofaring - Bilas nasofaring - Aspirat nasofaring - <i>Nasal mid-turbinate (NMT)</i> - Nasal anterior - Saliva  Sumber lain: feses, urine, darah utuh ( <i>whole blood</i> )	- Ambil saat pasien datang - Mungkin diperlukan pengambilan sampel berulang untuk pemantauan lebih lanjut (terutama kasus kritis)
	Serologi	Serum Swab orofaring/nasofaring	Mungkin perlu pemeriksaan ulang bila hasil negatif
Kontak dengan pasien bergejala atau kontak dengan orang tidak bergejala yang memiliki kontak dengan pasien COVID-19	NAAT	Swab orofaring/nasofaring	Dalam masa inkubasi
	Serologi	Serum Swab orofaring/nasofaring	Mungkin perlu pemeriksaan ulang bila hasil negatif



Gambar 5. Pengambilan sampel dengan *swab* nasofaring.<sup>9</sup>

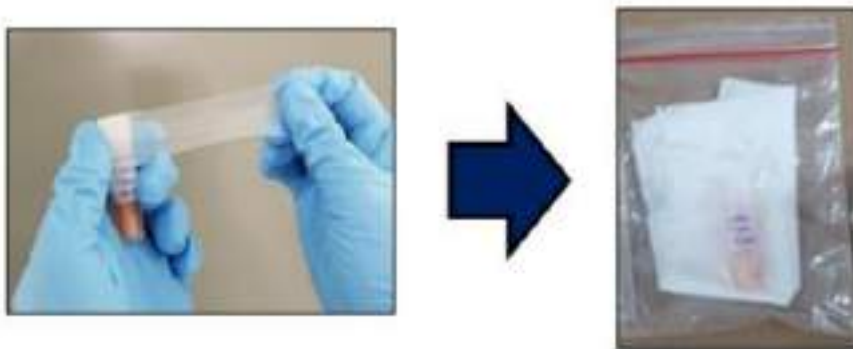
Setiap spesimen, terutama bila akan ditranspor sebelum diperiksa harus memenuhi standar prosedur yang berlaku. Sampel harus disimpan dan dilabel sebagai UN 3373 (substansi biologis, kategori B dan dibungkus sesuai regulasi. Pada sampel dari respirasi, penyimpanan dilakukan pada suhu 2-8°C hingga 72 jam setelah pengambilan, sementara bila melebihi waktu tersebut, sampel disimpan pada suhu  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ . Sampel asam nukleat harus disimpan pada suhu  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ . Standar pengambilan dan penyimpanan sampel ditampilkan pada Tabel 2.<sup>11</sup>

Spesimen yang telah diambil harus diberikan label kode spesimen sesuai dengan kode yang ada di dalam formulir penyelidikan epidemiologi. Sampel yang telah didapatkan kemudian dimasukkan dalam *cryotube* dan dililit parafilm serta dimasukkan ke dalam plastik klip yang tertutup rapat. Bila sampel akan diangkut/ditransportasikan dengan tujuan diagnostik atau investigasi harus dilaksanakan pengepakan lanjutan untuk mencegah kerusakan dan tumpahan spesimen. Pengepakan dilaksanakan menggunakan sistem tiga lapis (*Three Layer Packaging*) sejalan dengan pedoman yang diterapkan oleh WHO dan *International Air Transport Association* (IATA).

Spesimen selanjutnya diperiksa di laboratorium yang telah ditetapkan oleh Kementerian Kesehatan. Gambaran pengemasan sampel pada plastik klip ditampilkan pada Gambar 6.

Tabel 2. Pengambilan dan penyimpanan sampel.<sup>11</sup>

Jenis spesi men	Bahan pengambil	Rekomendasi suhu penyimpanan dan waktu hingga pemeriksaan
<i>Swab</i> nasofaring atau orofaring	<i>Swab</i> <i>flocked</i> Dakron atau poliester dengan <i>viral transport medium</i> (VTM)	2-8 °C jika ≤12 hari -70 °C ( <i>dry ice</i> ) jika > 12 hari
<i>Bronchoalveolar lavage</i>	Kontainer steril dengan VTM	2-8 °C jika ≤2 hari -70 °C ( <i>dry ice</i> ) jika > 2 hari
Aspirat (endo) trakea, bilas nasofaring atau aspirat nasofaring	Kontainer steril dengan VTM	2-8 °C jika ≤2 hari -70 °C ( <i>dry ice</i> ) jika > 2 hari
Sputum	Kontainer steril	2-8 °C jika ≤2 hari -70 °C ( <i>dry ice</i> ) jika > 2 hari
Jaringan dari biopsi atau autopsi	Kontainer steril dengan <i>saline</i> atau VTM	2-8 °C jika ≤24 jam -70 °C ( <i>dry ice</i> ) jika > 24 jam
Serum	Tabung separator serum	2-8 °C jika ≤5 hari -70 °C ( <i>dry ice</i> ) jika > 5 hari
<i>Whole blood</i>	Tabung kolektor	2-8 °C jika ≤5 hari -70 °C ( <i>dry ice</i> ) jika > 5 hari
Feses	Kontainer feses	2-8 °C jika ≤5 hari -70 °C ( <i>dry ice</i> ) jika > 5 hari



Gambar 6. Teknik pengemasan sampel dengan *parafilm* dan plastik klip.<sup>7</sup>

### **Kesimpulan**

Pemeriksaan pada kasus COVID-19 secara umum terdiri atas pemeriksaan antigen, antibodi dan materi genetik SARS CoV-2. Berbagai spesimen dapat dipergunakan dalam pemeriksaan tersebut, dan paling umum berupa sampel dari saluran pernafasan atas (nasofaring dan orofaring). Berbagai aspek mulai dari pengambilan sampel, pengujian sampel hingga pengemasan dan transportasi sampel harus diperhatikan dengan baik karena sampel bersifat infeksius dan dapat menyebabkan risiko kesehatan serta mempengaruhi hasil pemeriksaan bila tidak dengan sesuai standar.

### **Daftar Pustaka**

1. World Health Organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection: interim guidance, 6 October 2021 [Internet]. World Health Organization; 2021 [cited 2021 Dec 4]. p. 1–20. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>.
2. Bruemmer LE, Katzenschlager S, Gaeddert M, Erdmann C, Schmitz S, Bota M, et al. The accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: a living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2021;18(10):e1003825.

3. Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Dan Kedokteran Laboratorium Indonesia. Panduan tata laksana pemeriksaan antigen. 319/PP-PATKLIN/XII/2020 Indonesia; 2020.
4. Falzone L, Gattuso G, Tsatsakis A, Spandidos DA, Libra M. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection. *Int J Mol Med*. 2021;47(6):1–23.
5. Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium Indonesia. Revisi Panduan Tatalaksana Pemeriksaan Antibodi SARS-CoV-2. 123/PP-PATKLIN/V/2021 Indonesia; 2021.
6. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater*. 2021;20(5):593–605.
7. Sugihantono A, Burhan E, Samuedro E, Aryati, Rinawati W, Sitompul PA, et al. Pedoman Pencegahan dan Pengendalian Coronavirus Disese. Revisi 5. Aziza L, Aqmarina A, Ihsan M, editors. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2020.
8. Zayed RA, Omran D, Zayed AA. COVID-19 clinical and laboratory diagnosis overview. *J Egypt Public Health Assoc*. 2021;96(1):1–5.
9. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD) D of VD. Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing [Internet]. 2021. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.
10. Adisasmito W, Wibowo B, Taher A, Djoerban Z, Rasmin M, Soebandrio A, et al. Standar APD (Alat Pelindung Diri) untuk Penanganan COVID-19 di Indonesia. Revisi 3, Santoso B, Rachmayanti S, Kiasatina T, Laksmi IAKRP, Nuraini R, Sutan AT, editors. Jakarta: Gugus Tugas Percepatan Penanganan COVID-19; 2020.
11. World Health Organization. Diagnostic testing for SARS-CoV-2: interim guidance, 11 September 2020 [Internet]. World Health Organization; 2020. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334254/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-por.pdf>.
12. Organization WH. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020 [Internet]. World Health Organization; 2020. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331501/WHOCOVID-19-laboratory-2020.5eng.pdf?sequence=1>.

