

## BAB I PENDAHULUAN

Virus corona atau *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) merupakan virus yang menyerang sistem pernapasan, penyakitnya disebabkan oleh *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19). Virus ini ditemukan di Wuhan, Provinsi Hubei, Cina pada Desember 2019 yang dimana virus ini dapat menular dari manusia ke manusia dan dapat menyerang siapa saja baik ibu hamil, anak-anak, orang dewasa ataupun lansia. Terdapat 426 juta kasus terkonfirmasi dan 5,89 juta kasus kematian di seluruh dunia sampai dengan tanggal 21 Februari 2022. Tercatat COVID-19 pertama di Indonesia pada tanggal 2 maret 2020 yakni sejumlah 2 kasus dan sampai tanggal 21 Februari 2022 jumlah kasus COVID-19 di Indonesia dilaporkan sebanyak 5,2 juta kasus dengan jumlah kematian 146 ribu kasus akibat COVID-19 (Kemenkes, 2022). Meningkatnya jumlah kasus COVID-19 di Indonesia dapat terlihat dari banyaknya kasus yakni hampir 40.000 ribu kasus perhari (Kemenkes, 2022). Diagnosis COVID-19 tidak dapat didasarkan hanya pada gejala klinis seperti flu, batuk, demam dan kelelahan yang disebabkan oleh virus SARS-CoV-2 saja, tetapi juga dapat disebabkan oleh agen infeksius yang lain. Masih banyaknya kejadian luar biasa (KLB) COVID-19 dan efek dari penyakit yang cukup membahayakan maka diperlukan diagnosis yang cepat dan tepat sebagai konfirmasi karena gejala klinis yang di timbulkan COVID-19 yang dapat menyerupai gejala klinis penyakit lainnya.

SARS-Cov-2 merupakan virus RNA dari family *Coronaviridae* dan genus *Betacoronavirus* yang memiliki materi genetik berupa *Positive sense single-stranded* RNA dengan Panjang genom 26 sampai 32 kilobasa. Protein struktural virus dikode oleh gen ORF1ab yang merupakan bagian tepanjang sekitar 2/3 dari total genome yang diantaranya mengkode polyprotein dan nsp12 (RdRp), gen S yang merupakan perlekatan virus dengan molekul reseptor inang, gen E yang memiliki peran multifungsi dalam patogenesis, perakitan, dan

pelepasan virus, gen M yang mengikat nukleokapsid dan bertindak sebagai pusat perakitan virus corona, dan gen N berperan dalam pembentukan kompleks dengan genom virus. Infeksi dengan SARS-CoV-2 diawali dengan masa inkubasi saat virus bereplikasi dengan aktif dengan rata-rata masa inkubasi adalah 5 hari dan akan terus meningkat dan mencapai puncak sekitar 7-14 hari (Sethurman, 2020). Antibodi spesifik terhadap SARS-CoV-2 (IgM) akan muncul beberapa hari setelah infeksi dan onset muncul, di susul dengan pembentukan antibodi IgG.

Konfirmasi diagnosis laboratorium sangat dibutuhkan dan menjadi langkah strategis yang komperhensif dalam menekan penyebaran virus COVID-19, untuk itu dibutuhkan pemenuhan kebutuhan deteksi dalam penanganan kasus COVID-19. WHO menetapkan standar pemeriksaan 1:1000 penduduk perpekan dengan asumsi populasi Indonesia mencapai 267 juta jiwa, maka sewajarnya 267 ribu orang di periksa perpekan. Berbagai macam kit dengan prinsip dan metode yang beragam telah banyak dikembangkan. Hal ini dilakukan untuk memaksimalkan kebutuhan pemeriksaan COVID-19 yang membutuhkan deteksi cepat COVID-19, guna menekan penyebaran COVID-19 di seluruh dunia.

Rekomendasi WHO dalam standar diagnosis sebagai baku emas dalam pemeriksaan COVID-19 yaitu deteksi multipleks qRT-PCR, karena dapat secara efektif mendeteksi infeksi SARS-Cov-2 pada spesimen manusia, dengan uji sensitivitas terhadap SARS-CoV-2 100% dan spesifisitas 99.8% dengan metode NAAT atau tes amplifikasi asam nukleat melalui perbanyakan materi genetik virus (Williams, 2020). Metode RT-PCR merupakan metode menggunakan sampel RNA dengan sintesis cDNA langsung dalam mesin. Hasil yang di lihat dalam tahap qRT-PCR adalah *Relative fluorescence units* (RFU) dan *Cycle threshold* (Ct). RFU mengacu pada pengukuran dalam metode elektroforesis yang digunakan sebagai deteksi sinyal fluorezen, sedangkan Ct adalah hasil akhir RT-PCR yang merupakan perpotongan antara garis *Threshold* dengan kurva amplifikasi. Garis *Threshold* merupakan garis yang berada di atas baseline sinyal *Fluorescence*, sehingga sinyal *Fluorescence* yang terdeteksi di atas *Threshold* adalah sinyal yang digunakan dalam menentukan Ct.

