

Rasio Cycle Threshold (Ct) Internal Control (Ic)/Ct Gen N Sars-Cov-2 dan Ekspresi Gen N Sars-Cov-2 Berhubungan dengan Tingkat Keparahan Pasien Covid-19

Gibran Bramasta Dirgavansya*, Umar Islami, Lelly Yuniarti

Prodi Pendidikan Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Bandung, Indonesia.

*gibran.bd@gmail.com, umarislami@gmail.com, lely.yuniarti@gmail.com

Abstract. Introduction: COVID-19 is a disease caused by a virus called SARS-CoV-2, COVID-19 cases in Indonesia reached 4.2 million in October 2021. The standard for diagnosis of COVID-19 is RT-PCR because of its high specificity and sensitivity, RT-PCR produces a CT value that can describe the amount of nucleic acid and viral load of SARS-CoV-2. This study aims to analyze the relationship between the expression of SARS-CoV-2 gene N and the ratio of CT internal control/CT gene N SARS-CoV-2 with the severity of illness in COVID-19 patients. Methods: This study was an observational study with a cross-sectional approach to inpatients at Cideres Majalengka Hospital, the data was taken in the form of medical records and the results of the RT-PCR examination were CT values. The expression of the SARS-CoV-2 N gene was calculated using the saliva formula (Formula $2^{-\Delta\Delta CT}$), while the ratio was obtained by comparing the CT values internal control /CT gene N SARS-CoV-2. The relationship of gene expression and CT ratio with severity was analyzed using the correlation test Spearman at a 95% confidence level. Results: The correlation test Spearman showed a relationship between the expression of SARS-CoV-2 Gene N ($r=0.31$; $p=0.015$) and the ratio of CT internal control/CT gene N SARS-CoV-2 ($r= 0.28$; $p = 0.03$) with the severity of COVID-19 patients. Severity is classified according to the COVID-19 Management Guidelines into mild, moderate, severe, critical. Conclusion: The conclusion of this study is that there is a relationship between the expression of SARS-CoV-2 gene N and the ratio of CT internal control/CT gene N SARS-CoV-2 with the severity of COVID-19 patients, the greater the gene expression ratio value, the severity of the patient Heavier. The ratio of CT internal control /CT gene N SARS-CoV-2 and high gene expression indicate a high viral load that can increase the severity of the patient.

Keywords: COVID-19, SARS-Cov-2 N Gene, CT IC/CT Ratio SARS-Cov-2 N Gene, Disease Severity.

Abstrak. Pendahuluan: COVID-19 adalah penyakit yang diakibatkan oleh virus bernama SARS-CoV-2, kasus COVID-19 di Indonesia mencapai 4,2 juta pada Oktober 2021. Standar baku diagnosis COVID-19 adalah RT-PCR karena spesifisitas dan sensitivitasnya tinggi, RT-PCR menghasilkan *CT value* yang dapat menggambarkan jumlah asam nukleat dan *viral load* SARS-CoV-2. Penelitian ini bertujuan menganalisis hubungan ekspresi gen N SARS-CoV-2 dan rasio CT *internal control*/CT gen N SARS-CoV-2 dengan tingkat keparahan penyakit pasien COVID-19. Metode: Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan pendekatan potong lintang pada pasien rawat inap RSUD Cideres Majalengka, data diambil berupa rekam medik dan hasil pemeriksaan RT-PCR berupa CT *value*. Ekspresi gen N SARS-CoV-2 dihitung menggunakan rumus Livak (Rumus $2^{-\Delta\Delta CT}$), sementara rasio didapatkan dengan membandingkan nilai CT *internal control*/CT gen N SARS-CoV-2. Hubungan dari ekspresi gen dan rasio CT dengan tingkat keparahan dianalisa dengan menggunakan uji korelasi *spearman* pada tingkat kepercayaan 95%. Hasil: Uji korelasi *spearman* menunjukkan adanya hubungan antara ekspresi gen N SARS-CoV-2 ($r=0,31$; $p=0,015$) dan rasio CT *internal control*/CT gen N SARS-CoV-2 ($r= 0,28$; $p=0,03$) dengan tingkat keparahan pasien COVID-19. Tingkat keparahan diklasifikasikan berdasar Pedoman Tatalaksana COVID-19 menjadi ringan, sedang, berat, kritis. Kesimpulan: Kesimpulan dari penelitian ini adalah terdapat hubungan antara ekspresi gen N SARS-CoV-2 dan rasio CT *internal control*/CT gen N SARS-CoV-2 dengan tingkat keparahan pasien COVID-19, semakin besar nilai ekspresi gen rasio maka tingkat keparahan pasien semakin berat. Rasio CT *internal control*/CT gen N SARS-CoV-2 dan ekspresi gen yang tinggi menunjukkan viral load yang tinggi sehingga dapat meningkatkan tingkat keparahan pasien.