## BAB VI



## **NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETS) DAN KAITANNYA DENGAN COVID-19**

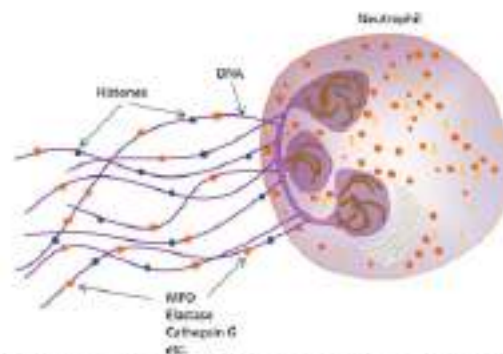
*Neutrophil extracellular traps* (NETs) merupakan suatu struktur ekstraseluler yang kompleks dan tersusun dari kromatin serta protein spesifik dari granul neutrofil yang menempel, terutama bermanfaat dalam proses pengikatan dan penghancuran mikroorganisme sehingga menurunkan risiko penyebaran infeksi.<sup>1</sup> Berbagai mikroba seperti bakteri, jamur, dan virus rentan terhadap aktivitas NETs dalam banyak kasus, melalui proses penangkapan, penghancuran, atau penghambatan pertumbuhan.<sup>2</sup>

### **Struktur dan sintesis NETs**

Senyawa ini dihasilkan oleh aktivitas neutrofil, fraksi dominan leukosit di sirkulasi perifer dan bekerja sebagai pasukan pertama yang menghadapi gangguan akibat infeksi pada berbagai jaringan.<sup>3</sup> Produk neutrofil tersebut, seperti telah disampaikan sebelumnya terlibat pada berbagai mekanisme patologis penyakit, dari inflamasi hingga thrombosis. Jenis penyakit yang diperantarai pun beragam, baik kasus infeksi (virus, bakteri, parasit, jamur) maupun non infeksi (penyakit autoimun dan autoinflamasi, preeklampsia, diabetes mellitus, penyakit granulomatosa kronik, thrombosis vena dalam, cedera traumatik, maupun kanker).<sup>4-6</sup> Pada dasarnya, NETs harus diproduksi di lokasi dan waktu yang tepat agar dapat mencapai target yang diinginkan, dan sebaliknya, gangguan produksi atau klirens dapat menimbulkan dampak negatif bagi tubuh (terkait inflamasi sistemik dan independen terhadap sel T).<sup>4,7</sup>



Struktur NETs (Gambar 1) terdiri dari komponen nuklear (filamen fibrosa DNA berdiameter 15-17 nm, histon (dari h1, h2a, h2b, h3, dan h4)) dan granular neutrofil. Selain itu juga terdapat domain protein globular berukuran 25 nm yang dapat beragregasi hingga berukuran 50 nm.<sup>8</sup> Komponen granular merupakan peptida dan enzim (terutama neutrofil elastase/NE dan myeloperoksidase/MPO) yang tersimpan dalam granula neutrofilik. Sementara itu, komponen nuklear terdiri atas kromatin dan histon. Komponen nuklear yang terkait DNA ini menjadi aspek struktural yang penting sebagai lokasi efektor protein (sejalan dengan pemberian DNase yang dapat menyebabkan disintegrasi NETs). Histon H3 tersitruinasi (*Citrullinated histone H3; H3cit*) adalah salah satu komponen utama yang terlibat dalam pembentukan NETs melalui kondensasi kromatin. Sitruinasi histon H3 oleh *Peptidylarginine Deaminase 4 (PAD4)* terjadi melalui decondensasi kromatin selama pembentukannya, yang disebut dengan NETosis.<sup>9</sup>



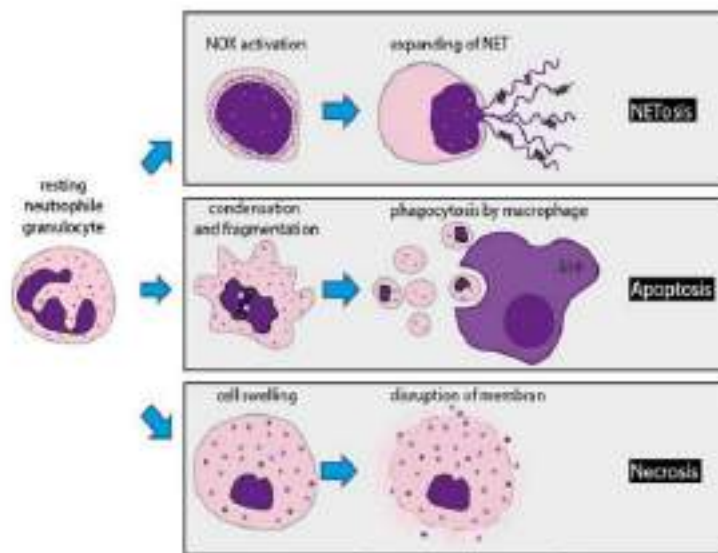
Gambar 1. Struktur *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs).<sup>10</sup>

Seperti ulasan sebelumnya, komponen yang terdapat dalam NETs sangat beragam. Ringkasan protein terkait NETs tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Ringkasan protein terkait NETs, lokasi dan fungsinya.<sup>11</sup>

Protein	Lokasi	Fungsi
Histon	Nukleus	Bakterisidal
Mieloperoksidase	Granul primer	Dekondensasi kromatin
Neutrofil elastase	Granul primer	Degradasi histon H1, dan modifikasi histon lain
Peptidilarginin deaminase 4		Situlinasi histon
Cathepsin G	Granul primer	Antimikroba dan stimulasi koagulasi
Proteinase 3	Granul primer	Antimikroba
<i>α-defensins</i>	Granul primer	Antimikroba
Bakterisidal	Granul primer	Bakterisidal
Laktoferin	Granul sekunder	Antimikroba dan antiinflamasi
<i>Pentraxin 3</i>	Granul sekunder	Antimikroba dan kontrol autoimun
LL-37	Granul sekunder	Antimikroba
Calprotectin	Sitoplasma	Antimikroba dan menginisiasi pengeluaran sel inflamasi
<i>Catalase</i>	Peroksisom	Katalisasi dekomposisi hidrogen peroksida

Sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya, neutrofil memainkan peranan penting dalam respon inflamasi yang melibatkan berbagai jenis kematian sel neutrofil, termasuk apoptosis, nekrosis, autofagi, dan NETosis (Gambar 2). Berbagai metode kematian sel neutrofil tersebut memiliki karakteristik masing-masing.

