

II. TINJAUAN PUSTAKA

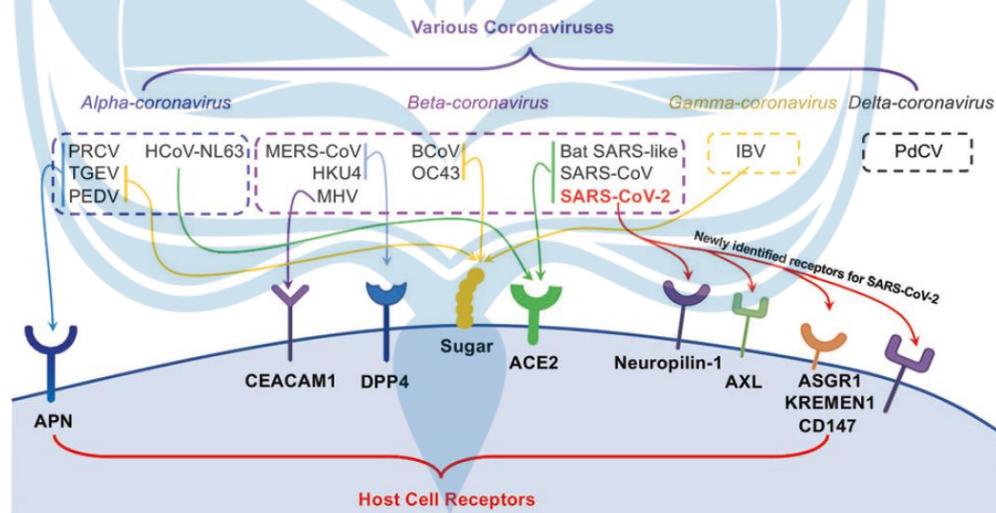
A. Virus SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 merupakan virus dengan *positive-sense RNA* (+ssRNA) yang termasuk ke dalam genus *Betacoronavirus* garis keturunan B dalam suku *Coronaviridae* (Gambar 1.). Genom virus SARS-CoV-2 berukuran ~29,9 kb dan sebanyak ~78% urutan homologinya sama dengan virus SARS-CoV. Salah satu komponen struktur virus SARS-CoV-2 yakni protein S (*spike glycoprotein*; Gambar 2.). Protein S ini terdiri dari subunit S1, subunit S2 dan subunit fusi membran (S2). Protein subunit S1 terdiri dari *signal peptide* (SP), *receptor-binding domain* (RBD), *subdomain 1* (SD1) dan *subdomain 2* (SD2), sedangkan subunit S2 terdiri dari *fusion peptide* (FP), *heptad repeat 1* (HR1) dan *heptad repeat 2* (HR2). Subunit fusi membran (S2) terdiri dari transmembran (TM) (Zhang dkk., 2021). Menurut Gorbalenya dkk. (2020), klasifikasi taksonomi dari virus SARS-CoV-2 adalah sebagai berikut:

<i>Realm</i>	: Riboviria
<i>Order</i>	: Nidovirales
<i>Suborder</i>	: Cornidovirineae
<i>Family</i>	: Coronaviridae
<i>Subfamily</i>	: Orthocoronavirinae
<i>Genus</i>	: <i>Betacoronavirus</i>
<i>Subgenus</i>	: <i>Sarbecovirus</i>
<i>Species</i>	: <i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i>

B. Reseptor Sel Pengikat RBD SARS-CoV-2

Masuknya SARS-CoV-2 ke dalam sel inang dimulai dari pengikatan RBD dari protein S dengan reseptor di permukaan sel. SARS-CoV-2 menginfeksi sel dengan beberapa jalur diantaranya *receptor-mediated plasma membrane fusion*, *receptor-mediated endocytosis*, dan *antibody-dependent viral entry* (Bò dkk., 2021). Manusia memiliki reseptor *Angiotensin-Converting Enzyme 2* (ACE2) sebagai reseptor utama yang diikat virus SARS-CoV-2 (Gambar 3.) Protein ACE2 memiliki domain *N-terminal peptidase* yang terdiri dari dua lobus yang salah satunya akan diikat oleh RBD SARS-CoV-2 (Bò dkk., 2021; Zhang dkk., 2021).