Kata Kunci: COVID-19, Gen N SARS-CoV-2, Rasio CT IC/CT Gen N SARS-CoV-2, Tingkat keparahan.

A. Pendahuluan

Pada akhir Desember 2019 tepatnya pada 31 Desember 2019 rumah sakit di Wuhan, Hubei, Cina melaporkan kasus pneumonia yang tidak diketahui penyebabnya, setelah dilakukan penelitian ditemukan penyebabnya adalah suatu jenis coronavirus baru yang disebut dengan SARS-CoV-2.¹ Virus ini dapat ditransmisikan antar manusia melewati batuk, bersin dan *droplet*, sehingga dapat menyebar secara luas dengan cepat.²⁻⁴

World Health Organization menyatakan Corona virus disease 2019 (COVID-19) sebagai pandemik pada 11 Maret 2020. Satgas COVID di Indonesia menyatakan bahwa pada bulan Oktober 2021 di Indonesia kasus COVID-19 mencapai 4,2 juta di seluruh Indonesia, 704 ribu kasus di Jawa Barat, dengan jumlah 142.993 kematian di seluruh Indonesia.⁵ Kabupaten Majalengka memiliki beberapa zona merah dan terdapat 11.628 kasus terkonfirmasi COVID-19 dengan 843 kasus kematian.⁶

Pasien COVID-19 dapat mengalami banyak gejala, mulai dari gejala ringan seperti infeksi pernapasan atas dan gejala gastrointestinal, demam, rasa letih, produksi sputum, batuk, sesak napas, dan sakit kepala. Gejala ini dapat berkembang menjadi *acute respiratory distress syndrome* (ARDS), *acute cardiac injury*, *acute kidney injury*, dan *shock*.⁷ Penyebab utama mortalitas COVID adalah *respiratory failure*, sepsis atau *multi-organ failure*, *cardiac failure*, dan *renal failure*.^{7,8} Berdasar atas klasifikasi Pedoman Tata Laksana COVID-19 Indonesia tingkat keparahan penyakit COVID-19 dibagi menjadi lima, yaitu tidak bergejala, ringan, sedang, berat, dan kritis.⁹

Virus penyebab COVID-19, SARS-CoV-2 memiliki empat protein struktural yaitu *spike* (S), *envelope* (E), *membrane* (M), dan *nucleus* (N). Salah satu gen, yaitu gen S pada SARS-CoV-2 mempunyai *reseptor binding domain* memediasi kontak langsung dengan reseptor seluler, *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) yang banyak terdapat di paru.^{10,11} *Downregulation* ekspresi reseptor ACE2 menyebabkan produksi AT2 dapat meningkat akibat produksi enzim ACE1 dan penurunan angiotensin-(1-7). Peningkatan AT2 akan mengakibatkan peningkatan permeabilitas vaskular pulmoner yang dapat menyebabkan kerusakan paru. SARS-CoV-2 juga mempunyai *antigen-presenting cells* (APC) yang dapat berikatan dengan sel-sel dendritik sebuah *host* sehingga dapat mengaktifkan makrofag, menyebabkan reaksi imunologis berat.¹⁰⁻¹²