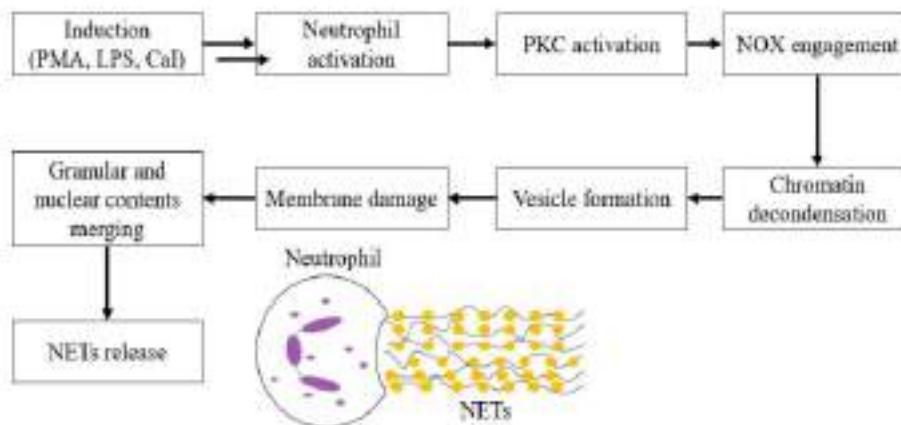


**Gambar 2.** Mekanisme kematian seluler neutrofil sebagai respon terhadap patogen, yaitu NETosis, apoptosis dan nekrosis.<sup>12</sup>

NETosis adalah jenis kematian sel spesifik yang unik, dan mekanismenya masih belum jelas.<sup>1</sup> Peristiwa ini dapat dirangsang oleh sejumlah stimulus yang beragam, meliputi mikroba, peradangan, dan faktor endogen. Pengikatan *Toll-like receptor* (TLR), reseptor Fc, dan reseptor komplemen yang disebabkan oleh pensinyalan neutrofil pada akhirnya dapat mendorong produksi NET, yang melibatkan pelepasan berbagai bentuk sitokin seperti interleukin-8 (IL-8), *tumor necrosis factor* (TNF), dan interferon- $\gamma$  (If $\gamma$ ).<sup>13</sup> Neeli, dkk. menunjukkan bahwa komponen integrin-1 dapat menyebabkan inisiasi perubahan sitoskeleton neutrophil yang memfasilitasi pemecahan membran nukleus dan plasma dalam proses pelepasan NETs.<sup>14</sup>

Pembentukan NETs dimulai dari aktivasi neutrofil yang menyebabkan aktivasi protein kinase C (PKC) sebagai penginduksi NADPH oksidase (NOX). Keadaan ini mengakibatkan hilangnya

organisasi nukleus dan ditandai dengan dekondensasi kromatin. Bentuk nukleus akan hilang dan terlihat gap antara membran nukleus bagian dalam dan luar. Hal ini akan memperantarai pembentukan vesikel pada membran nukleus dan mencetuskan kerusakan membran. Pada saat bersamaan, hal yang serupa terjadi pada membran granular di sitoplasma yang akan memfasilitasi penggabungan isi granular dengan kromatin yang masuk ke sitoplasma melalui membran nukleus yang rusak. Komponen tersebut selanjutnya akan dilepas ke medium ekstraselular ketika terjadi desintegrasi membran ekstraselular.<sup>15,16</sup> Histon H3 tersitruinasi (*Citrullinated histone H3*; H3cit) adalah salah satu komponen utama yang terlibat dalam pembentukan NETs melalui dekondensasi kromatin. Sitruinasi histon H3 oleh *Peptidylarginine Deaminase 4* (PAD4) terjadi melalui dekondensasi kromatin selama pembentukannya, NETosis.<sup>9</sup> Skema NETosis dapat dilihat pada Gambar 3.

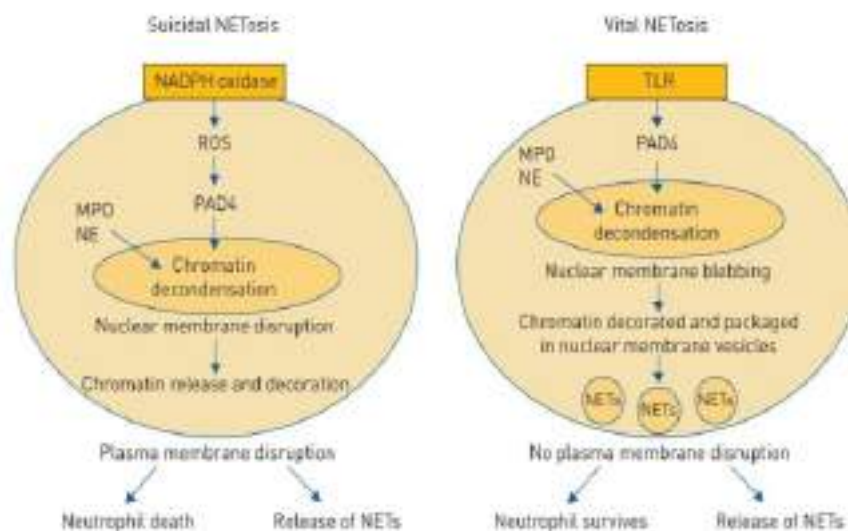


Gambar 3. Skema proses pembentukan NETs (NETosis).<sup>17</sup>

NETs disintesis dalam dua cara: (1) kematian sel terprogram (*suicidal* NETosis), maupun (2) *vital* NETosis, baik yang bergantung



pada *Reactive Oxygen Species (ROS)* (*ROS-dependent vital NETosis*) ataupun yang tidak bergantung pada ROS (*ROS-independent vital NETosis*) (Tabel 2). NETosis dimulai dengan aktivasi neutrofil dan diikuti oleh dekondensasi kromatin.<sup>15,18,19</sup> Produksi vesikel pada membran inti (menyebabkan kerusakan membran) dan disintegrasi membran granular sitoplasma (memungkinkan isi granular dan kromatin menyatu) terjadi secara bersamaan.<sup>19</sup> Setelah itu, unsur-unsur tersebut akan dikeluarkan ke lingkungan ekstraseluler.<sup>15,16</sup> Hal ini timbul sebagai akibat rangsangan langsung oleh mikroorganisme patogen maupun secara tidak langsung yang diperantarai oleh produk mediator tertentu seperti *phorbol myristate acetate (PMA)*, *macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)* maupun *platelet activating factor (PAF)*.<sup>20</sup> Ringkasan mekanisme NETosis ditampilkan pada gambar berikut (Gambar 4).



Gambar 4. Mekanisme NETosis, secara klasik (*suicidal*) maupun vital. Pada kasus klasik akan terjadi kematian sel neutrofil karena adanya

kerusakan membran plasma, sementara pada kondisi NETosis vital, neutrofil tetap dipertahankan.<sup>21</sup>

Tabel 2. Karakteristik Tipe NETosis<sup>2</sup>

Tipe NETosis	<i>Suicidal</i>	<i>Vital</i>	
		<i>ROS-independent</i>	<i>ROS-dependent</i>
Durasi	120-240 menit	5-60 menit	
Sumber DNA	Nukleus	Nukleus	Mitokondria
<i>ROS-dependent</i>	Ya	Tidak	Ya
Ruptur membran plasma	Ya	Tidak	Tidak
Ruptur membran inti	Ya	Ya	Ya

\*ROS: *reactive oxygen species*.

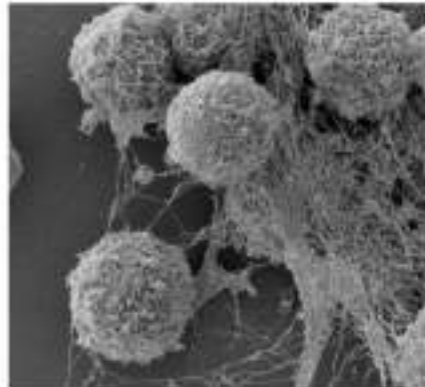
### Pemeriksaan NETs

Proses NETosis pada dasarnya dapat diamati secara langsung maupun tidak langsung. Deteksinya dapat bermanfaat dalam pengenalan dan penentuan prognosis berbagai penyakit. Metode yang dapat mengenali NETs secara langsung adalah:

- a. Mikroskopis. Pemeriksaan pencitraan NETs dapat menggunakan mikroskop elektron berfluoresensi, *transmission electron microscope* (TEM) dan *scanning electron microscope* (SEM). Pada metode ini, neutrofil ditempatkan pada pelat kaca dalam suatu ruang, diinkubasi dengan atau tanpa stimulasi selama beberapa jam, difiksasi, dan kemudian dilakukan *immunostaining*. SEM menggunakan berkas elektron terfokus untuk mendapatkan gambar dengan resolusi tinggi dan perbesaran besar dibentuk oleh elektron terdispersi sekunder yang dipancarkan dari permukaan sampel (Gambar 5). Teknik pencitraan memiliki beberapa keterbatasan, meliputi sifatnya yang tergantung pemeriksa dan memerlukan waktu lama. Sementara itu, mengenai SEM, kelebihan yang



