

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pertama kali muncul di China kemudian ditularkan secara sporadis di seluruh dunia. SARS-CoV-2 pertama kali diisolasi dari cairan *bronchoalveolar lavage* (BALF) pada tiga pasien COVID-19 yang berada di Rumah Sakit Wuhan Jinyintan pada tanggal 30 Desember 2019 (Zhu *et al*, 2020). Pada Maret 2020, WHO mengumumkan bahwa infeksi virus korona ini telah menjadi wabah pandemi. Wabah dan penularan COVID-19 yang sangat cepat ini telah membahayakan kesehatan terutama bagi manusia dan mempengaruhi ekonomi secara global (Nidom R *et al*, 2020).

Analisis filogenetik seluruh genom menunjukkan bahwa SARS-CoV-2 memiliki kesamaan struktur dalam urutan nukleotida yaitu sekitar 79,5% terhadap SARS-CoV dan 50% terhadap MERS-CoV (Lu *et al*, 2020). Selain itu, sekitar 94,6% terdapat kemiripan struktur dalam urutan nukleotida antara ketujuh domain replicase di ORF1ab SARS-CoV-2 dan SARS-CoV, dan kurang dari 90% struktur urutan nukleotida antara SARS-CoV-2 dan β -CoV lainnya, hal ini menyiratkan bahwa SARS-CoV-2 termasuk dalam garis keturunan B (*Sarbecovirus*) dari β -CoVs (Wu *et al*, 2020).

Hewan dan manusia dapat terinfeksi oleh virus korona. SARS-CoV-2 Virus ini termasuk famili *Coronaviridae* yang terbagi menjadi dua subfamili yaitu *orthocoronavirinae* dan *torovirinae*. Berdasarkan analisa filogenetik dan kajian serologis *orthocoronavirinae* terdiri dari empat jenis genera yaitu *Deltacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Betacoronavirus*, dan *Alphacoronavirus* (Joseph & Fagbami,

2020). *Alphacoronavirus* dan *Betacoronavirus* dapat menginfeksi hewan dan manusia, sedangkan *Deltacoronavirus* dan *Gammacoronavirus* hanya menginfeksi hewan (Nidom *et al*, 2020). Genom SARS-CoV-2 adalah RNA rantai tunggal *positive sense* yang tersusun dari sekitar 30.000 nukleotida. Genom ini mengkode empat struktur protein yaitu protein membran (M), amplop (E), nukleokapsid (N), dan spike (S) (Harapan *et al*, 2020).

Saat ini, database nukleotida pada GISAID EpiCoV™ telah ditemukan tujuh sub tipe SARS-CoV-2 yaitu S, L, V, G, GR, GH, dan O. Menariknya, semua isolat Indonesia tergolong dalam Klade L kecuali EJ-ITD3590NT (GH) dan JKT-EIJK2444 (O). Virus RNA ini memiliki kecenderungan mutasi yang jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya (Normalina *et al*, 2020). Tingkat mutasi yang tinggi menyebabkan meningkatnya dinamika virus termasuk virulensi dan kemampuan evolusi adaptif yang lebih besar terhadap kondisi lingkungan. Kemampuan ini menyebabkan meningkatnya peluang untuk menginfeksi inang yang lain sehingga virus bisa bersifat zoonosis dan terjadi penularan dari manusia ke manusia, serta memungkinkan virus ini berubah menjadi lebih ganas (Duffy, 2018). Krisis pandemi ini membutuhkan mobilisasi studi ilmiah yang ekstensif mengenai SARS-CoV-2. Pengembangan penelitian terkait aspek klinis, karakteristik, dan mekanisme penularannya sangat penting untuk dilakukan saat ini. Meskipun banyak ilmuwan yang telah menerbitkan beberapa pilihan pengobatan untuk melawan wabah COVID-19, namun sampai saat ini belum terdapat obat yang diketahui secara pasti ampuh dalam melawan Virus Corona tersebut. Upaya pengembangan vaksin COVID-19 telah dimulai di banyak pusat penelitian dan industri farmasi, menyusul setelah

dilakukan identifikasi terhadap agen penyebab infeksi serta genom lengkap dari virus SARS-CoV-2 (Nidom R. *et.al*, 2020).