Real time quantitative PCR (RT-PCR) adalah metode yang digunakan sebagai *gold standard* deteksi SARS-CoV-2 yang bersifat spesifik, sensitif, dan kuantitatif.¹³⁻¹⁵ Tingkat ekspresi gen SARS-CoV-2 hasil pemeriksaan RT-PCR dapat memprediksi *viral load* yang terdapat pada pasien terinfeksi SARS-CoV-2. *Viral load* yang tinggi dapat memengaruhi manifestasi klinis dan mortalitas pasien COVID-19. Data tingkat ekspresi gen dapat diperoleh dengan membandingkan CT *Internal control* sebagai *house keeping gene* (standar) dengan CT gen SARS-CoV-2. Salah satu gen yang sering digunakan sebagai target RT-PCR adalah gen N yang merupakan gen yang terekspresi pada nukleus.^{16,17}

Gen N adalah salah satu gen SARS-CoV-2 yang terekspresi di nukleus virus sehingga gen ini lebih sensitif mendeteksi SARS-CoV-2. Selain itu, *gen N* juga salah satu gen yang paling sering digunakan sebagai target RT-PCR sehingga sampel yang diambil dapat lebih mudah didapatkan. Hasil RT-PCR yang menggambarkan *viral load* diperkirakan dapat memprediksi prognosis pasien sehingga perlu dicari hubungan antara hasil dari tes RT-PCR dengan tingkat keparahan penyakit untuk memprediksikan tingkat keparahan penyakit agar dapat mengurangi risiko fatalitas pada pasien COVID-19.^{9,11,13} Tujuan penelitian ini adalah menganalisis tingkat ekspresi gen N SARS-CoV-2 dan rasio CT IC/CT gen N SARS-CoV-2 dengan tingkat keparahan penyakit pasien.

B. Metodologi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional* untuk mencari hubungan tingkat ekspresi *gen N SARS-CoV-2* dan rasio CT IC/CT *gen N SARS-CoV-2* dengan tingkat keparahan penyakit pasien COVID-19. Penelitian ini dilakukan di RSUD Cideres Majalengka Majalengka pada bulan Februari sampai bulan April.

Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah pasien terkonfirmasi positif COVID-19 di instalasi rawat inap Rumah Sakit Umum Daerah Cideres, bahan penelitian berasal dari data sekunder berupa hasil *CT value* dan manifestasi klinis pasien yang diambil dari rekam medik dan hasil lab pasien terkonfirmasi COVID-19. Data *CT value* didapat dari data laboratorium, sedangkan tingkat keparahan pasien diklasifikasikan berdasar atas Pedoman Tatalaksana COVID-19.⁹ Sampel diambil dari rekam medik pasien yang sesuai dengan kriteria inklusi dan tidak termasuk eksklusi. Kriteria Inklusi penelitian ini adalah pasien terkonfirmasi positif COVID-19 yang dirawat di instalasi rawat inap RSUD Cideres Majalengka dengan usia pasien 18–65 tahun. Kriteria eksklusi pasien Covid-19 yang memiliki riwayat penyakit komorbid (diabetes melitus, penyakit paru, gagal jantung, gagal ginjal), data rekam medik yang tidak lengkap dan data terlalu tinggi atau terlalu rendah.

Penghitungan Tingkat Ekspresi *Gen N SARS-CoV-2*

Tingkat ekspresi *gen N SARS-CoV-2* dinilai dengan menghitung kuantifikasi relatif dengan membandingkan ekspresi *gen N* dengan ekspresi *gen internal control*. (Rumus $2^{-\Delta\Delta CT}$).¹⁸ Kontrol yang digunakan sebagai pembanding adalah pasien terkonfirmasi positif yang tidak bergejala.