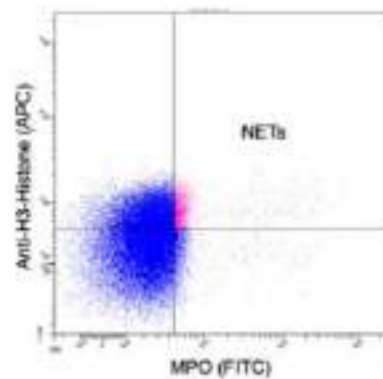
dimiliki adalah dapat membedakan NETosis dan nekrosis, sementara terkait kekurangannya, NETs dapat sulit dibedakan dengan benang fibrin.<sup>22,23</sup>



Gambar 5. Gambaran *scanning electron microscopy* sel neutrofil yang menjalani proses NETosis.<sup>24</sup>

- b. Spektroskopi fluoresens. Metode spektrofotometri sering digunakan untuk mengukur NETs dan didasarkan pada fakta bahwa DNA adalah tulang punggung utama NETs. Teknik ini dapat memanfaatkan pewarna SYTOX dan PICOGreen (Invitrogen). Namun demikian, konfirmasi mikroskopis dari hasil diperlukan untuk mengeksklusi pelepasan nekrotik DNA seluler dan dengan demikian mengkonfirmasi spesifisitas pengujian.<sup>23</sup>
- c. *Flow-cytometry*. Pengukuran menggunakan *flow cytometry* (Gambar 6) memungkinkan pengukuran cepat cahaya yang tersebar atau sinyal fluoresensi yang dipancarkan dengan tepat oleh sel yang terkena radiasi. Manfaat utamanya adalah sifat terotomatisasi, sementara kekurangannya dikaitkan dengan ketidakmampuan

untuk mendeteksi kejadian yang tidak bergantung pada H3cit dan hanya dapat mendeteksi sel yang sedang menjalani NETosis.<sup>25</sup>



Gambar 6. Temuan pemeriksaan *flow cytometry* yang menggunakan marka pengganti NETs, yaitu MPO dan sel yang memiliki hasil positif *anti-H3-Histone*.<sup>26</sup>

- d. *Real-time imaging*. Pemeriksaan terotomatisasi secara real-time telah dikembangkan untuk menghitung persentase sel neutrofil yang menjalani NETosis dengan modalitas pencitraan *ZOOM IncuCyte* yang menggunakan sifat-sifat membran sel terkait dengan permeabilitas pewarna DNA (*Sytox Green* dan *NUCLEAR-ID*). Teknik ini hanya menghitung neutrofil yang menjalani NETosis, tidak termasuk DNA ekstraseluler.<sup>27</sup>
- e. Metode *in vivo* dan *in situ*. Banyak ilmuwan telah menemukan metode baru untuk melaksanakan visualisasi NETs, dan beberapa kelompok penelitian telah menggunakan mikroskop intravital dalam upaya melakukan pencitraan NETosis secara *in-vivo*, berdasarkan komponen DNA. Mayoritas eksperimen secara *in-vivo* dan *in-situ* mendeteksi lebih sedikit struktur NETs dibandingkan dengan hasil dari teknik *in vitro*.<sup>22</sup>

Selain metode deteksi secara langsung yang umumnya mendeteksi sel yang menjalani NETosis, metode tidak langsung juga dikembangkan dalam pemeriksaan NETs. Salah satu metode tidak langsung adalah menggunakan *immunostaining* berbasis *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).<sup>22</sup> Beberapa penelitian telah menunjukkan peningkatan penanda NETs, dan peningkatan kadar kompleks MPO-DNA dalam serum pasien, seperti pada kasus diabetes mellitus tipe 2 terkontrol serta vaskulitis terkait *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies* (ANCA).<sup>23</sup> Pada Tabel 3 ditampilkan perbandingan berbagai penanda NETosis.

Tabel 3. Perbandingan penanda NETosis dan metode deteksi NETosis.<sup>28</sup>

Penanda/ Metode	Spesifitas	Objektivitas dan kuantitatifitas	Kelebihan	Kekurangan/ Perhatian
Ko-lokalisasi protein yang dihasilkan neutrofil dan DNA ekstraseluler	<i>Precaution needed</i>	Rendah	Mudah dilaksanakan	Pembentukan NETs artifisial dapat terjadi
Histon tersitruinasi (nukleosom)	<i>Precaution needed</i>	Rendah	Mudah dilaksanakan	Hanya mendeteksi NETosis dependen-PAD4
Cell-free DNA	<i>Precaution needed</i>	Tinggi	Alat tersedia	Dapat mendeteksi DNA dari sel mati lainnya
Kompleks MPO-DNA	Tinggi	Tinggi	Spesifik dan objektif	Perlu standardisasi
<i>Image-based flow cytometry</i>	Tinggi	Tinggi	Spesifik dan objektif	Perlu data prevalensi
Deteksi <i>flow cytometry</i> komponen tambahan NETs	<i>Potentially high</i>	Tinggi	Spesifik dan objektif	Perlu studi lanjutan

### **NETs dan *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19)**

Pada dasarnya, molekul NETs dan peranannya dalam sistem imun bersifat menyerupai pedang bermata dua, dan sangat tergantung pada kadarnya (mekanisme kontrol) serta kondisi patologis yang terjadi. NETs memiliki peranan yang sangat penting sebagai suatu komponen dalam respon imun non-spesifik. Selain secara non-spesifik, NETs dapat berperan dalam sistem imun adaptif melalui proses stimulasi terhadap sel T CD4<sup>+</sup>.<sup>29</sup> Namun, di sisi lain, pada kondisi tidak terkontrol, NETs dapat menyebabkan kerusakan jaringan, menginisiasi produksi sel inflamasi, dan berkontribusi terhadap proses patologis seperti *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), jejas paru akut, trombosis, penyakit autoimun, sklerosis multipel, maupun kanker.<sup>13,30</sup> Secara umum, terdapat tiga paradigma proses patologis yang dikaitkan dengan NETs, yaitu:<sup>31</sup>

- a. Pembentukan NETs secara berlebihan pada kondisi patologi berat merupakan indikasi adanya proses inflamasi dan kerusakan jaringan yang dimediasi oleh inflamasi.
- b. Sejumlah NETs yang tidak didegradasi oleh DNase dalam darah dapat menyumbat kapiler, menyebabkan proses trombosis, mengganggu mikrosirkulasi, merusak jaringan secara enzimatik dan meningkatkan proses inflamasi.
- c. DNase ekstraselular dapat mendegradasi NETs yang diakumulasi berlebihan di jaringan atau kapiler sehingga melepaskan molekul efektor NETs yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan berat.