Gambar 3. Empat genera utama (*alpha-*, *beta-*, *gamma-*, dan *delta-*) coronavirus dan resptor yang diikat (Sumber: Zhang dkk., 2021a)

C. Sel Darah Merah dan Virus SARS-CoV-2

Sel darah merah adalah komponen fungsional dalam darah sebagai transpor gas dan nutrisi dalam tubuh manusia. Sel darah merah berbentuk cakram

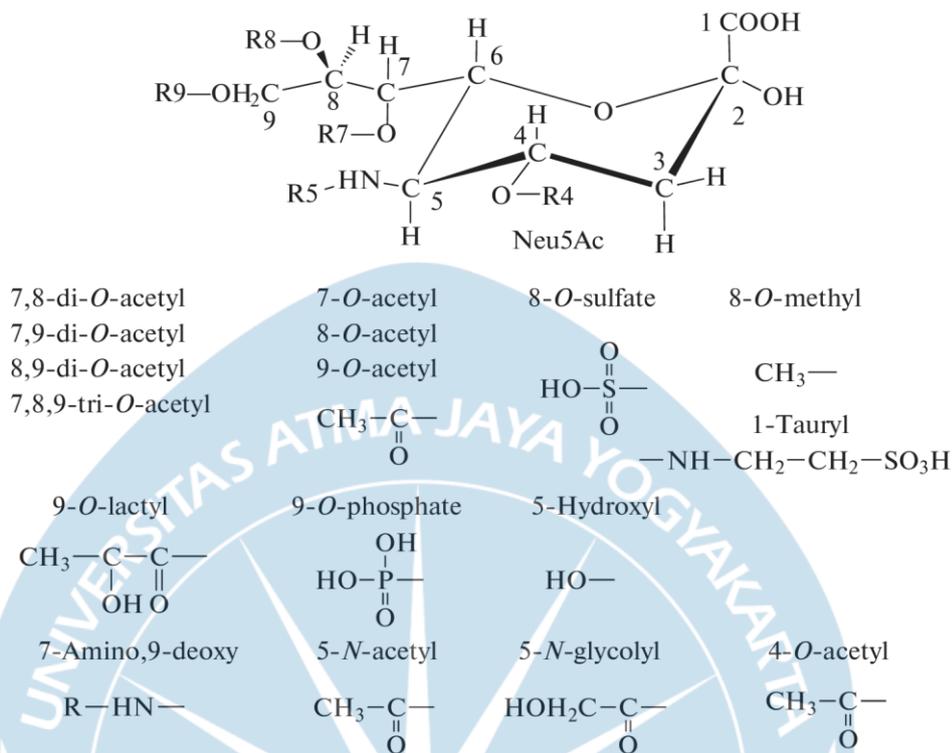
bikonkaf pada kondisi ideal dan kondisi ideal. Sel darah merah sangat sensitif dengan kondisi di sekitarnya dan dapat berubah bentuknya sebagai respons terhadap kondisi lingkungan, seperti terpapar dengan senyawa oksidan atau kondisi mengubah fosfolipid bilayer pada sel darah merah. Paparan air juga dapat menyebabkan perubahan morfologi sel darah merah menjadi stomasit (Barbalato dan Pillarisetty, 2024).

Korelasi sel darah merah dan virus SARS-CoV-2 ditunjukkan dengan adanya peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) pada pasien COVID-19 yang merusak membran sel darah merah melalui peroksidasi lipid dan proses oksidasi protein serta *senescence* sel darah merah melalui akumulasi kalsium dan paparan *phosphatidylserine*. Virus SARS-CoV-2 juga dapat berinteraksi dengan sel darah merah sekalipun tidak ditemukan reseptor ACE2 pada sel darah merah. Beberapa reseptor atau protein membran pada sel darah merah di antaranya CD147, NRP-1, CD26, AGTR2, KREMEN1, ASGR1, ANP, TMEM30A, CLEC4G, dan LDLRAD3. *G protein-coupled receptor 78* (GRP78) dan *Band 3* juga dilaporkan sebagai reseptor yang diikat virus SARS-CoV-2. *Erythrocyte band 3 protein* menyusun 25-30% total membran protein sel darah merah yang juga menjadi mediasi pengikatan S protein dari virus SARS-CoV-2 dan menyebabkan hipoksia. Protein ORF8 yang diekspresikan virus SARS-CoV-2 juga dapat mengikat bagian profirin hemoglobin pada rantai $\beta 1$ (di dalam sel darah merah) yang menyebabkan gangguan fungsional hemoglobin hingga hemolisis yang menurunkan kapasitas pengangkutan oksigen (Jung dan Connes, 2024). Dalam penelitian Kronstein-Wiedemann