Saat ini berdasarkan data yang tersedia, terdapat 158 kandidat vaksin SARS-CoV-2 di seluruh dunia, 135 kandidat dalam tahap investigasi pengembangan atau di fase praklinis (Dharma *et al*, 2020). Proses vaksinasi diawali pada penentuan antigen yang sesuai untuk pencegahan yang diikuti formulasi pada tahap berikutnya. Penentuan antigen vaksin, akan disesuaikan dengan karakter antigen dan modulasi sistem antibodi yang akan ditimbulkan. Proses dari hulu ke hilir, harus mengikuti ketentuan regulasi nasional dan internasional, termasuk ketentuan proses halal agar umat muslim dapat menerima vaksin yang akan digunakan (Artois *et al.*, 2018 ; McIntosh, 2018).

Selain itu, tataran kehalalan telah menjadi perhatian tersendiri, mengingat pengguna vaksin sepertiga penduduk dunia beragama Islam. Beberapa vaksin menggunakan enzim berbasis-*porcine* dalam produksinya, menimbulkan kekhawatiran akan "halal" dari vaksin-vaksin tersebut. Namun, terlepas dari fakta bahwa enzim ini digunakan dalam beberapa proses pembuatan vaksin, Komisi Fatwa Agama Islam telah mengizinkan penggunaan vaksin ini (Abdullah, 2014).

Keputusan ini didasarkan pada beberapa prinsip dalam hukum Islam terkait dalam membedah isu tersebut. Pada "halal" dari produk vaksin itu sendiri, konsepnya bahwa "jumlah yang kecil" enzim ditambahkan ke jumlah yang besar, ini, sejalan dengan konsep "suci" atau "unsur murni" dalam Islam. Kedua, penghapusan enzim yang digunakan dalam produksi akhir juga sejajar dengan konsep "kebersihan dan elemen murni" dalam Islam, sehingga membuat produk akhir sebagai "tidak

mengandung" unsur-unsur "non-halal" melalui prinsip dari tampilan, bau dan rasa. Akhirnya, berdasarkan kebutuhan penting menggunakan vaksin dalam pencegahan penyakit dalam situasi di mana kita tidak memiliki alternatif "murni halal" lainnya, ulama Islam telah memutuskan bahwa penggunaan vaksin ini dapat diizinkan sesuai dengan keputusan berdasarkan konsep "dharurah" atau situasi darurat. Namun ada beberapa perbedaan pendapat mengenai hal ini, bahwa para ulama yang lebih ketat tidak dapat menerima "hukum" baru ini berdasarkan "ijma" atau "perjanjian" para sarjana, khususnya dalam kaitannya dengan konsep "halal" (Abdullah, 2014).

SARS-CoV-2 saat ini telah menjadi fokus minat penelitian meliputi bidang biologi molekuler, mekanisme masuknya virus ke dalam sel (*entry cell*), diagnostik, pemodelan epidemiologi, imunologi, terapi eksperimental, dan pengembangan vaksin, pengobatan klinis, prediksi, *xenophobia*, dan efek psikologis dari pandemi (Jin *et al*, 2020). Hal ini juga telah memperbarui minat umum untuk mempelajari virus corona secara biologi dan ekologi. Lingkungan akuatik dapat menjadi sumber mikroorganisme patogen yang tak terhitung jumlahnya untuk hewan air dan darat yang berbeda, serta manusia (Oidtmann *et al*, 2018). Danau dan sungai merupakan habitat penting bagi kelelawar dan burung (termasuk unggas air), yang merupakan salah satu sumber utama untuk berbagai virus corona. Telah diketahui bahwa hewan-hewan ini dapat melepaskan RNA virus corona melalui kotoran, walaupun hal ini masih harus diteliti kembali apakah ini terkait dengan keberadaan partikel virus yang menular (Milek *et al*, 2018).