Badai sitokin merupakan fenomena yang ditandai dengan respon imun hiperaktif yang ditandai dengan pelepasan interleukin,

interferon, TNF, kemokin, dan beberapa mediator lainnya. Badai sitokin terjadi ketika kadar sitokin yang dilepaskan (pro-inflamasi dan inflamasi) mencapai tingkat kritis yang berbahaya bagi sel pejamu.<sup>32,33</sup> Dalam kasus Sindrom Pelepasan Sitokin (*Cytokine Release Syndrome*; CRS) berat, sekresi beberapa sitokin dapat menghasilkan jejas paru-paru akut, sindrom gangguan pernapasan akut (*acute respiratory distress syndrome*; ARDS), sepsis, kardiomiopati, dan koagulasi intravaskular diseminata (*disseminated intravascular coagulation*; DIC).<sup>34,35</sup> Beberapa bukti klinis telah dikembangkan untuk melindungi pasien dari berbagai komplikasi terkait kasus COVID-19 kritis, termasuk pemberian glukokortikoid, imunosupresan, penghambat interleukin (terutama IL-1 dan IL-6), imunoglobulin intravena (IVIG), dan penukar plasma.<sup>36</sup>

Pada pasien COVID-19, neutrofilia lazim dijumpai pada kasus yang parah, dan dapat menunjukkan pola peningkatan progresif, terutama pada pasien yang akhirnya meninggal.<sup>37</sup> Analisis transkriptom menunjukkan hubungan antara aktivasi neutrofil dan 16 gen terkait NETs (berupa enzim metabolik, protein struktural, peptida terkait anti-mikroba, maupun peptida peroksisomal). Semua komponen ini berinteraksi dengan sel T/*natural killer* (NK)/sel B dan terkait dengan imunitas bawaan (melalui pensinyalan jalur interferon/IFN). Namun demikian, efek yang ditimbulkan cenderung bersifat kurang menguntungkan. Hal ini didasari kaitannya dengan regulasi negatif fungsi kekebalan sel T dan sel NK melalui *locus for the transcript soluble galactoside-binding lectin 9/LGALS9* dan *Carcinoembryonic antigen-related Cell Adhesion Molecule 1/CEACAM1* yang menghasilkan penurunan efektivitas kekebalan

antivirus dan jejas paru secara langsung (karena toksisitas pada sawar alveoli-kapiler).<sup>38</sup>

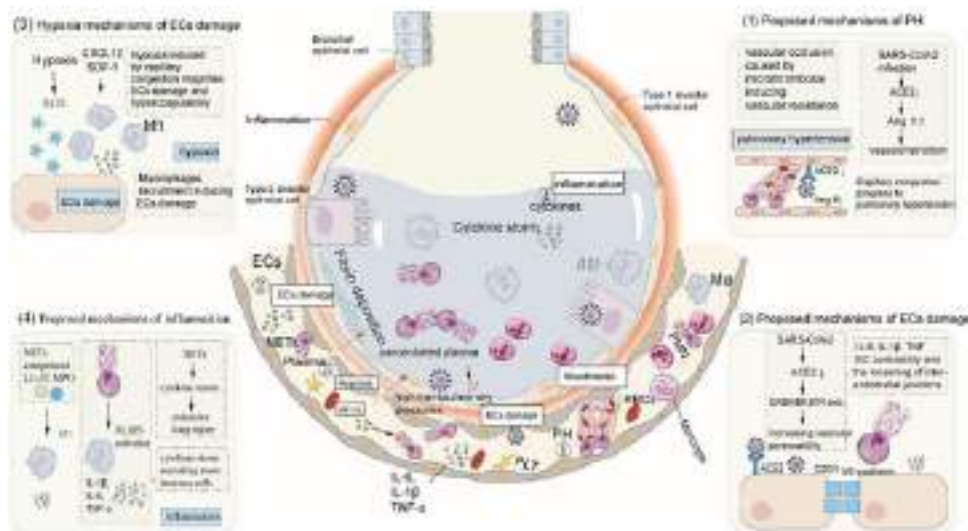
Kerusakan yang ditimbulkan oleh NETs juga dikaitkan dengan adanya beberapa komponen seperti NE, MPO, dan protein histon yang menimbulkan efek sitotoksik langsung pada epitel alveolar dan mengganggu integritas sel endotel. Peran mirip *damage-associated molecular patterns* (DAMP) dari komponen-komponen ini juga mampu menginduksi respons trombotik dan inflamasi pada berbagai infeksi akut, termasuk COVID-19.<sup>39</sup> Proses keseluruhan NETs yang diinduksi SARS-CoV-2 memerlukan *Angiotensin Converting Enzyme-2/ACE2* (melalui reseptor *ACE2-Transmembrane Serine Protease 2; TMPRSS2*) dan protease serin.<sup>40</sup> Setidaknya terdapat empat hipotesis yang dikembangkan, yaitu:

- a. Hipotesis mekanisme hipertensi pulmonal. Hal ini didasari adanya kongesti kapiler dan peningkatan signifikan resistensi vaskular pulmonal selain adanya *down-regulation* ekspresi ACE2.<sup>41</sup>
- b. Hipotesis mekanisme kerusakan sel endotel. Proses ini terjadi karena efek sitopatik SARS-CoV-2 secara langsung dan tidak langsung (melalui *downregulation* ACE2 yang mengaktifasi aksis *des-Arg9 bradykinin/bradykinin receptor B1* (DABK/BKB1R) dan menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskular. Hal ini diperparah dengan adanya peningkatan kadar sitokin seperti IL-6 dan IL-1 $\beta$  dan penurunan ekspresi CD31 dan *VE-cadherin*).<sup>41</sup>
- c. Mekanisme hipoksia kerusakan sel endotel. Proses tersebut disebabkan kongesti kapiler dan hiperkoagulasi ditambah produksi ROS dan aktivasi *Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ).<sup>41</sup>



d. Hipotesis mekanisme inflamasi. NETs berperan untuk meningkatkan produksi sitokin dan rekrutmen sel imun ke dalam paru-paru yang menyebabkan kondisi hiperinflamasi dan kerusakan alveolus difus.<sup>41</sup>

Keempat hipotesis tersebut menggambarkan kerusakan yang ditimbulkan oleh interaksi antara virus SARS-CoV-2 dan komponen NETs. Ilustrasi mekanisme kerusakan (berupa komplikasi ARDS) yang diperantarai oleh fenomena tersebut ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Mekanisme pelepasan NETs dan perannya dalam proses *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) yang diperantarai paparan terhadap infeksi SARS-CoV-2.<sup>41</sup>

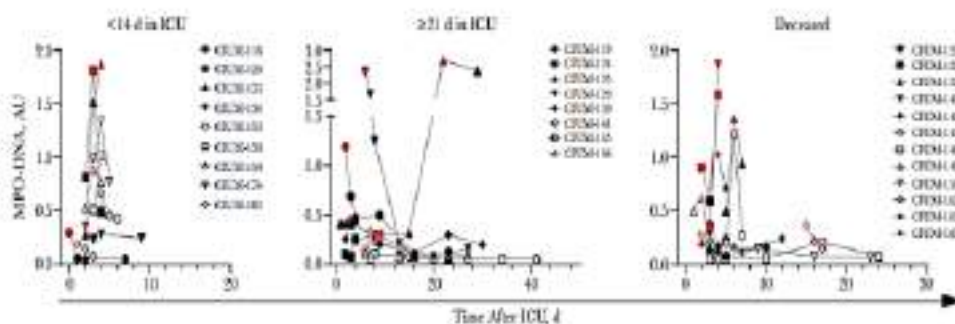
Biomarker terkait NETs, kompleks histon DNA (his-DNA), dan kompleks MPO-DNA spesifik NETs ditemukan meningkat secara signifikan pada sampel plasma populasi pasien COVID-19 dalam kondisi sakit kritis. Pada pemeriksaan sampel dahak pasien COVID-

19 secara berpasangan (sampel diambil bersamaan dengan plasma dari tiap pasien), kadar MPO-DNA berkorelasi signifikan dengan *viral load* RNA. Penanda inflamasi (seperti *C-reactive protein* (CRP) dan IL-6) juga dikaitkan dengan temuan di atas, selain peningkatan leukosit dan hitung neutrofil absolut.<sup>42-44</sup> Peningkatan kadar NETs juga diamati pada aspirasi trakea pasien COVID-19 yang menjalani ventilasi mekanik.<sup>40</sup>