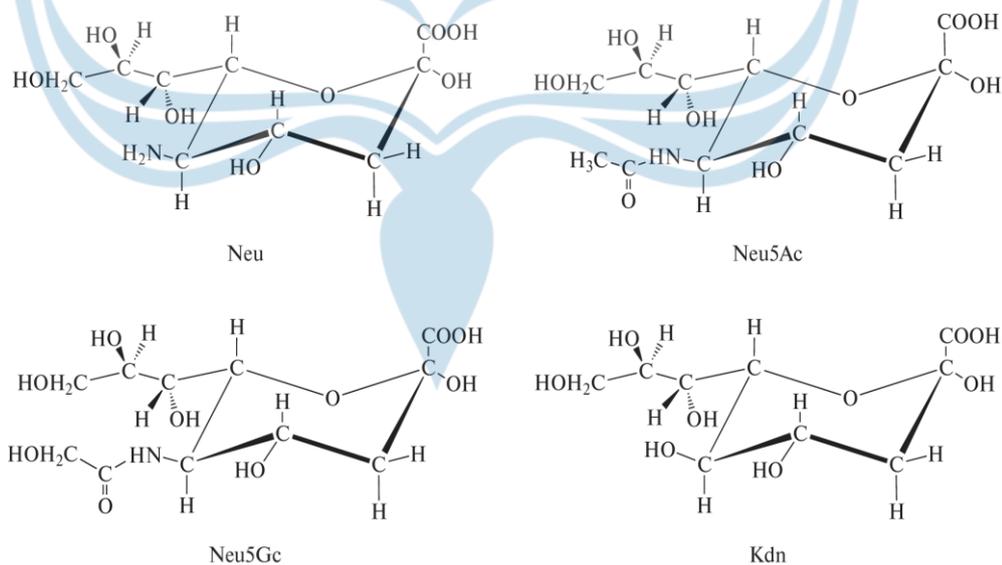
dkk. (2022), sel progenitor sel darah merah mengekspresikan reseptor ACE2, CD147 dan CD26 pada hari ke-5 diferensiasi sel darah merah yang dapat menyebabkan prekursor sel darah merah dapat diikat langsung oleh virus SARS-CoV-2

D. Reseptor *Sialic acid* Pengikat Virus

Sialic acid atau asam *N-acetylneuraminic* (Neu5Ac) adalah ragam kelompok *9-carbon carboxylated monosaccharides* berada di ujung terluar dari rantai karbohidrat terikat *-N* dan *-O* serta *lipid-associated glycoconjugates* pada reseptor sel. *Sialic acid* disintesis oleh hewan dan jarang disintesis oleh tumbuhan (Ghosh, 2020). *Sialic acid* adalah molekul turunan dari *neuraminic acid* yang menempati posisi terminal dalam rantai residu monosakarida dari berbagai glikokonjugat. Lebih dari 80 anggota keluarga *sialic acid* memiliki berbagai substituen dalam gugus amino atau hidroksil (Gambar 4.). Modifikasi *sialic acid* paling sering ditemukan pada gugus nomor 4, 5, 7, 8, dan 9 dengan bentuk utama *sialic acid* ditentukan oleh gugus nomor 5 (Gambar 5.) Jenis *sialic acid* yang dominan pada manusia adalah *Neu5Ac* diikuti dengan turunan *O-acetylated* dan *O-lactylated* pada rantai samping *sialic acid*. (Volkhina dan Butolin, 2022).



Gambar 4. Beberapa contoh anggota keluarga *sialic acid* (Sumber: Volkhina dan Butolin, 2022)



Gambar 5. Beberapa *sialic acid* utama pada manusia (Sumber: Volkhina dan Butolin, 2022)

Glycosylation dan *sialylation* menyediakan berbagai macam glikokonjugat dan komponen interaksinya dengan reseptor sel. Sebagai contoh, virus influenza D (IDV) mengenali molekul *9-O-acetylated N-acetylneuraminic acid* (*Neu5,9Ac2*) dan *9-O-acetylated N-glycolylneuraminic acid* (*Neu5Gc9Ac*) pada reseptor sel inang, virus Influenza C (ICV) mengenali molekul *Neu5,9Ac2* dan pada reseptor sel inang (Volkhina dan Butolin, 2022) Berbagai coronavirus menjadikan *sialoglycan-based receptors* sel inang sebagai komponen utama untuk berinteraksi (Tabel 1.). Virus mengikat komponen permukaan sel berupa *N acetyl-9-O-acetylneuraminic acid* sebagai inisiasi dari tahap infeksi (Bò dkk., 2021).

