

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Virus korona baru yang sekarang bernama *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) telah menyebabkan wabah penyakit pneumonia di kota Wuhan, Provinsi Hubei, Cina pada bulan Desember 2019. Sebagian besar pasien mengunjungi pasar ikan Huanan pada bulan sebelumnya (Lu *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). Gejala penyakit yang muncul adalah ciri-ciri penyakit pernapasan yang disebabkan oleh virus dengan keluhan demam, batuk, sakit kepala dan sesak napas. Beberapa pasien memiliki bukti gagal napas, syok, sindrom gangguan pernapasan akut (ARDS) dan sepsis (Kaul, 2020)

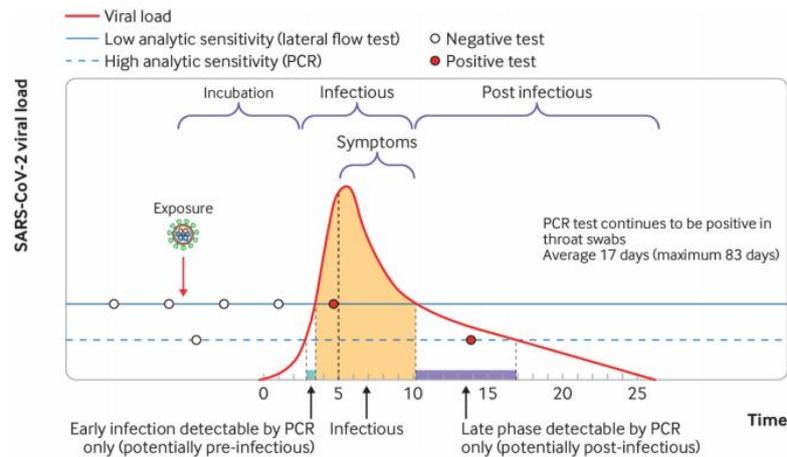
Infeksi SARS-CoV-2 menyebabkan penyakit COVID-19 (*Corona virus disease 2019*). Penyakit ini menyebar sangat cepat ke seluruh dunia dan dinyatakan sebagai pandemi oleh Badan kesehatan dunia (WHO) pada tanggal 11 Maret 2020. Berdasarkan data WHO, sampai tanggal 08 Mei 2022 pandemi COVID-19 sudah menyebabkan lebih dari 514 juta kasus dengan total kematian mencapai hampir 6 juta jiwa. Di negara Indonesia, kasus COVID-19 sudah mencapai 6 juta dengan total kematian mencapai 156 ribu jiwa (WHO, 2022a).

Penyakit ini menular dengan cepat, hal ini disebabkan karena sifat alaminya yang mudah menular (Sapkota *et al.*, 2021). Selain itu, penularan penyakit ini dapat terjadi dari manusia ke manusia melalui droplet saliva dan aerosol (Jarvis, 2020), namun menurut WHO penularan melalui droplet merupakan rute infeksi yang paling dominan.

Tak hanya berdampak terhadap masalah kesehatan dunia, pandemi COVID-19 juga menyebabkan masalah pada stabilitas ekonomi dan sosial, sehingga pendeteksian virus SARS-CoV-2 sangat dibutuhkan untuk melacak dan memutus rantai penularan penyakit. Beberapa strategi diagnostik juga dibutuhkan dalam mengevaluasi kasus potensial secara efisien dalam menyebarkan informasi tentang paparan populasi serta kekebalan (Mina & Andersen, 2021; Sapkota *et al.*, 2021; Azzi *et al.*, 2021)

Saat ini, *Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) merupakan test standard emas untuk mendeteksi virus SARS-CoV-2. Namun, alat uji RT-PCR masih memiliki beberapa keterbatasan seperti ketersediaan alat, operator, dan reagen, sehingga pengujiannya menjadi mahal. Selain itu, ada jeda waktu yang cukup lama dari waktu pengambilan sampel dengan waktu penerimaan hasil pemeriksaan sehingga memberikan celah untuk penularan (Crozier *et al.*, 2021). Untuk keperluan skrining massal, RT-PCR bukan merupakan alat uji yang ideal, karena dapat menyebabkan pengumpulan pasien di tempat pengambilan spesimen (Azzi *et al.*, 2020; To, Tsang, Yip, *et al.*, 2020). Selain itu, beberapa daerah tidak dapat mengakses uji PCR (Grant *et al.*, 2021).