Materi genetik virus bisa didapatkan melalui sampel klinis atau Bahan Biologi Tersimpan (BBT) seperti isolat, kultur, BBT genetik yang disimpan atau diarsipkan. Metode yang di pakai dalam deteksi materi genetik virus adalah amplifikasi atau perbanyakkan materi genetik. Untuk mendapatkan materi genetik, yaitu RNA dibutuhkan proses isolasi RNA virus dari spesimen klinis. Pada dasarnya prinsip isolasi adalah dengan pemecahan sel dan memisahkan materi genetik yang ada di dalam sel, baik berupa DNA maupun RNA dari komponen seluler lain berupa lemak, protein, karbohidrat dan zat lain. Komponen tersebut dapat mempengaruhi kemurnian dan keutuhan material genetik yang di isolasi (Sainsburry, 2006). Tahapan dalam proses isolasi yakni dengan tahapan persiapan, protokol isolasi RNA, uji kualitas dan kuantitas hasil isolasi dan penyimpanan RNA. Hasil isolasi RNA perlu dilakukan pengujian kualitas dan kuantitas, dengan demikian jika ada hasil yang meragukan, maka dapat dilakukan evaluasi. Pengujian kualitas dan kuantitas dapat dilakukan dengan uji konsentrasi RNA menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm, sedangkan untuk protein pada panjang gelombang 280 nm.

Metode isolasi berdasarkan teknologi dapat dibedakan antara metode isolasi manual yang di kerjakan oleh petugas laboratorium secara bertahap sesuai dengan manual kit yang digunakan dan metode isolasi otomatis dengan menggunakan tenaga robotik (Bechlian, 2009). Berdasarkan mekanisme pada isolasi otomatis meliputi, metode *Magnetic beads* yaitu RNA yang keluar dari sel yang dilisiskan, kemudian ditangkap oleh *Magnetic beads* dengan kondisi ionik berkekuatan tinggi. Setiap RNA dapat tertangkap pada *Magnetic beads* secara selektif dengan perubahan kekuatan ionik, sedangkan protein, asam nukleat dan sel kecil pengotor lain dihilangkan dengan mencucinya menggunakan etanol. RNA yang terikat dengan *Magnetic beads* dapat dielusi dari *Beads* dengan H<sub>2</sub>O atau *Buffer* dengan kekuatan ionik rendah. Sistem ini menggunakan *Magnetic beads* yang terkumpul dengan diaplikasikannya magnet pada bagian yang sempit pada tip. Pemisahan dan *Resuspension* dari partikel magnetik dilakukan menggunakan tip sekali pakai (Lee, 2010). Kelebihan dari mekanisme *Magnetic beads* yaitu mengurangi aktivitas sentrifugasi, mengurangi

filtrasi vakum, dan mengurangi pemisahan kolom berulang-ulang untuk pencucian dan elusi, kekurangannya yaitu manik-manik magnetik yang mudah terangkat kembali melalui tip sehingga dapat mempengaruhi kemurnian RNA. Mekanisme metode matriks silika, merupakan teknik isolasi fase padat untuk mengikat dan mengisolasi RNA dalam kolom spin yang berbasis filter. Kolom spin memanfaatkan membran yang mengandung silika untuk mengikat asam nukleat. Pada sampel dilisiskan dalam larutan *Buffer* yang mengandung inhibitor dan garam chaotropic dengan konsentrasi tinggi, kemudian lisis dilewatkan melalui membran silika menggunakan gaya sentrifugal dengan RNA mengikat pada silika gel. Membran yang mengandung protein residu atau kontaminan lain akan dicuci dan dihilangkan kemudian selanjutnya RNA akan dielusi dengan RNase.

Isolasi RNA berbasis silika menjadi *Gold standard* dalam isolasi RNA karena di dalam penggunaannya lebih aman dan minim dalam kontaminasi silang sehingga RNA yang dihasilkan akan lebih murni (FDA, 2021). Kekurangan dari metode silika adalah *Silica column* dan *Collection tube* tidak cukup erat selama sentrifugasi dan dapat terjadi fragmentasi saat proses pelekatan dan cuci lepas (Rapley, 2008). Prosedur metode isolasi silika dalam pengerjaan lebih sederhana karena dapat menampung sampel dalam jumlah yang besar dan lebih fleksibel digunakan karena berbasis sentrifugasi dan vakum untuk diisolasi (Sushil, 2021).

Berdasarkan hal tersebut peneliti tertarik untuk menganalisa efektivitas penggunaan metode isolasi pada kemurnian RNA secara kuantitatif terhadap virus SARS-CoV-2 dengan tujuan khusus mengetahui kemurnian RNA dari konsentrasi kultur yang digunakan dan mengetahui efektivitas penggunaan metode isolasi yang digunakan. Hipotesis dari penelitian ini yaitu terdapat perbedaan kemurnian RNA pada kegiatan isolasi dengan menggunakan metode *Silica column* (manual), *Magnetic beads* (robotik) dan *Silica column* (robotik). Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam pemilihan metode yang efektif dan efisien dalam menghasilkan kemurnian RNA yang baik pada kegiatan isolasi RNA.