Tabel 1. Patogen pengikat *sialic acid* pada permukaan sel manusia

<i>Pathogen</i>	<i>Binding protein</i>	<i>Known target sialylated sequence</i>
<i>Human Influenza A</i>	<i>Hemagglutinin</i>	<i>Siaα2-6Gal (NAc)</i>
<i>Avian Influenza A</i>	<i>Hemagglutinin</i>	<i>Siaα2-3Galβ1-</i>
<i>Human Influenza C</i>	<i>Hemagglutinin-esterase</i>	<i>9-O-Ac-Siaα2-</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Toxin</i>	<i>Galβ1-3GalNAcβ1,4 (Siaα2-3) Lac-Cer</i>
<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>EBA-175</i>	<i>Siaα2-3Galβ1-3 (Siaα2-6) GalNAc-O-</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Toxin</i>	<i>Polysialogangliosides</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>SabA</i>	<i>Siaα2-3Gal on gangliosides</i>

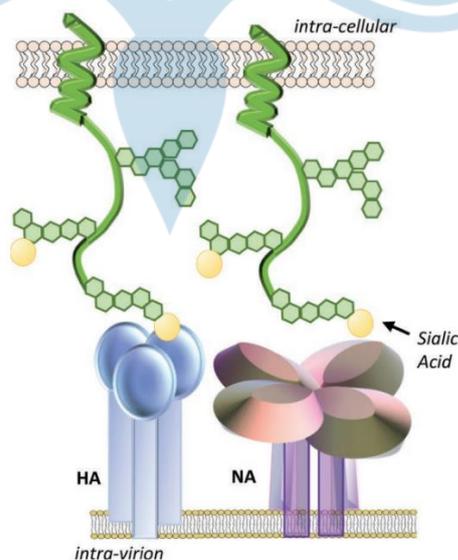
(Sumber: Varki, 2008)

HCoV-OC43 dan virus influenza C menggunakan molekul *9-O-acetylated sialic acid (9-O-Ac-Sia)* pada reseptor sel inang untuk berikatan dan menunjukkan aktivitas hemaglutinasi yang spesifik pada sel darah merah tikus dan mencit yang memiliki *9-O-Ac-Sia* dengan konsentrasi tinggi pada permukaan sel darah merah. Manusia, domba dan kuda memiliki sel darah merah yang mengekspresikan *9-O-Ac-Sia* konsentrasi rendah atau tidak ada sama sekali sehingga tidak ada aktivitas HA oleh HCoV-OC43. *9-O-Ac-Sia* merupakan molekul reseptor penentu pengikatan virus influenza tipe C, hCoV-OC43, *Bovine Coronaviruses (BCoV)*, dan *Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus (PHEV)* (Huang dkk., 2015). Penelitian terbaru mengungkapkan bahwa terjadi penurunan pengikatan RBD dan infeksi virus SARS-CoV-2 terhadap sel yang mengekspresikan ACE2 ketika jumlah *sialic acid* pada permukaan sel diturunkan dengan perlakuan farmakologis, genetik, dan enzimatik (Nguyen dkk., 2021).

E. Praperlakuan *Neuraminidase*

Neuraminidase merupakan exosialidase yang memotong ikatan α -ketosidik antara *sialic (N-acetylneuraminic) acid* dengan residu gula di dekatnya (Shtyrya dkk., 2009; Varghese dan Colman, 1991) (Gambar 6.). Pemotongan residu *sialic acid* pada reseptor sampel virus (hasil dari kultur sel) akan meningkatkan pengikatan *S protein* virus dengan molekul *sialic acid* pada reseptor sel darah merah yang ditunjukkan dengan adanya aktivitas hemaglutinasi oleh praperlakuan *neuraminidase* virus IBV. Praperlakuan tersebut dilakukan dengan konsentrasi *neuraminidase* 1 U/mL dan diinkubasi