Untuk alasan ini, beberapa peneliti mencoba mengembangkan alat uji cepat antigen (RDT-Ag) sebagai metode deteksi pendukung yang memungkinkan untuk memperoleh hasil deteksi yang cepat dan akurat sesuai dengan ketentuan WHO, yaitu memenuhi kriteria ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User Friendly, Rapid and Robust, Equipment free, Deliverable to end user*) (Kosack *et al.*, 2017). Alat ini bisa mendeteksi antigen virus berbasis protein, dan dapat mendeteksi protein virus saat seseorang berada pada masa menular. Walaupun “jendela deteksi” alat ini dalam mendeteksi kasus infeksius sangat sempit, alat ini sangat cocok digunakan untuk pengujian yang sering, yang bertujuan untuk mendeteksi kasus dengan penularan virus segera sebelum dan sesudah puncak gejala (Gambar 1.1). Meskipun RDT-Ag memiliki sensitivitas analitis yang lebih rendah daripada tes RT-PCR, kapasitasnya untuk mendeteksi individu menular dengan virus yang dapat dikultur sebanding (Mina & Andersen, 2021). Tersedianya RDT-Ag akan mempersingkat masa tunggu hasil deteksi. Alat ini dapat memberikan hasil yang cepat dan menghindari penundaan terkait pemeriksaan, memungkinkan pasien untuk mengisolasi diri tepat waktu (Crozier *et al.*, 2021). Sebagai bukti, kurva epidemik menurun di Liverpool ketika pengujian RDT-Ag dipasangkan dengan PCR (Mina *et al.*, 2021).



Gambar 1. 1 Jendela deteksi alat uji cepat antigen dengan PCR (Crozier et al., 2021)

Penggunaan RDT-Ag juga sudah direkomendasikan oleh WHO ketika akses pengujian menggunakan RT-PCR di suatu daerah terbatas (WHO, 2020). Kementerian Kesehatan Indonesia juga sudah mengatur mengenai penggunaan RDT-Ag dalam pemeriksaan COVID-19 di Indonesia. Penggunaan RDT-Ag dilakukan pada fase akut (dalam waktu 7 hari pertama sejak onset gejala) untuk melakukan pelacakan kontak, penegakan diagnosis dan skrining COVID-19 dengan memperhatikan akses terhadap *nucleic acid amplification test* (NAAT) serta kecepatan pemeriksaan NAAT. Kriteria akses terhadap NAAT menggunakan waktu pengiriman yaitu waktu dari pengambilan swab sampai sampel diterima laboratorium. Kriteria kecepatan pemeriksaan menggunakan waktu tunggu yaitu waktu dari sampel diterima sampai keluar hasil pemeriksaan. Kriteria akses tersebut dibagi menjadi tiga bagian, yaitu (1) Kriteria A: jika ada akses NAAT dan pemeriksaan dapat dilakukan dengan cepat (waktu pengiriman <24 jam DAN waktu tunggu <24 jam) maka pelacakan kontak dan penegakan diagnosis menggunakan

NAAT, sedangkan skrining dapat menggunakan RDT-Ag dan konfirmasi dengan NAAT, (2) Kriteria B: jika ada akses NAAT tetapi pemeriksaan tidak dapat dilakukan dengan cepat (waktu pengiriman < 24 jam DAN waktu tunggu > 24 jam) ATAU jika tidak ada akses NAAT tetapi pemeriksaan dapat dilakukan dengan cepat (waktu pengiriman >24 jam DAN waktu tunggu <48 jam) maka pelacakan kontak, penegakan diagnosis, dan skrining dapat menggunakan RDT-Ag yang kemudian dikonfirmasi dengan NAAT, dan (3) Kriteria C: jika tidak ada akses NAAT dan pemeriksaan tidak dapat dilakukan dengan cepat (waktu pengiriman > 24 jam DAN waktu tunggu >48 jam), maka pelacakan kontak, penegakan diagnosis, dan skrining dapat menggunakan RDT-Ag (Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 2021).

		Kriteria kecepatan pemeriksaan		
		Waktu tunggu ≤24 jam	Waktu tunggu 24-48 jam	Waktu tunggu >48 jam
Kriteria akses terhadap NAAT	Waktu pengiriman ≤24 jam	Kriteria A	Kriteria B	Kriteria B
		Pelacakan kontak dan penegakan diagnosis: NAAT. Skrining: RDT-Ag konfirmasi dengan NAAT.	Pelacakan kontak, penegakan diagnosis, dan skrining: RDT-Ag konfirmasi dengan NAAT.	Pelacakan kontak, penegakan diagnosis, dan skrining: RDT-Ag konfirmasi dengan NAAT.
	Waktu pengiriman >24 jam	Kriteria B	Kriteria B	Kriteria C
		Pelacakan kontak, penegakan diagnosis, dan skrining: RDT-Ag konfirmasi dengan NAAT.	Pelacakan kontak, penegakan diagnosis, dan skrining: RDT-Ag konfirmasi dengan NAAT.	Pelacakan kontak, penegakan diagnosis, dan skrining: RDT-Ag.