Penghitungan Rasio CT IC/CT *Gen N SARS-CoV-2*

Rasio diukur dengan membandingkan CT IC dengan CT *gen N SARS-CoV-2*.

Uji Statistik

Untuk menilai hubungan antara ekspresi *gen N* dan tingkat keparahan penyakit secara statistik menggunakan *Spearman correlation* pada tingkat kepercayaan 95%. Program yang digunakan untuk analisis data adalah *Prism 9*.

Ethical Clearance

Penelitian ini telah mendapat izin etik dengan Nomor 034/KEPK-Unisba/V/2021 dan telah menuruti aturan Deklarasi Helsinki. Sebelum melakukan pengumpulan data, peneliti mengurus perizinan terlebih dahulu dengan membuat surat pengantar permohonan izin dari Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung untuk melakukan penelitian yang diajukan kepada Kepala Rumah Sakit Umum Daerah Cideres Provinsi Jawa Barat dan bagian rekam medik Rumah Sakit Umum Daerah Cideres Provinsi Jawa Barat.

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Jumlah pasien yang didapatkan dari RSUD Cideres Majalengka Majalengka adalah 293 pasien, namun untuk pengujian hasil pasien yang terseleksi sesuai dengan kriteria inklusi dan tidak termasuk kriteria eksklusi adalah 57 sampel. Korelasi ekspresi *gen N SARS-CoV-2* dengan tingkat keparahan pasien COVID-19 diuji dengan menggunakan uji korelasi *Spearman* pada tingkat kepercayaan 95%, hasil uji tersaji pada Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan korelasi tingkat ekspresi *gen N SARS-CoV-2* dengan tingkat keparahan pasien COVID-19 (nilai $r=0,320$ dan $p=0,015$). Sementara korelasi rasio CT dengan tingkat keparahan pasien COVID-19 diuji dengan menggunakan uji korelasi *spearman* pada tingkat kepercayaan 95%, hasil uji tersaji pada Tabel 2. Tabel 2 menunjukkan adanya korelasi rasio CT dengan tingkat keparahan pasien COVID-19 (nilai $r=0,28$ dan $p=0,03$).

Tabel 1. Tabel Korelasi Tingkat Ekspresi *Gen N SARS-CoV-2* dengan Tingkat Keparahan Pasien COVID-19.

			Gen N	Tingkat Keparahan
Spearman's rho	Gen N	Koefisien Korelasi	1	0,319
		p	0,015	0,015
		N	57	57
	Tingkat Keparahan	Koefisien Korelasi	0,319	1
		p	0,015	0,015
		N	57	57

Tabel 2. Korelasi Rasio CT *Internal control* (IC)/ CT *Gen N SARS-CoV-2* dengan Tingkat Keparahan Pasien COVID-19.

			Rasio IC/Gen N	Tingkat Keparahan
Spearman's rho	Rasio IC/Gen N	Koefisien Korelasi	1	0,287
		p	0,03	0,03
		N	57	57
	Tingkat Keparahan	Koefisien Korelasi	0,287	1
		p	0,03	0,03
		N	57	57

Penelitian ini menunjukkan terdapat hubungan nilai ekspresi *gen N SARS-CoV-2* dan rasio CT IC/CT *gen N* dengan tingkat keparahan. Koefisien korelasi masing-masing adalah $r=0,320$ ($p=0,015$) dan $r=0,28$ ($p=0,03$). Hasil ini menunjukkan pasien yang memiliki nilai tingkat ekspresi *gen N SARS-CoV-2* dan rasio CT lebih tinggi memiliki derajat penyakit lebih parah. *Cycle threshold values* (CT value) RT-PCR menentukan jumlah salinan RNA SARS-CoV-2 pada sebuah spesimen. CT value juga secara tidak langsung dapat menggambarkan *viral load*.^{13,19}