pada suhu 37°C selama 30 menit. (Bayoumie, 2016; Mahmood dkk., 2004). Praperlakuan *neuraminidase* pada *Rhabdomyosarcoma* (RMS) *cell lines* juga terbukti mampu menghilangkan *sialic acid* terminal bebas atau termodifikasi (2,3-, 2,6-, or 2,8-linked to the subterminal residue of a sugar chain) (Huang dkk., 2015). Beragam virus lain seperti virus PDCoV yang diberikan praperlakuan dengan tripsin (5-100 µg/mL) atau *neuraminidase* (50-100 mU/mL) dan inkubasi 37°C selama 30 menit menunjukkan kemampuan hemaglutinasi pada sel darah merah kelinci, namun tidak menunjukkan hemaglutinasi pada sel darah merah kelinci yang diberikan praperlakuan tripsin (5-100 µg/mL) maupun *neuraminidase* (50 mU/mL) dan inkubasi 37°C selama 30 menit (Zhang dkk., 2020). Hal serupa juga terjadi pada virus *Porcine Epidemic Diarrhea Virus* (PEDV) menunjukkan aktivitas hemaglutinasi pada sel darah merah kelinci setelah dilakukan *treatment* dengan tripsin atau *neuraminidase* (Park dkk., 2010).



Gambar 6. Pengikatan *sialic acid* oleh protein hemaglutinin dan pemotongan *sialic acid* oleh *neuraminidase* (Sumber: McAuley dkk., 2019)

F. Hemaglutinasi, PEG dan Temperatur

Peningkatan aglutinasi dapat dilakukan dengan mengurangi muatan negatif molekul permukaan, mengurangi lapisan hidrasi di sekitar sel dan memperkenalkan makromolekul bermuatan positif yang mengagregasi sel (Fernandes *dkk.*, 2011; Stratton *dkk.*, 1973; Luner *dkk.*, 1975). Metode lain untuk meningkatkan aglutinasi adalah menurunkan *zeta potential* dengan meningkatkan konstanta dielektrik atau mengubah komposisi media dengan penambahan zat makromolekul seperti PEG, albumin, maupun dekstran. PEG merupakan senyawa larut dalam air, metanol, benzena, diklorometana, namun tidak larut dalam dietil eter dan heksana. PEG tidak mengubah sifat protein atau mencegah pendekatan oleh molekul kecil lainnya yang berarti bersifat non-antigenik dan non-imunogenik. Sifat ini membuat PEG banyak digunakan dalam bioteknologi dan biomedis (Fernandes *dkk.*, 2011).

PEG tidak menyebabkan penurunan aktivitas sel dan tidak beracun. PEG dalam air bertindak sebagai molekul dengan mobilitas tinggi. PEG mampu menghilangkan air dari permukaan sel darah merah, menurunkan *zeta potential* yang memperpendek jarak antar sel darah merah dan mempromosikan pengikatan antibodi dengan situs antigenik (Fernandes *dkk.*, 2011). Meski demikian, penggunaan PEG dalam konsentrasi tinggi dapat berpotensi menyebabkan hiperagregasi pada sel darah merah (Zhao *dkk.*, 2011). Hiperagregasi menyebabkan *rouleaux* pada sel darah merah. *Rouleaux* merupakan formasi sel darah merah yang saling berdekatan membentuk formasi linier (Gambar 7.). Antar kelompok sel darah merah dalam formasi

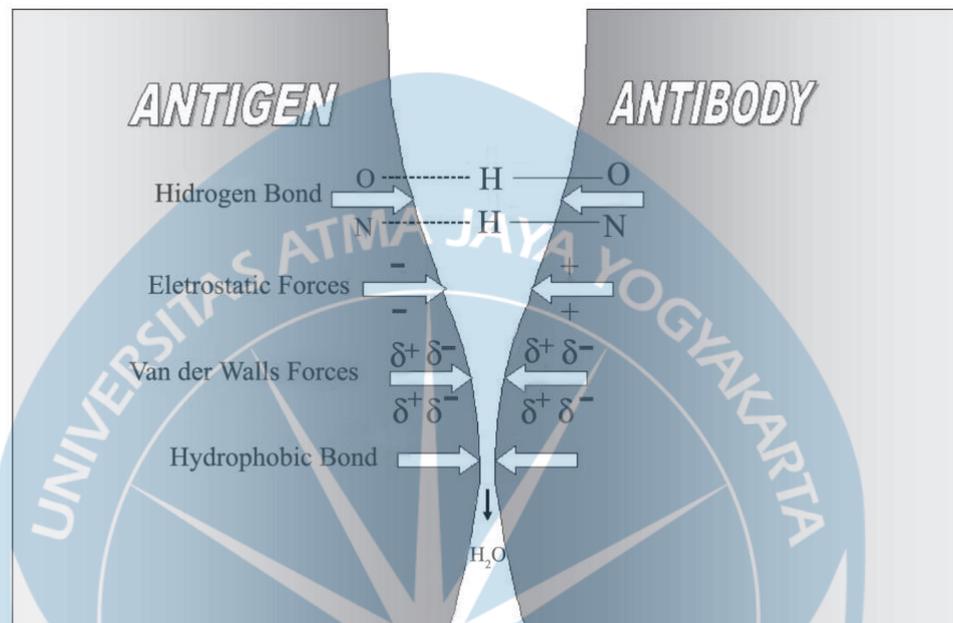
rouleaux dapat membentuk menjadi formasi penggumpalan (Barbalato dan Pillarisetty, 2024; Wagner dkk., 2013).