NETs dalam tingkat yang lebih tinggi secara umum juga dikaitkan dengan meningkatnya keparahan penyakit secara keseluruhan dan jejas jaringan paru-paru. Pada pemeriksaan *Computed Tomography* (CT) dada, konsolidasi multipel dengan *air bronchogram* di semua bidang paru, dengan distribusi perifer dan peribronchovascular (terutama terlihat di lobus bawah), disertai dengan *ground-glass opacity*, dan sesuai dengan cedera alveolar difus dapat diidentifikasi, terutama pada pasien yang mengalami peningkatan kadar penanda NETs.<sup>40</sup> Sementara itu, berdasarkan proses otopsi paru-paru pasien COVID-19 kritis juga ditemukan peningkatan neutrofil MPO+H3Cit+ dan filamen NETs yang terutama terdistribusi di lingkungan saluran napas, interstisial, dan vaskular.<sup>42,45</sup> COVID-19 memiliki dampak bermakna terhadap perubahan alveolar dan epitel saluran napas kecil yang terkait efek sitopatik virus dan metaplasia skuamosa, infiltrasi limfosit, edema endotel, dan trombus fibrin kecil di arteriol paru, sebagaimana ditemukan berdasarkan analisis histopatologi.<sup>40</sup> Secara mekanisme, dapat disimpulkan bahwa selama ARDS yang diinduksi oleh SARS-CoV-2, neutrofil menyerang virus dan melakukan NETosis di paru-paru.<sup>42</sup> Diyakini bahwa penanda pembentukan NETs (sitrulinasi histon H3, cfDNA, dan NE)

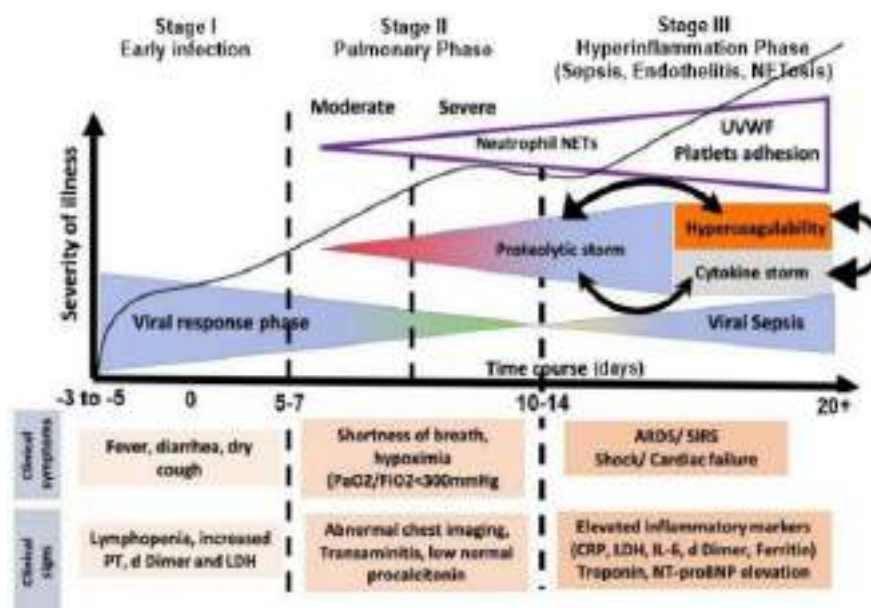
dapat digunakan untuk menilai kebutuhan bantuan pernapasan dan kematian jangka pendek pada pasien COVID-19.<sup>43</sup>

Studi menunjukkan kadar NETs (yang dinilai dengan biomarka pengganti seperti cfDNA, NE, Histon H3, *growth arrest specific protein 6* (GAS6) dan *soluble AXL receptor tyrosine kinase* (sAXL)) didapatkan lebih tinggi secara signifikan pada pasien COVID-19 yang dirawat di unit rawat intensif (*Intensive Care Unit*; ICU) jika dibandingkan pasien ICU non-COVID-19 maupun kontrol sehat.<sup>46</sup> Hal serupa juga dijumpai pada pemeriksaan menggunakan penanda kompleks MPO-DNA (Gambar 8).<sup>42</sup> Nukleosom (ditandai dengan histon H3.1 serta H3R8 tersitruilnasi) sebagai salah satu marka potensial terkait pembentukan NETs di plasma juga ditemukan meningkat pada pasien COVID-19 dibandingkan dengan kontrol maupun pasien non-COVID-19 yang dirawat di rumah sakit.<sup>47,48</sup> Kadarnya pun makin meningkat sejalan dengan keparahan penyakit (dicerminkan dengan status ruang rawat), yaitu pada pasien yang dirawat di ICU memiliki kadar nukleosom tertinggi dibandingkan pasien di ruang rawat biasa maupun rawat jalan.<sup>48</sup>



Gambar 8. Kadar kompleks MPO-DNA pada pasien COVID-19 yang menjalani perawatan di ICU selama <14 hari, ≥21 hari dan meninggal. Pada semua kondisi, ditemukan bahwa kadar NETs (digambarkan dengan MPO-DNA) tertinggi umumnya ditemukan pada tahap akut (<10 hari).<sup>42</sup>

Studi kohort menunjukkan bahwa kadar NETs pada plasma mencapai puncak pada awal pasien masuk ke ICU. Kadar NETs akan turun perlahan sebelum keluar dari ICU atau meninggal dunia. NETs juga menunjukkan korelasi negatif dengan waktu rawat di rumah sakit, memperkuat temuan akumulasi NETs pada awal awitan penyakit.<sup>42</sup> Data menunjukkan bahwa rerata pasien menunjukkan jarak *onset* ke waktu mulai perawatan di ICU adalah selama 9,5 hari (rentang: 7-12,5 hari) yang sesuai dengan fase pulmonal pada perkembangan penyakit COVID-19.<sup>49</sup> Gambaran perkembangan penyakit dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Perjalanan kasus COVID-19 dan fenomena yang ditemui. NETs ditengarai terlibat pada fase pulmonal dan meningkat seiring keparahan penyakit.<sup>50-52</sup> (dengan modifikasi seperlunya)

Peningkatan penanda NETs ini sejalan dengan adanya perubahan fenotip neutrofil teraktivasi pada fase akut penyakit



COVID-19 yang rentan terhadap agregasi seluler.<sup>53</sup> Kadar NETs pun bertahan dalam tingkat yang tinggi dan tetap bertahan pasca kematian. Molekul MPO<sup>+</sup>H3Cit<sup>+</sup> dapat terdeteksi pada hasil otopsi pasien yang meninggal karena kondisi ARDS menggunakan teknik imunohistokimia. Temuan ini juga bersamaan dengan tingginya kadar platelet CD61<sup>+</sup> dan neutrofil itu sendiri.<sup>42</sup> Analisis interaksi turut menunjukkan bahwa NETs memiliki keterkaitan dengan setidaknya tujuh gen protein fase akut (IL6, TNF, CRP, CXCL8, IL-1 $\beta$ , IL17A dan IL-1) yang dapat berkaitan erat dengan komplikasi jangka pendek berupa ARDS.<sup>51</sup> Pasien dengan kondisi COVID-19 berat juga menunjukkan peningkatan sel *low-density inflammatory band* (LDIB) yang memperantarai pembentukan NETs spontan dan produksi sitokin yang diperantarai LPS, pada akhirnya meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 dan TNF- $\alpha$  secara signifikan.<sup>54</sup> NETs juga terkait dengan sistem komplemen (C3 dan C5), dimana inhibisi komplemen dapat menurunkan kadar NETs. Komplemen merupakan salah satu faktor utama yang mendorong hiperinflamasi, imunotrombosis, dan jejas endotel mikrovaskular pada kasus COVID-19 berat.<sup>55</sup>

