

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Virus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) merupakan jenis baru dari marga β -*coronavirus* yang pertama kali dilaporkan pada akhir 2019 dan dengan cepat menyebabkan pandemi. Sebelum virus SARS-CoV-2 muncul, terdapat empat coronavirus lain yang telah dilaporkan menginfeksi manusia yakni *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV), *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV), *Human Coronavirus OC43* (HCoV-OC43) dan *Human Coronavirus HKU1* (HCoV-HKU1). Dua di antaranya telah menyebabkan epidemi pada waktu sebelumnya yakni penyakit *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS) pada tahun 2003 dan *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS) pada tahun 2012. Coronavirus lainnya (OC43 dan HKU1) diketahui beredar di populasi manusia selama bertahun-tahun dan menyebabkan penyakit ringan musiman. Di sisi lain virus SARS-CoV-2 menyerang organ sistem pernapasan bawah yang menyebabkan pneumonia, mirip dengan dampak dari virus SARS-CoV dan MERS-CoV (Bò dkk., 2021).

Peneliti dari pemerintah, akademisi, dan industri berjuang mengembangkan vaksin dengan cepat untuk menghentikan pandemi (Li dan Li, 2021). Vaksin inaktif menjadi salah satu jenis vaksin yang telah berhasil dikembangkan. Vaksin inaktif merupakan vaksin yang dibuat dengan menetralkan virus melalui radiasi, pemanasan atau bahan kimia seperti

formaldehida sehingga siklus replikasi virus terhenti (Chaudhry dkk., 2020). Virus yang telah diisolasi maupun dinaktivasi perlu dilakukan pengukuran titer virus untuk disesuaikan dengan standar titer yang digunakan. (Nunnally dkk., 2015). Titer virus adalah konsentrasi total partikel virus pada suatu sampel. Pengukuran titer virus dalam formulasi sediaan vaksin bertujuan menentukan jumlah optimal titer virus yang dapat memicu imunogenisitas (Palmer dan Ng, 2004).

Uji hemaglutinasi (*HA Assay*) merupakan salah satu metode pengukuran jumlah partikel virus yang diperlukan untuk hemaglutinasi sel darah merah atau *red blood cell* (RBC) dengan satuan *hemagglutination unit* (HAU). Metode ini telah digunakan sebagai tahapan pengukuran titer 4 HAU virus influenza yang selanjutnya digunakan pada tahap *hemagglutination inhibition assay* (HI assay) (Kaufmann dkk., 2017). Keunggulan dari penggunaan metode pengukuran titer virus ini diantaranya sederhana dan murah dalam pengaplikasiannya (Townsend dkk., 2021).

Tantangan pada pengukuran titer virus SARS-CoV-2 adalah tidak terlihat adanya hemaglutinasi pada sel darah merah dalam uji hemaglutinasi (Mohit dkk., 2021). Lain halnya dengan HCoV-OC43 yang juga termasuk dalam marga *Betacoronavirus*, secara alami memiliki aktivitas hemaglutinasi terhadap sel darah merah dengan mengikat reseptor *9-O-acetylated sialic acid* (*9-O-Ac-Sia*) pada reseptor sel darah merah (Huang dkk., 2015). Penelitian terdahulu telah mengembangkan desain uji hemaglutinasi dengan praperlakuan enzim *neuraminidase* untuk dapat menunjukkan aktivitas aglutinasi sel darah

merah oleh berbagai virus yang secara alami tidak memiliki aktivitas hemaglutinasi. Praperlakuan *neuraminidase* dapat memotong residu *sialic acid* yang berikatan pada *spike (S) protein* sampel virus yang dipanen dari kultur sel sehingga *S protein* virus memiliki ruang untuk dapat mengikat *sialic acid* pada reseptor sel darah merah (Bayoumie, 2016).

Berdasarkan penelitian Park dkk. (2010), desain uji hemaglutinasi virus *Porcine Epidemic Diarrhea Virus* (PEDV) dengan praperlakuan *neuraminidase* 50 mU/mL dan inkubasi pada temperatur 37°C selama 30 menit berhasil memperlihatkan aktivitas hemaglutinasi virus PEDV pada sel darah merah. Penelitian serupa dengan konsentrasi praperlakuan enzim *neuraminidase* 1 U/mL pada temperatur inkubasi yang sama yakni 37°C selama 30 menit berhasil memperlihatkan aktivitas hemaglutinasi sel darah merah oleh virus *Infectious Bronchitis Virus* (IBV). Penelitian lebih lanjut mengungkapkan aktivitas *neuraminidase* dapat menghilangkan residu *sialic acid* dari *S protein* virus sehingga menginduksi aktivitas hemaglutinasi pada virus IBV (Bayoumie, 2016; Mahmood dkk., 2004). Penelitian terbaru pada virus *Porcine Deltacoronavirus* (PDCoV) juga membuktikan keberhasilan praperlakuan *neuraminidase* 50-100 mU/mL dan temperatur inkubasi 37°C selama 30 menit dalam memperlihatkan aktivitas hemaglutinasi oleh virus pada sel darah merah (Zhang dkk., 2020).