Namun demikian, sangat menarik untuk meneliti hubungan antara lingkungan perairan dan kelompok virus ini. Selain itu, perlu diupayakan hewan coba selain

hewan mamalia, sebagai alternatif untuk digunakan sebagai hewan coba. Salah satu hewan dari lingkungan perairan yang banyak digunakan sebagai hewan model dalam berbagai penelitian terkait penyakit infeksi maupun berbagai alternatif terapi pengobatannya adalah dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*). Saat ini, pengembangan virus SARS-CoV-2 yang banyak dilakukan adalah dengan menggunakan media kultur sel vero. Sebagaimana diketahui bahwa sel vero merupakan sel yang berasal dari ginjal monyet dan bersifat non-halal. Salah satu media pertumbuhan virus yang diharapkan dapat digunakan sebagai basis kehalalan adalah ikan zebra (*Danio rerio*).

Ikan zebra adalah organisme kecil dan serbaguna yang sangat mudah untuk ditangani dan mekanisme pensinyalannya. Interaksi dengan perubahan kimiawi, dan komunikasi antara inang dengan virus pada jaringan mukosa dapat digunakan untuk analisis secara detail. Ikan zebra telah menjadi hewan model pilihan untuk mempelajari berbagai penyakit manusia termasuk yang disebabkan oleh virus, selain itu dapat digunakan sebagai hewan model untuk menemukan alternatif obat baru dan untuk peninjauan kembali fungsi obat yang sudah ada (Galindo & Villegas, 2020). Ikan zebra diketahui memiliki sistem kekebalan bawaan (*Innate*) dan adaptif yang terdefinisi dengan baik serta memiliki beberapa kesamaan dengan sistem imun yang ada pada manusia (Varela *et al*, 2017).

Meskipun manusia lebih dekat hubungannya dengan mamalia lain daripada ikan, namun ikan zebra dapat membantu mempercepat penelitian tentang mekanisme kesehatan dan penyakit vertebrata. Embrio dan larva ikan zebra dapat diakses dengan mudah, dikembangkan dalam sebuah wadah dan menguntungkan secara optik,

sehingga mekanisme penyakit dapat divisualisasikan melalui pencitraan fluoresen transgenik dari organ yang berfungsi pada hewan hidup misalnya pada ikan zebra transgenik yang mengekspresikan GFP dalam sel TNFA positif dan mCherry dalam neutrophil memungkinkan visualisasi komponen 'badai sitokin' yang dapat menyebabkan kematian pada manusia (pasien dewasa) COVID-19 dan sindrom inflamasi multisistem yang mempengaruhi infeksi SARS-CoV-2 pada anak-anak. Ikan zebra memiliki vertebrata, organ dan sistem organ tertentu yang mirip pada manusia dan mereka berkembang serta berfungsi dengan mekanisme yang serupa pada manusia. Selain itu, ukurannya yang kecil membuat ikan zebra cocok untuk menyaring molekul terapeutik dalam skala yang tidak dimungkinkan pada mamalia (Zhang *et al*, 2020).

Sama halnya dengan virus corona lainnya, SARS-CoV-2 perlu pemrosesan proteolitik dari protein S untuk mengaktifkan rute endositik. Telah terbukti bahwa protease inang berpartisipasi dalam pembelahan protein S dan membantu masuknya SARS-CoV-2, termasuk *transmembrane protease serine protease 2* (TMPRSS2), cathepsin L dan furin. Data sekuensing RNA sel tunggal menunjukkan bahwa TMPRSS2 banyak diekspresikan di beberapa jaringan dan tubuh dan diekspresikan bersama dengan ACE2 di sel epitel hidung, paru-paru dan cabang bronkial (Lukassen *et al*, 2020).

