BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyebaran *Coronavirus Disease* 2019 (COVID-19) di Indonesia semakin meluas dan terus meningkat sejak pertama kali diumumkan dua kasus pasien positif COVID-19 pada 2 Maret 2020. Sampai tanggal 29 September 2020, telah terdapat 282.724 kasus terkonfirmasi positif COVID-19, dengan 10.601 kasus kematian dan 210.437 kasus pasien sembuh, dari 34 provinsi dan 406 kabupaten/kota di seluruh Indonesia (www.covid19.go.id). Indonesia maupun negara lain yang penemuan kasusnya terus bertambah cenderung memiliki persentase penularan pra-simptomatis tinggi yang disebabkan oleh masa karantina yang singkat dan tidak diterapkannya protokol menjaga jarak fisik (He et al., 2020). Sampai tanggal 25 September 2020, Indonesia telah melaporkan sebanyak 60 sekuen genom SARS-CoV-2 dari pasien positif pada beberapa daerah di Indonesia yang kini tersimpan di database GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*). Tingginya angka kasus terkonfirmasi positif COVID-19 di Indonesia salah satunya disebabkan oleh kurangnya fasilitas deteksi.

Diagnosa molekuler COVID-19 yang saat ini dilakukan untuk mendeteksi virus penyebab COVID-19, SARS-CoV-19, yakni *quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*(RT-qPCR). RT-qPCR merupakan metode diagnostik yang secara rutin digunakan serta telah menjadi standar baku untuk deteksi virus penyebab infeksi saluran pernapasan seperti SARS-CoV dan MERS-CoV (Poon et al., 2004; Corman et al, 2012; Corman et al., 2020). Pada prinsipnya, RT-qPCR mengubah RNA menjadi DNA komplementer (cDNA) yang kemudian diikuti amplifikasi cDNA menggunakan primer spesifik gen target, dimana produk PCR yang terbentuk pada setiap siklusnya dapat dikuantifikasi dan dimonitor secara *real-time* berdasarkan pengamatan sinyal fluoresensi (Bustin and Mueller, 2005).

Primer yang baik perlu didesain dan divalidasi sehingga dapat diandalkan untuk memastikan sensitivitas dan spesifisitas reaksi PCR (Robertson and Walsh-Weller, 1998). Selain itu, menempelnya primer pada template DNA gen target (annealing) saat proses RT-qPCR merupakan tahap penting untuk terjadinya amplifikasi produk PCR. Oleh karena itu, suhu annealing (annealing temperature; Ta) merupakan parameter yang lebih penting dibandingkan suhu leleh (melting temperature; Tm) (Bustin and Huggett, 2017). Menurut Bustin and Huggett(2017) primer yang ideal adalah primer yang benar-benar spesifik, tidak memiliki struktur hairpin atau kecenderungan untuk membentuk primer dimer, dan toleran terhadap suhu yang sesuai. Selain itu, struktur amplikon dan sekuens target juga harus bebas dari struktur sekunder.

Beberapa studi tentang deteksi SARS-Cov-2 telah melaporkan beberapa desain set primer komersial tertarget pada gen SARS-CoV-2, diantaranya gen ORF1ab (open reading frame1), RdRp (RNA-dependentRNA polymerase), N (Nucleocapsid protein), dan E (Envelope protein) untuk deteksi COVID-19 (Corman et al., 2020; Jung et al., 2020; Won et al., 2020). Namun, set primer dari kit deteksi SARS-CoV-2 komersil tersebut didesain menggunakan sekuen yang ada di database publik sehingga spesifisitas primer tersebut untuk SARS-CoV-2 strain Indonesia perlu dipelajari lebih lanjut. Pada penelitian ini akan digunakan set primer RdRp hasil desain secara insilico dengan menggunakan genome SARS-CoV-2 Indonesia, untuk diuji secara molekuler dengan PCR dan qPCR. Pengujian ini bertujuan untuk pengembangan dan formulasi kit deteksi molekuler secara mandiri, terutama untuk deteksi COVID-19, di Indonesia.

Kit deteksi RT-qPCR untuk deteksi COVID-19 yang digunakan secara global, termasuk di Indonesia, adalah kit yang berbasis *one step* TaqMan-qPCR atau menggunakan probe (Won et al., 2020). Selain itu kebutuhan kit deteksi molekuler di Indonesia masih berbasis impor dari luar negeri. Penggunaan probe dan impor kit ini menyebabkan jasa deteksi COVID-19 dengan metode swab-PCR relatif lebih mahal. Pada penelitian ini dilakukan uji molekuler berbasis PCR dan RT-qPCR non-probe dengan SYBR Green. RT-qPCR berbasis non-probe merupakan sistem deteksi berdasarkan ikatan *doublestrandDNA* (dsDNA) dengan

pewarna fluorofor SYBR Green (Tajadini et al., 2014). Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya oleh Won et al (2020) dan Ganguly et al (2020), dilaporkan bahwa metode deteksi SARS-CoV-2 dengan RT-qPCR berbasis SYBR green menunjukkan hasil yang menjanjikan dengan tingkat sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Pengembangan formulasi kondisi PCR dan qPCR berbasis SYBR-green untuk keperluan deteksi molekuler COVID-19 ini diharapkan dapat membantu percepatan proses penanganan COVID-19 di Indonesia.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum:

   Melakukan optimasi kondisi PCR, terutama kondisi suhu *annealing* dan konsentrasi primer, untuk keperluan deteksi SARS-CoV-2 di Indonesia
2. Tujuan Khusus:

   Mengetahui kondisi suhu *annealing* dan konsentrasi primer yang optimal untuk pengembangan kit deteksi dan diagnostik, terutama untuk deteksi molekuler SARS-CoV-2 di Indonesia

1.3 Manfaat Penelitian

1. Bagi Mahasiswa

   Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dan kemampuan khususnya dalam mengasah ilmu molekuler untuk pengembangan metode deteksi SARS-CoV-2
2. Bagi Program Studi

   Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan pemikiran yang dapat memperkaya khazanah ilmu pengetahuan dalam bidang bioteknologi, terutama dalam hal pengetahuan tentang nilai guna bioteknologi dalam bidang molekuler untuk deteksi SARS-CoV-2
3. Bagi Bidang Kesehatan

   Penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi dalam menghasilkan set primer SARS-CoV-2 yang dapat dimanfaatkan untuk keperluan penelitian dan diagnostik SARS-CoV-2 dalam rangka deteksi cepat dan penanganan COVID-19 yang tepat di Indonesia.