Gambar 1. 2 Kriteria Penggunaan RDT-Ag Kriteria yang diatur oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 2021)

Namun implementasi RDT-Ag di lapangan masih memiliki kekurangan, karena masih menggunakan spesimen nasofaring, dimana proses pengambilan sampelnya menyebabkan ketidaknyamanan pada pasien dan dapat menimbulkan resiko perdarahan (To, Tsang, Yip, *et al.*, 2020), proses samplingnya pun masih memerlukan bantuan tenaga kesehatan ahli, sehingga meningkatkan resiko penularan virus. Selain itu, pengambilan spesimen ini memberikan potensi menimbulkan kerumunan atau penumpukan pasien (Azzi *et al.*, 2020).

Untuk itu diperlukan spesimen alternatif RDT-Ag yang dapat diambil secara mandiri tanpa melibatkan tenaga kesehatan dan lebih nyaman bagi pasien. Selain itu, spesimen alternatif ini diharapkan dapat menjadi solusi pengembangan RDT-Ag untuk *self-testing* COVID-19 yang dapat dilakukan oleh seluruh masyarakat, sesuai dengan rekomendasi WHO (WHO, 2022b).

Untuk alasan ini, beberapa peneliti mengusulkan penggunaan saliva sebagai spesimen alternatif untuk mendeteksi SARS-CoV-2. Keberadaan virus SARS-CoV-2 di dalam saliva telah dibuktikan oleh beberapa peneliti dengan menggunakan alat RT-PCR. Saliva dikumpulkan dengan metode yang berbeda dan memberikan hasil deteksi yang bervariasi (Tabel 1.1).

Menurut *Center for Disease Control and Prevention*, saliva bisa menjadi spesimen alternatif untuk mendeteksi virus SARS-CoV-2 dan dikategorikan sebagai spesimen saluran pernapasan atas (CDC, 2021), hal ini disebabkan karena droplet saliva yang disekresikan oleh orang yang terinfeksi merupakan sumber utama penularan virus SARS-CoV-2 dari manusia ke manusia saat jarak sosial kurang dari 1 meter (Ruoshi Xu *et al.*, 2020).

Tabel 1. 1 Penelitian yang menunjukkan terdeteksinya virus SARS-CoV-2 pada saliva pasien terkonfirmasi positif COVID-19 menggunakan RT-PCR

Sampel	Metode pengumpulan saliva	Sensitivitas	Referensi
25 pasien terkonfirmasi terinfeksi parah atau sangat parah oleh SARS-CoV-2	<i>Drooling</i>	100%	(Azzi <i>et al.</i> , 2020)
12 pasien terkonfirmasi COVID-19	Dibutuhkan terlebih dahulu dari tenggorokan	91,7%	(To, Tsang, Yip, <i>et al.</i> , 2020)
23 pasien terkonfirmasi COVID-19	Batuk dengan membersihkan tenggorokan (<i>Posterior oropharyngeal saliva</i>)	87%	(To, Tsang, Leung, <i>et al.</i> , 2020)
96 pasien terkonfirmasi COVID-19	Batuk dalam tanpa dahak tanpa sputum	100%	(Zheng <i>et al.</i> , 2020)
39 pasien terkonfirmasi COVID-19	Meludah (<i>spitting</i>)	84,6%	(Williams <i>et al.</i> , 2020)

Dibandingkan dengan spesimen nasofaring dan orofaring, proses pengambilan spesimen saliva bersifat non invasif. Proses pengambilan sampel saliva tidak memerlukan tenaga kesehatan yang terampil, dan hal ini dapat meminimalisir biaya terkait diagnostik dan meminimalisir penularan virus kepada tenaga kesehatan dari ketidaksengajaan terkena droplet akibat pasien yang terpicu untuk bersin atau batuk saat pengambilan sampel swab nasofaring (Wyllie *et al.*, 2020; Azzi *et al.*, 2020; To, Tsang, Yip, *et al.*, 2020). Selain lebih terjangkau dan lebih aman, pengambilan sampel nasofaring telah dikaitkan dengan dengan hasil negatif palsu yang disebabkan oleh kesulitan teknis dalam proses pengambilan sample dengan swab (Vogels *et al.*, 2020).

Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa spesimen saliva tidak hanya mengandung saliva yang disekresikan dari kelenjar ludah mayor atau minor tetapi juga mengandung sekresi yang turun dari nasofaring atau keluar dari paru melalui aksi silia melapisi jalan napas (To, Tsang, Yip, *et al.*, 2020). Selain itu, ACE 2 (*Angiotensin converting enzyme 2*), reseptor utama untuk masuknya SARS-CoV-2 ke dalam sel tubuh manusia diekspresikan sangat tinggi pada sel epitel mulut khususnya di lidah (Hao Xu *et al.*, 2020)

Sebagai cairan diagnostik, saliva memiliki beberapa kelebihan diantaranya saliva bisa dengan mudah dikumpulkan sendiri oleh pasien sehingga meminimalisir resiko penularan virus kepada petugas kesehatan, dan prosedur pengambilan spesimennya pun bersifat non invasif (Azzi *et al.*, 2020; To, Tsang, Yip, *et al.*, 2020; Khurshid *et al.*, 2020). Selain itu, jumlah sampel yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan swab nasofaring atau orofaring.

Keunggulan lain dari spesimen saliva yaitu profil viral load pada saliva yang mengandung SARS-CoV-2 hampir mencapai puncaknya pada saat onset gejala. Viral load saliva naik pada minggu pertama setelah onset gejala dan kemudian menurun seiring waktu (To, Tsang, Leung, *et al.*, 2020). Selain itu, SARS-CoV-2 dapat terdeteksi dalam saliva selama 20 hari atau lebih lama (To, Tsang, Leung, *et al.*, 2020; Ruoshi Xu *et al.*, 2020). Selain itu, pendeteksian SARS-CoV-2 pada saliva memiliki variabilitas yang rendah dibandingkan dengan swab nasofaring, selain itu pasien asimtomatik dapat terdeteksi menggunakan sampel saliva (Wyllie *et al.*, 2020).

Sebelumnya, RDT-Ag dengan spesimen saliva telah dikembangkan untuk mendeteksi protein spike SARS-CoV-2. Alat ini memiliki sensitivitas sebesar 93% terhadap spesimen saliva pasien terkonfirmasi COVID-19, namun memiliki spesifisitas yang rendah (42%), karena tingginya jumlah positif palsu (Azzi et al., 2020a). Dalam penelitian ini, kami mengembangkan alat uji cepat antigen untuk mendeteksi nukleokapsid (N) SARS-CoV-2 menggunakan spesimen saliva, karena protein N memiliki sifat sangat imunogenik dan berlimpah selama infeksi (Dutta *et al.*, 2020).

Dengan dikembangkannya RDT-Ag COVID-19 berbasis deteksi nukleokapsid pada sampel saliva ini diharapkan bisa menjadi alat pengujian mandiri sesuai dengan rekomendasi WHO, yang memungkinkan pasien melakukan pengujian mandiri di rumah dan bisa melakukan tindakan setelah mendapatkan hasil test, apakah perlu melakukan isolasi di rumah atau menerima perawatan segera, dan juga bisa berpotensi mengurangi kesenjangan akses pengujian yang ada dalam melacak dan memutus rantai penularan virus SARS-CoV-2.



Gambar 1. 3 Penggunaan RDT-Ag sebagai alat *self-testing* COVID-19

1.2 Identifikasi Masalah

1. Apakah alat uji cepat COVID-19 berbasis deteksi Nukleocapsid pada sampel saliva dapat dikembangkan?
2. Apakah viskositas saliva dapat diatasi, sehingga saliva dapat mengalir di alat uji cepat yang dikembangkan?
3. Berapa konsentrasi terkecil protein N SARS-CoV-2 yang dapat terdeteksi oleh alat uji cepat yang dikembangkan?
4. Berapa spesifisitas dan selektivitas alat uji cepat yang dikembangkan?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Membuat desain untuk pengembangan alat uji cepat COVID-19 berbasis deteksi Nukleocapsid pada sampel saliva dengan melakukan pemilihan antibodi dan optimasi komponen alat uji cepat yang disesuaikan dengan karakteristik saliva.
2. Melakukan formulasi buffer yang optimal sehingga dapat menurunkan viskositas saliva dan dapat merelease protein N dari virus.
3. Melakukan pengujian alat uji cepat yang telah dikembangkan terhadap protein N SARS-CoV-2 dengan berbagai variasi konsentrasi.
4. Melakukan pengujian alat uji cepat yang telah dikembangkan terhadap saliva yang terkonfirmasi negatif COVID-19 (Spesifisitas) dan protein rekombinan hemaglutinin (HA) virus flu burung (Selektivitas).

1.4 Manfaat Penelitian

1. Diperolehnya purwarupa alat uji cepat COVID-19 berbasis deteksi Nukleocapsid pada sampel saliva.
2. Tersedianya alat uji cepat antigen dengan spesimen saliva untuk *self-testing* COVID-19.
3. Sebagai landasan ilmiah dalam pengembangan alat uji cepat untuk mendeteksi SARS-CoV-2.