Ikatan reseptor yang diekspresikan oleh sel inang adalah langkah pertama infeksi virus yang kemudian diikuti oleh fusi dengan membran sel, dalam hal ini bahwa sel epitel paru adalah target utama dari virus ini. Telah dilaporkan bahwa penularan SARS-CoV dari manusia ke manusia terjadi oleh ikatan antara domain

reseptor virus protein spike dan reseptor seluler yang telah diidentifikasi sebagai reseptor *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2). Data ini menunjukkan bahwa masuknya virus SARS CoV-2 ke dalam sel inang kemungkinan besar melalui reseptor ACE2 (Jaimes *et al*, 2020).

Genom ikan zebra berisi ortolog gen yang mengkode ACE2, sebagaimana diketahui bahwa ACE2 merupakan reseptor dari SARS-CoV-2. Namun, konservasi sederhana asam amino pada permukaan ikatan protein ACE2 ikan tidak mungkin mengikat protein spike virus secara efisien (Damas *et al*, 2020). Terlepas dari prediksi *in silico* ini, kerentanan inang memerlukan validasi eksperimental terutama mengingat bahwa banyak reseptor dan koreseptor lain untuk SARS-CoV-2 telah diidentifikasi (Zamorano Cuervo & Grandvaux, 2020). Dalam larva ikan zebra, berdasarkan sel tunggal transkriptomik, ACE2 sangat diekspresikan dalam sub tipe enterosit, sejalan dengan hal tersebut telah dilaporkan bahwa usus juga merupakan organ dengan ekspresi ACE2 terkuat pada manusia (Postlethwait *et al*, 2020).

Pada penelitian terdahulu melalui sel kultur (*primary cell culture*) Ikan Zebra, telah berhasil mengembangkan pertumbuhan virus H5N1 *reverse genetic* sebagai kandidat seed vaksin H5N1 (Muhammad *et al*, 2020).

Berdasarkan Uraian fakta di atas, dirasa perlu melakukan penelitian alternatif pengembangan virus SARS-CoV-2 dengan menggunakan Ikan Zebra (*Danio rerio*). Penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu upaya sebagai basis untuk mengembangkan cara baru dalam memproduksi vaksin halal di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

- 1) Apakah virus SARS-CoV-2 dapat tumbuh dan berkembang di dalam tubuh ikan zebra (*Danio rerio*) ?
- 2) Bagaimana gambaran infeksi virus SARS-CoV-2 pada tubuh ikan zebra (*Danio rerio*) ?
- 3) Apakah terdapat pengaruh perbedaan jalur infeksi terhadap gambaran pertumbuhan virus SARS-CoV-2 di dalam tubuh ikan zebra (*Danio rerio*) ?
- 4) Apakah ikan zebra (*Danio rerio*) memiliki kemampuan untuk menyebarkan virus ke lingkungan / air ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk melakukan upaya pengembangan penelitian dalam mengembangkan virus SARS-CoV-2 dan produksi seed virus vaksin covid-19 untuk manusia dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*).

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Menganalisis virus SARS-CoV-2 dapat tumbuh dan berkembang di dalam tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).
- 2) Menganalisis gambaran infeksi virus SARS-CoV-2 pada tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).

- 3) Menganalisis perbedaan pengaruh jalur infeksi terhadap gambaran pertumbuhan virus SARS-CoV-2 di dalam tubuh ikan zebra (*Danio rerio*).
- 4) Menganalisis kemampuan ikan zebra (*Danio rerio*) dalam menyebarkan virus SARS-CoV-2 ke lingkungan / air.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi ilmiah mengenai perkembangan virus SARS-CoV-2 pada ikan zebra (*Danio rerio*) sehingga dapat digunakan sebagai acuan basis pengembangan produksi vaksin SARS-CoV-2 untuk manusia dengan menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*).

1.4.2 Manfaat Praktis

Ikan Zebra (*Danio rerio*) dapat digunakan sebagai alternatif media kultur untuk virus SARS-CoV-2 yang diharapkan mampu memberikan solusi terhadap upaya pengembangan seed virus vaksin SARS-CoV-2 untuk manusia.