Perlakuan lain untuk meningkatkan hemaglutinasi adalah menurunkan *zeta potential* (gaya tolak-menolak antara sel darah merah) dengan mengubah komposisi media melalui penambahan zat makromolekul seperti *polyethylene*

glycol (PEG). Senyawa ini mampu menghilangkan air dari permukaan sel darah merah dan mempromosikan pengikatan antibodi dengan situs antigenik. Ikatan hidrofobik merupakan ikatan utama yang terbentuk antara antigen dan antibodi melalui reaksi endotermik di mana pada suhu yang tinggi, reaksi akan meningkat (Fernandes dkk., 2011). Dalam penelitian Handriani dkk. (2021) yang berkaitan dengan aglutinasi sel darah merah, PEG dapat mengikat molekul air pada permukaan sel darah merah yang berdampak pada penurunan jarak antar sel darah merah. Berdasarkan prinsip tersebut, penurunan *zeta potential* dan jarak antar sel darah merah oleh PEG serta peningkatan reaksi endotermik diharapkan mampu mempermudah pengikatan *receptor-binding domain* (RBD) pada reseptor *spike* virus dengan *sialic acid* pada reseptor sel darah merah dan memicu aktivitas hemaglutinasi pada sel darah merah.

Berdasarkan penelitian Weldy (2014), PEG memiliki kemampuan dalam meningkatkan reaksi antigen-antibodi yang ditunjukkan dengan peningkatan kualitas aglutinasi sebesar 54% pada larutan yang berisi serum 0,1 mL, sel darah merah 3-4% sebanyak 0,05 mL yang ditambahkan PEG 0,05 mL dan diinkubasi pada temperatur 37°C selama 15-30 menit dibandingkan larutan serupa yang ditambahkan *low ionic strength saline* (LISS). Berdasarkan penelitian Nance dan Garratty (1987), sampel 25 jenis antibodi yang diujikan dengan PEG 4000 20% (*w/v*) menunjukkan 64% antibodi mengalami reaksi pengikatan antigen lebih kuat di dalam PEG. Penelitian serupa dilakukan kembali oleh Handriani dkk. (2021) dengan menggunakan PEG 6000 5% (*w/v*) mampu mempercepat formasi aglutinasi sel darah merah oleh Anti (-A, -B)

yakni selama 2 detik dari waktu normal aglutinasi 15 detik tanpa PEG. Penelitian tersebut juga menunjukkan PEG 6000 5% (w/v) memberikan kualitas aglutinasi (*agglutination grade*) tertinggi yang diamati secara mikroskopis dibanding PEG 6000 1%, 2% dan 3%.

Berdasarkan berbagai penelitian di atas, praperlakuan *neuraminidase*, penambahan PEG dan peningkatan temperatur inkubasi berpotensi meningkatkan keberhasilan aktivitas hemaglutinasi sel darah merah oleh virus SARS-CoV-2. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan desain kombinasi praperlakuan *neuraminidase*, penambahan PEG dan variasi temperatur inkubasi untuk uji hemaglutinasi virus SARS-CoV-2 terhadap sel darah merah.

B. Perumusan Masalah

1. Berapa batas aman penggunaan konsentrasi PEG 4000 (% w/v) yang tidak menyebabkan hiperagregasi pada sel darah merah ayam dan mencit (BALB/c)?
2. Bagaimana pengaruh penambahan PEG dalam batas konsentrasi aman terhadap uji hemaglutinasi sel darah merah ayam oleh virus ND?
3. Desain kombinasi perlakuan apa yang paling memberikan pengaruh terhadap aktivitas hemaglutinasi sel darah merah mencit (BALB/c) dalam uji hemaglutinasi virus SARS-CoV-2?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui batas aman penggunaan konsentrasi PEG 4000 (% w/v) yang tidak menyebabkan hiperagregasi pada darah merah ayam dan mencit (BALB/c).
2. Mengetahui pengaruh penambahan PEG dalam batas konsentrasi aman terhadap uji hemaglutinasi sel darah merah ayam oleh virus ND.
3. Mengetahui desain kombinasi perlakuan yang paling memberikan pengaruh terhadap aktivitas hemaglutinasi sel darah merah mencit (BALB/c) dalam uji hemaglutinasi virus SARS-CoV-2.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian dilakukan untuk menyajikan data pengaruh kombinasi perlakuan *neuraminidase pretreatment* virus SARS-CoV-2, PEG dan temperatur inkubasi dalam desain uji hemaglutinasi virus SARS-CoV-2. Penelitian diharapkan memberikan informasi ilmiah kepada akademisi mengenai konsentrasi maksimum PEG 4000 (% w/v) yang tidak menyebabkan hiperagregasi pada 1%, pengaruh penambahan konsentrasi PEG terhadap uji hemaglutinasi sel darah merah ayam oleh virus ND dan kombinasi perlakuan dalam desain uji hemaglutinasi yang dapat menunjukkan aktivitas hemaglutinasi sel darah merah oleh virus SARS-CoV-2. Penelitian juga diharapkan dapat menjadi *novelty* dalam keberhasilan metode uji hemaglutinasi virus SARS-CoV-2 pada sel darah merah dengan cara sederhana yang dapat digunakan oleh masyarakat industri dalam mengoptimalkan proses produksi vaksin yang lebih efektif.