Gambar 7. Penampakan formasi linier (*rouleaux*) 7 sel darah merah (Sumber: Wagner dkk., 2013)

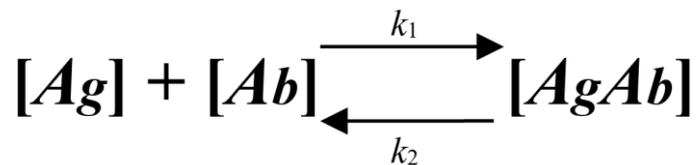
Beberapa laporan menyatakan bahwa PEG memiliki kemampuan dalam meningkatkan reaksi antigen-antibodi dengan adanya aglutinasi sel darah merah. Peningkatan kualitas aglutinasi sebesar 54% dengan penambahan PEG 0,05 mL dibandingkan *low ionic strength saline* (LISS) pada larutan serum 0,1 mL sel darah merah 3-4% 0.05 mL yang diinkubasi 37°C selama 15-30 menit (Weldy, 2014). Peningkatan reaksi antigen-antibodi menggunakan sampel 25 jenis antibodi yang diujikan dengan PEG 4000 20% (*w/v*), sebanyak 64% antibodi mengalami reaksi pengikatan antigen lebih kuat di dalam PEG (Nance dan Garratty, 1987). Penelitian serupa dilakukan kembali 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. PEG 6000 5% (*w/v*) juga menunjukkan kualitas

aglutinasi tertinggi yang diamati secara mikroskopis dibanding PEG 6000 1%, 2% dan 3% (Handriani dkk., 2021).



Gambar 8. Gaya yang terlibat dalam pengikatan antigen-antibodi. Gaya hidrofobik dan *van der waals* dapat terbentuk ketika antigen dan antibodi saling berdekatan. Interaksi elektrostatik dan ikatan hidrogen timbul tanpa mengharuskan antigen dan antibodi berdekatan (Sumber: Fernandes dkk., 2011)

Hydrophobic links adalah ikatan utama yang terbentuk antara antigen dan antibodi (Gambar 8.). Ketika dua kelompok hidrofobik (non polar) saling mendekati, kelompok tersebut berinteraksi dan mengeluarkan molekul air dari area interaksi. Reaksi tersebut bersifat endotermik sehingga terjadi lebih kuat pada suhu yang lebih tinggi. Kekuatan ikatan antara antigen dan antibodi diukur sebagai perubahan energi bebas. Reaksi antara antibodi (Ab) dan antigen (Ag) bersifat reversibel sesuai dengan hukum aksi massa (*law of mass actions*) yang dituliskan pada Gambar 9. (Fernandes dkk., 2011).