Viral load yang tinggi dapat menyebabkan kondisi RNAemia. Hogan dkk.²⁰ Menemukan bahwa pasien yang masuk ke ICU membutuhkan ventilasi mekanis dan meninggal memiliki kondisi RNAemia pada pemeriksaan laboratoriumnya. Penelitian lain menunjukkan RNAemia ditemukan pada 56% pasien ICU COVID-19 yang tidak selamat, data ini menunjukkan RNAemia berhubungan dengan mortalitas. *Viral load* yang tinggi dapat menimbulkan kerusakan sel dan menyebabkan perburukan pasien menjadi lebih parah.^{20,21} Berdasarkan penelitian Ali dkk.²² CT Value dapat memprediksikan durasi lama rawat pasien. Pasien dengan nilai CT value yang tinggi memiliki durasi lama rawat lebih sebentar daripada pasien dengan CT value rendah.²²

Penelitian oleh Choudhuri dkk.²³ menyatakan bahwa nilai *CT value* berhubungan dengan mortalitas pasien COVID-19. Pasien dengan *viral load* tinggi mempunyai risiko komplikasi *acute kidney injury* lebih tinggi. Penelitian lain menunjukkan pasien dengan *CT value* rendah memiliki *glomerulus filtration rate* (GFR) yang lebih buruk.²³ Zhao dkk.²⁴ mengemukakan hubungan *CT value* dengan kematian dan manifestasi klinis yang menyebabkan kematian seperti pneumonia dan ARDS yang pada akhirnya mengakibatkan pasien harus masuk ke ruang *Intensive Care Unit* (ICU). Nilai tingkat ekspresi *gen N SARS-CoV-2* dan rasio *CT IC/CT gen N* dapat dijadikan prediktor tingkat keparahan penyakit pasien. Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan seperti penelitian dilaksanakan dengan cara *cross sectional*, data *CT value* diambil dari data laboratorium bukan dilakukan oleh peneliti sehingga bias pemeriksaan laboratorium tidak dapat dihindari. Selain itu pemeriksaan RT-PCR hanya dilakukan sekali pengambilan sehingga tidak dapat dilihat perjalanan penyakitnya. Penelitian selanjutnya yang serupa dapat menggunakan jenis penelitian *case control* ataupun cohort. Selain itu, pemeriksaan PCR dilakukan langsung peneliti agar nilai *CT* yang dihasilkan dapat lebih akurat, dan pengambilan sampel dilakukan berulang dalam jeda waktu tertentu sehingga perjalanan penyakit dapat dinilai.

D. Kesimpulan

Terdapat hubungan antara rasio *CT internal control/CT gen N SARS-CoV-2* dengan tingkat keparahan pasien COVID-19 yang dirawat inap. Selain itu, terdapat hubungan antara tingkat ekspresi *gen N SARS-CoV-2* dengan tingkat keparahan penyakit pada pasien COVID-19 yang dirawat inap di RSUD Cideres Majalengka, semakin besar tingkat ekspresi dan nilai rasio *CT* pasien maka semakin parah tingkat keparahan penyakit pasien.

Acknowledge

Penelitian ini terselenggara berkat dukungan Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Islam Bandung (kontrak hibah PDU nomor 100/B.04/LPPM/XII/2020). Serta dengan kerjasama RSUD Cideres Majalengka.