Trombosis (dikenal juga dengan imunotrombosis) adalah peristiwa berbahaya yang memperburuk prognosis pasien COVID-19 secara signifikan.<sup>56</sup> Beberapa kondisi terkait trombotik yang diamati pada pasien COVID-19 adalah emboli paru, stroke iskemik, trombosis vena serebral, iskemia ekstremitas bawah, trombosis aorta, dan trombosis vena dalam.<sup>57,58</sup> Pada pasien yang mengalami kejadian trombotik, peningkatan *calprotectin* (penanda aktivasi neutrofil) serta penanda NETs (cfDNA, kompleks MPO-DNA, dan H3cit) dapat

diamati. Peningkatan biomarker klinis fenomena trombotik, D-dimer, CRP, feritin, dan antigen VWF juga lebih tinggi pada kelompok trombosis.<sup>57,59</sup> Oklusi vaskular oleh NETs pada kasus COVID-19 diperkuat oleh agregasi neutrofil yang meningkatkan kepadatan NETs dan struktur tubular yang tersumbat,<sup>60</sup> sebagaimana dibuktikan dengan bekuan intra-vaskular yang kaya neutrofil teragregasi yang mengekspresikan NE dan H3cit, selain juga molekul CD31. Temuan ini tidak hanya terbatas pada paru-paru, tetapi juga dapat diamati pada jaringan ginjal dan hati dari pasien COVID-19, yang berpotensi menyebabkan kegagalan multi organ.<sup>53</sup> Dalam sebuah penelitian yang melibatkan pasien COVID-19 yang mengalami infark miokard dengan elevasi segmen ST (*ST segment elevation myocardial infarction*; STEMI), trombus sebagian besar terdiri dari fibrin dengan derajat infiltrasi sel polimorfonuklear bervariasi dengan kepadatan NETs sekitar 61%.<sup>61</sup>

NETs dapat mempengaruhi aksis TF/trombin pada pasien COVID-19 sebagai salah satu mekanisme trombotik yang diperkirakan terjadi. Hal ini didasari korelasi positif antara aktivitas TAT dan kompleks MPO-DNA. Inhibisi trombin melalui dabigatran dapat bermanfaat untuk memitigasi ekspresi dan aktivitas TF, selain pelepasan NETs pada pasien COVID-19. Peningkatan bermakna *soluble platelet-derived factors* yang memicu proses NETosis, seperti *Platelet factor 4* (PF4) dan RANTES, telah ditemukan pada pasien COVID-19. Temuan tersebut menunjukkan adanya interaksi NETs dan platelet yang dapat berkontribusi terhadap fenomena trombo-inflamasi yang menimbulkan hiperkoagulabilitas dan trombosis terkait



COVID-19, selain peran adanya tambahan yang diperantarai oleh aktivasi komplemen.<sup>59,62</sup>

Pencegahan komplikasi COVID-19 (terutama ARDS and mikrotrombosis) dengan penargetan NETosis dapat menjadi suatu fokus perhatian. Beberapa obat yang menargetkan NETosis telah beredar maupun dalam sedang menjalani proses pengembangan dan penelitian.<sup>63</sup> Dua target utama yang diterapkan dalam upaya pengobatan tersebut adalah DNase I (penargetan efek fisik NET) dan NE (aktivitas proteolitik).<sup>64</sup> Penargetan DNase sebelumnya telah terbukti efektif dalam pengobatan fibrosis kistik,<sup>47</sup> serta berpotensi bermanfaat pada peningkatan fungsi paru-paru dan penekanan proses inflamasi setelah infeksi SARS-CoV-2. Sementara itu, penargetan NE (menggunakan obat yang menargetkan elastase seperti Sivelesat, Alvelestat, atau Bay-8550) dapat meningkatkan luaran pasien, mengurangi masuknya SARS-CoV-2 ke dalam sel-sel di saluran pernafasan, dan mengurangi fibrinolisis atau hipertensi terkait NE.<sup>65</sup>

### **Kesimpulan**

NETs merupakan suatu molekul yang turut berperan dalam sistem imunitas untuk menghadapi berbagai proses patologis. Namun demikian, dalam kasus infeksi SARS-CoV-2, NETs cenderung memberikan dampak buruk bagi penderita dengan meningkatkan risiko kematian, perawatan di ruang rawat intensif, maupun penggunaan ventilasi mekanik. Penggunaan NETs sebagai target terapi potensial dapat berpotensi digunakan untuk memperbaiki luaran pasien.

## Daftar Pustaka

1. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231–41.
2. Lu T, Kobayashi SD, Quinn MT, DeLeo FR. A NET Outcome. *Front Immunol.* 2012;3:365.
3. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2014;9:181–218.
4. Hasler P, Giaglis S, Hahn S. Neutrophil extracellular traps in health and disease. *Swiss Med Wkly.* 2016;146(4142).
5. Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - Formation and implications. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(3):277–84.
6. Liu F-C, Chuang Y-H, Tsai Y-F, Yu H-P. Role of neutrophil extracellular traps following injury. *Shock.* 2014;41(6):491–8.
7. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J Innate Immun.* 2018;10(5–6):414–21.
8. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (80- ).* 2004;303(5663):1532–5.
9. Hamaguchi S, Hirose T, Matsumoto N, Akeda Y, Irisawa T, Seki M, et al. Neutrophil extracellular traps in bronchial aspirates: a quantitative analysis. *Eur Respir J.* 2014;43(6):1709–18.
10. Wang Y, Liu Y. Neutrophil-Induced Liver Injury and Interactions Between Neutrophils and Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Inflammation.* 2021;44(4):1246–62.
11. Lauková L, Konečná B. NETosis – Dr. Jekyll and Mr. Hyde in inflammation. *J Appl Biomed.* 2018;16(1):1–9.
12. Leben R, Ostendorf L, Van Koppen S, Rakhymzhan A, Hauser AE, Radbruch H, et al. Phasor-based endogenous NAD (P) H fluorescence lifetime imaging unravels specific enzymatic activity of neutrophil granulocytes preceding NETosis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1018.
13. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *J Immunol.* 2012;189(6):2689–95.
14. Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory

stimuli in neutrophils. *J Immunol.* 2008;180(3):1895–902.

15. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 2009;30(11):513–21.
16. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol.* 2013;3:420.
17. Liana P, Murti K, Hafy Z, Liberty IA, Umar TP. Neutrophil Extracellular Traps and Its Correlation with Several Pathological Conditions: Prosperities and Deleterious Implications. *Mol Cell Biomed Sci.* 2022;6(1):1–11.
18. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol.* 2010;10(11):1325–34.
19. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Itigüez-Gutiérrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Front Immunol.* 2017;8:81.
20. Dąbrowska D, Jabłońska E, Garley M, Ratajczak-Wrona W, Iwaniuk A. New aspects of the biology of neutrophil extracellular traps. *Scand J Immunol.* 2016;84(6):317–22.
21. Kipen HM, Laskin DL. NETs: a new biomarker of traffic-related air pollution exposure: are they ready to catch fish? *Eur Respir J.* 2020;55:2000305.
22. Kasprzycka W, Homa-Mlak I, Mlak R, Malecka-Massalska T. Direct and indirect methods of evaluating the NETosis process. *J Pre-Clinical Clin Res.* 2019;13(1).
23. de Bühr N, von Köckritz-Blickwede M. How neutrophil extracellular traps become visible. *J Immunol Res.* 2016;2016:4604713.
24. Giaglis S, Hahn S, Hasler P. “The NET Outcome”: are neutrophil extracellular traps of any relevance to the pathophysiology of autoimmune disorders in childhood? *Front Pediatr.* 2016;4:97.
25. Zhao W, Fogg DK, Kaplan MJ. A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *J Immunol Methods.* 2015;423:104–10.
26. Schneck E, Mallek F, Schiederich J, Kramer E, Markmann M, Hecker M, et al. Flow Cytometry-Based Quantification of Neutrophil Extracellular Traps Shows an Association with Hypercoagulation in Septic Shock and Hypocoagulation in Postsurgical Systemic Inflammation—A Proof-of-Concept Study. *J Clin Med.* 2020;9(1):174.
27. Gupta S, Chan DW, Zaal KJ, Kaplan MJ. A high-throughput real-time imaging technique to quantify NETosis and distinguish mechanisms of cell death in

human neutrophils. *J Immunol.* 2018;200(2):869–79.

28. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, et al. NETosis markers: quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta.* 2016;459:89–93.
29. Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol.* 2012;188(7):3150–9.
30. Mitsios A, Arampatzioglou A, Arelaki S, Mitroulis I, Ritis K. NETopathies? Unraveling the dark side of old diseases through neutrophils. *Front Immunol.* 2017;7:678.
31. Lögters T, Margraf S, Altrichter J, Cinatl J, Mitzner S, Windolf J, et al. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med Microbiol Immunol.* 2009;198(4):211–9.
32. Sinha P, Matthay MA, Calfee CS. Is a “cytokine storm” relevant to COVID-19? *JAMA Intern Med.* 2020;180(9):1152–4.
33. Tang Y, Liu J, Zhang D, Xu Z, Ji J, Wen C. Cytokine storm in COVID-19: the current evidence and treatment strategies. *Front Immunol.* 2020;11:1708.
34. Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, Stemmler HJ, Schlößer HA, Schlaak M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother cancer.* 2018;6(1):56.
35. Shi Y, Zhang S, Fan L, Sun T. What Motivates Medical Students to Engage in Volunteer Behavior During the COVID-19 Outbreak? A Large Cross-Sectional Survey. *Front Psychol.* 2020;11:569765.
36. Henderson LA, Canna SW, Schulert GS, Volpi S, Lee PY, Kernan KF, et al. On the alert for cytokine storm: immunopathology in COVID-19. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72(7):1059–63.
37. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061–9.
38. Wang J, Li Q, Yin Y, Zhang Y, Cao Y, Lin X, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps in COVID-19. *Front Immunol.* 2020;11:2063.
39. Teluguakula N. Neutrophils Set Extracellular Traps to Injure Lungs in Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis.* 2021;223(9):1503–5.
40. Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, Toller-Kawahisa JE, de Lima M, Nascimento DC, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps

mediate COVID-19 pathology. *J Exp Med.* 2020;217(12):e20201129.

41. Jing H, Chen X, Zhang S, Liu H, Zhang C, Du J, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs): the role of inflammation and coagulation in COVID-19. *Am J Transl Res.* 2021;13(8):8575.
42. Ouwendijk WJD, Raadsen MP, van Kampen JJA, Verdijk RM, von der Thüsen JH, Guo L, et al. High levels of neutrophil extracellular traps persist in the lower respiratory tract of critically ill patients with coronavirus disease 2019. *J Infect Dis.* 2021;223(9):1512–21.
43. Ng H, Havervall S, Rosell A, Aguilera K, Parv K, Von Meijenfeldt FA, et al. Circulating markers of neutrophil extracellular traps are of prognostic value in patients with COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(2):988–94.
44. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI insight.* 2020;5(11):e138999.
45. Radermecker C, Detrembleur N, Guiot J, Cavalier E, Henket M, D'Emal C, et al. Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19. *J Exp Med.* 2020;217(12):e20201012.
46. Huckriede J, Anderberg SB, Morales A, de Vries F, Hultström M, Bergqvist A, et al. Evolution of NETosis markers and DAMPs have prognostic value in critically ill COVID-19 patients. *Sci Rep.* 2021;11(1):15701.
47. Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lämmle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood, J Am Soc Hematol.* 2012;120(6):1157–64.
48. Cavalier E, Guiot J, Lechner K, Dutsch A, Eccleston M, Herzog M, et al. Circulating nucleosomes as potential markers to monitor COVID-19 disease progression. *Front Mol Biosci.* 2021;8:600881.
49. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med.* 2020;8(5):475–81.
50. Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. *J Hear lung Transplant.* 2020;39(5):405.
51. Bouzid A, Uthman AT, Al-Rawi NN, Al-Rawi NH. Neutrophil Extracellular Traps in Coronavirus Infection: Interaction Network Analysis. *Syst Rev*

Pharm. 2020;11(11):1091–101.

52. Aguilar RB, Hardigan P, Mayi B, Sider D, Piotrkowski J, Mehta JP, et al. Current understanding of COVID-19 clinical course and investigational treatments. *Front Med.* 2020;7:638.
53. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine.* 2020;58:102925.
54. Hazeldine J, Lord JM. Neutrophils and COVID-19: Active Participants and Rational Therapeutic Targets. *Front Immunol.* 2021;12:2097.
55. Mastellos DC, da Silva BGPP, Fonseca BAL, Fonseca NP, Auxiliadora-Martins M, Mastaglio S, et al. Complement C3 vs C5 inhibition in severe COVID-19: Early clinical findings reveal differential biological efficacy. *Clin Immunol.* 2020;220:108598.
56. Hanff TC, Mohareb AM, Giri J, Cohen JB, Chirinos JA. Thrombosis in COVID-19. *Am J Hematol.* 2020;95(12):1578–89.
57. Zuo Y, Zuo M, Yalavarthi S, Gockman K, Madison JA, Shi H, et al. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19. *J Thromb Thrombolysis.* 2021;51(2):446–53.
58. Price LC, McCabe C, Garfield B, Wort SJ. Thrombosis and COVID-19 pneumonia: the clot thickens! *Eur Respir J.* 2020;56(1):2001608.
59. Middleton EA, He X-Y, Denorme F, Campbell RA, Ng D, Salvatore SP, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood.* 2020;136(10):1169–79.
60. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science.* 2017;358(6367):1202–6.
61. Blasco A, Coronado M-J, Hernández-Terciado F, Martín P, Royuela A, Ramil E, et al. Assessment of Neutrophil Extracellular Traps in Coronary Thrombus of a Case Series of Patients With COVID-19 and Myocardial Infarction. *JAMA Cardiol.* 2020;6(4):1–6.
62. Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, Mastellos DC, Metallidis S, Rafailidis P, et al. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest.* 2020;130(11):6151–7.
63. Gillot C, Favresse J, Mullier F, Lecompte T, Dogné J-M, Douxfils J. NETosis



and the immune system in COVID-19: mechanisms and potential treatments. *Front Pharmacol*. 2021;12:708302.

64. Thierry AR, Roch B. Neutrophil Extracellular Traps and By-Products Play a Key Role in COVID-19: Pathogenesis, Risk Factors, and Therapy. *J Clin Med*. 2020;9(9):2942.
65. Thierry AR. Anti-protease Treatments Targeting Plasmin(ogen) and Neutrophil Elastase May Be Beneficial in Fighting COVID-19. *Physiol Rev*. 2020;100(4):1597–8.

# Buku COVID dan NETs

---

## ORIGINALITY REPORT

---

6%

SIMILARITY INDEX

6%

INTERNET SOURCES

4%

PUBLICATIONS

%

STUDENT PAPERS

---

## PRIMARY SOURCES

---

1

[infeksiemerging.kemkes.go.id](https://infeksiemerging.kemkes.go.id)

Internet Source

1%

---

2

[www.pdspatklin.or.id](http://www.pdspatklin.or.id)

Internet Source

1%

---

3

[ejurnalmalahayati.ac.id](http://ejurnalmalahayati.ac.id)

Internet Source

1%

---

4

[repository.stainparepare.ac.id](http://repository.stainparepare.ac.id)

Internet Source

1%

---

5

[repository.stikeshangtuah-sby.ac.id](http://repository.stikeshangtuah-sby.ac.id)

Internet Source

1%

---

6

[banjarmasin.tribunnews.com](http://banjarmasin.tribunnews.com)

Internet Source

1%

---

7

[repository.ub.ac.id](http://repository.ub.ac.id)

Internet Source

1%

---

8

[www.pafmj.org](http://www.pafmj.org)

Internet Source

1%

---

Exclude quotes On

Exclude bibliography On

Exclude matches < 1%