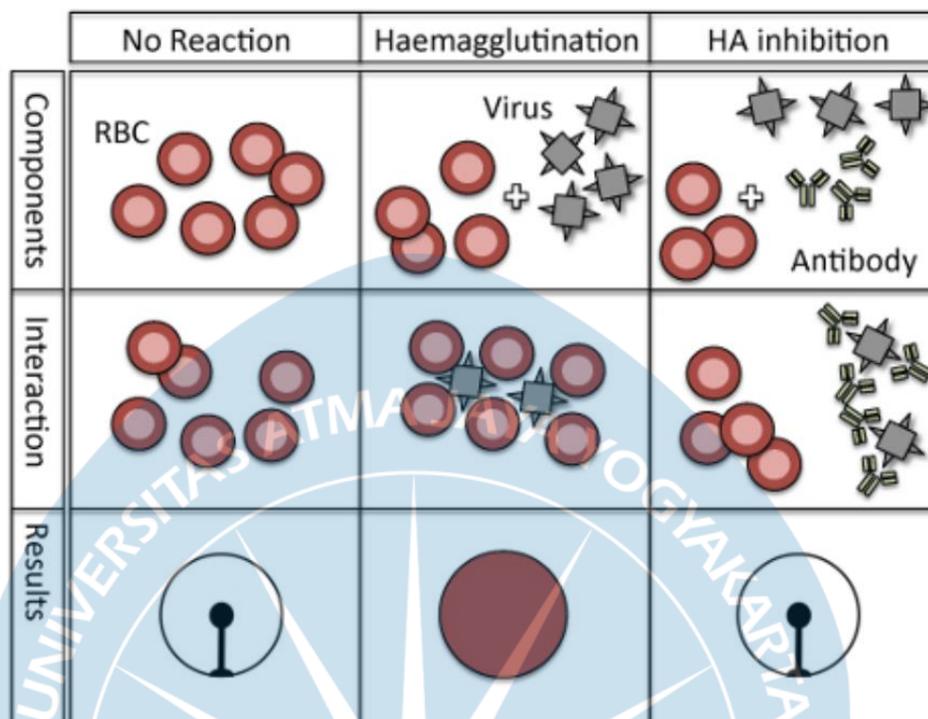


Gambar 9. k_1 dan k_2 adalah konstanta laju untuk reaksi maju, dan reaksi balik. $[Ag]$, $[Ab]$ dan $[AgAb]$ merupakan konsentrasi dari Ab , Ag dan produk kombinasi $AgAb$. K adalah konstanta keseimbangan (Sumber: Fernandes dkk., 2011)

G. Uji Hemaglutinasi

Hemagglutination Assay (HA) / HA Titration dilakukan untuk mengukur jumlah partikel virus yang diperlukan untuk hemaglutinasi (Gambar 10.). Pengukuran partikel virus dalam uji HA dicatat dalam bentuk nilai HAU. HAU didefinisikan sebagai jumlah virus yang dibutuhkan untuk mengaglutinasi volume yang sama dari standar suspensi sel darah merah (Kaufmann dkk., 2017). Hemaglutinasi dapat terlihat secara makroskopis yang juga untuk mendeteksi keberadaan partikel virus. Uji HA tidak membedakan partikel virus yang aktif menginfeksi maupun partikel virus yang tidak dapat menginfeksi sel. Keduanya dapat menyebabkan aglutinasi sel darah merah (Grimes, 2002).

Uji HA telah digunakan sejak *Landsteiner's classic observations* pada tahun 1901 untuk penentuan golongan darah, deteksi virus influenza, hingga deteksi antibodi atau antigen tertentu yang dikembangkan oleh Prof. Robin Coombs. Keunggulan uji HA yakni sederhana, murah, dapat dibaca dengan mata, dan tidak memerlukan teknologi canggih untuk aplikasinya (Townsend dkk., 2021).



Gambar 10. Prinsip hemaglutinasi dan uji penghambatan hemaglutinasi (kolom kiri) Tidak terjadi hemaglutinasi tanpa keberadaan virus dan antibodi; (kolom tengah) Hemaglutinasi pada sel darah merah dengan adanya virus influenza; (kolom kanan) Tidak terjadi hemaglutinasi pada sel darah merah karena hemaglutinin virus influenza diikat oleh antibodi (Sumber: Kaufmann dkk., 2017)

H. Hipotesis

1. Batas aman penggunaan PEG 4000 (% w/v) yang tidak menyebabkan hiperagregasi pada sel darah merah ayam dan mencit (BALB/c) adalah konsentrasi 5% (w/v).
2. Penambahan konsentrasi PEG 5% dalam batas aman tidak memberikan pengaruh terhadap uji hemaglutinasi virus ND terhadap sel darah merah ayam.

3. Desain kombinasi perlakuan yang akan paling memberikan pengaruh terhadap aktivitas hemaglutinasi sel darah merah mencit (BALB/c) dalam uji hemaglutinasi virus SARS-CoV-2 yaitu kombinasi praperlakuan *neuraminidase* 41 U/mL terhadap virus SARS-CoV-2, penambahan PEG (4000) konsentrasi akhir 33% (v/v), dan waktu inkubasi 37°C selama 60 menit dengan nilai titer tertinggi.