Daftar Pustaka

- [1] Jiang F, Deng L, Zhang L, Cai Y, Cheung CW, Xia Z. Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J Gen Intern Med*. 2020;35(5):1545–9.
- [2] Long C, Xu H, Shen Q, Zhang X, Fan B, Wang C, dkk. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *European Journal of Radiology*:2020;126:
- [3] Tfi MR, Hamblin MR, Rezaei N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clin Chim Acta*. 2020;508:254–66.
- [4] Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal*. 2020;10(2):102–8.
- [5] Peta Sebaran | Satgas Penanganan COVID-19. Tersedia pada: <https://covid19.go.id/peta-sebaran/>
- [6] COVID19 Kabupaten Majalengka. dikutip 4 November 2021. Tersedia pada: <https://covid19.majalengkakab.go.id/>
- [7] Fu L, Wang B, Yuan T, Chen X, Ao Y, Fitzpatrick T, dkk. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2020;80(6):656–65.
- [8] Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*. 2020;34.
- [9] Burhan E, Dwi Susanto A, Isbaniah F, Aman Nasution S, Ginanjar E, Wicaksono Pitoyo C, et al. Pedomatan Tatalaksana COVID-19 Edisi 3. 2020.
- [10] Samudrala PK, Chandrasekaran B, Fernandes S. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. *Diabetes Metab Syndr*. 2020;14(4):337–9.

- [11] Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission & pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100–15.
- [12] South AM, Brady TM, Flynn JT. ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2), COVID-19, and ACE Inhibitor and Ang II (angiotensin II) receptor blocker use during the pandemic: The Pediatric Perspective. *Hypertension.* 2020;76(1):16–22.
- [13] Alsuliman T, Sulaiman R, Ismail S, Srouf M, Alrstom A. COVID-19 paraclinical diagnostic tools: Updates and future trends. 2020: *Translational Medicine.* 2020;68:83-91.
- [14] Liu X, Liu C, Liu G, Luo W, Xia N. COVID-19: progress in diagnostics, therapy and vaccination. *Theranostics.* 2020;10(17):7821–35.
- [15] Tang Y, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *J Clin Microbiol.* 2020;58(6):1–9.
- [16] Westblade LF, Brar G, Pinheiro LC, Paidoussis D, Rajan M, Martin P,dkk. SARS-CoV-2 viral load predicts mortality in patients with and without cancer who are hospitalized with COVID-19. *Cancer Cell.* 2020;38(5):661-71.e2.
- [17] Cho RHW, To ZWH, Yeung ZWC, Tso EYK, Fung KSC, Chau SKY,dkk. COVID-19 Viral load in the severity of and recovery from olfactory and gustatory dysfunction. *Laryngoscope.* 2020;130(11):2680–5.
- [18] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. Vol. 2015-June, *IEEE International Symposium on Information Theory - Proceedings.* 2001. hal. 2436–40.
- [19] Han MS, Byun JH, Cho Y, Rim JH. RT-PCR for SARS-CoV-2: quantitative versus qualitative. *Lancet Infect Dis.* 2020;21(2):165.
- [20] Hogan CA, Stevens BA, Sahoo MK, Huang CH, Garamani N, Gombar S,dkk. High frequency of SARS-CoV-2 RNAemia and association with severe disease. *Clin Infect Dis.* 2021;72(9):e291–5.
- [21] Gutmann C, Takov K, Burnap SA, Singh B, Ali H, Theofilatos K, et al. SARS-CoV-2 RNAemia and proteomic trajectories inform prognostication in COVID-19 patients admitted to intensive care. *Nat Commun.* 2021;12(1).
- [22] Ali S Al, Abdulrahman A, Yaghi O, Janahi EM, Al- M. SARS-Cov-2 viral load as an indicator for COVID-19 patients' hospital stay. *J Bahrain Med Soc.* 2021;33(2):1–13.
- [23] Choudhuri J, Carter J, Nelson R, Skalina K, Osterbur-Badhey M, Johnston A,dkk. SARS-CoV-2 PCR cycle threshold at hospital admission associated with patient mortality. *PLoS One.* 2020;15:1–14.
- [24] Zhao Y, Cunningham MH, Mediavilla JR, Park S, Fitzgerald S, Ahn HS,dkk. Diagnosis, clinical characteristics, and outcomes of COVID-19 patients from a large healthcare system in northern New Jersey. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–8.