



UNIVERSITAS INDONESIA

**AMPLIFIKASI GEN *gag p7* (NUKLEOKAPSID) *HUMAN*
IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE I (HIV-1) SUBTIPE CRF01_AE
ISOLAT INDONESIA**

SKRIPSI

**MUNFARIDA
0606029126**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**AMPLIFIKASI GEN *gag p7* (NUKLEOKAPSID) *HUMAN*
IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE I (HIV-1) SUBTIPE CRF01_AE
ISOLAT INDONESIA**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**MUNFARIDA
0606029126**

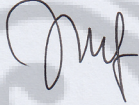
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Munfarida

NPM : 0606029126

Tanda Tangan : 

Tanggal : 21 Juni 2012

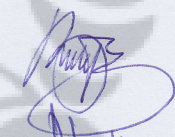
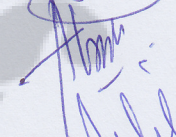
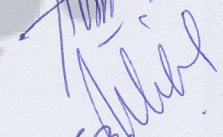

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Munfarida
NPM : 0606029126
Program Studi : Biologi SI Reguler
Judul Skripsi : Amplifikasi Gen *gag p7* (nukleokapsid) *Human Immunodeficiency Virus Type 1* (HIV-1) Subtipe CRF01_AE Isolat Indonesia

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi SI Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. dr. Budiman Bela, SpMK ()
Pembimbing II : Dr. Abinawanto ()
Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. ()
Penguji II : Dra. Setiorini, M.Kes. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 21 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala nikmat dan karunia-NYA sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam disampaikan kepada Nabi Muhammad SAW.

Penulis menyadari bahwa begitu banyak bantuan moril, materil, dan dukungan dari berbagai pihak selama penyelesaian skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.dr. Budiman Bela, SpMK selaku pembimbing I dan Dr. Abinawanto selaku pembimbing II, yang telah memberikan kesempatan, pengetahuan, nasihat dan sabar menghadapi penulis serta memberikan masukan kepada penulis selama penelitian dan penyelesaian skripsi.
2. Dr.rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc selaku Sekretaris Departemen, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan dan selaku Ketua Sidang, Dr. Wibowo Mangunwardoyo M.Sc dan Dra. Setiorini, M.Kes selaku Koordinator Seminar yang telah memberikan dukungan dan doa sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini.
3. Dr. Wibowo Mangunwardoyo M.Sc. selaku Penguji I dan Dra. Setiorini, M.Kes. selaku Penguji II, telah memberikan kritik dan saran yang sangat bermanfaat bagi penulis.
4. Dra. Lestari Rahayu K, M. Sc. selaku Penasehat Akademik dan seluruh dosen Departemen Biologi FMIPA UI telah memberikan ilmu dan pengalaman yang bermanfaat bagi penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Biologi FMIPA UI, serta seluruh staf dan karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, khususnya kepada Ibu Ida, Ibu Rusmalina, dan Mbak Asri.
5. dr. Fera Ibrahim M.Sc., Ph.D., SpMK selaku direktur *Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia (IHVCB-UI)* yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk melakukan penelitian di Laboratorium IHVCB-UI.

6. Seluruh staf IHVCB-UI (Ibu Sylvia, Ibu Sofy, Mbak Henny, Kak Eka, Kak Wuri, Mas Lulut, Kak Atep, Mas Heru, Mbak Wendra, dan Mbak Sri) yang telah memberikan banyak warna selama penelitian. Terima kasih atas pengertian, bantuan, dan dukungan selama penelitian.
7. Orang tua tercinta (Kasturi dan Sri Untari), Mas Irsya, Mbak Ratna, keponakan tersayang (Riri), Eyang tersayang (Murdoko, Masriatun, H. Yahya Sukarman, Darmiatun), Tante Lifah, Pak Nur, Sepupu tersayang (Lita, Astrid, Azizah), Ibu Istiqomah, Pak Malik, dan Moh. Yani yang senantiasa memberikan doa, dukungan, nasihat dan kasih sayang yang luar biasa kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
8. Semua teman-teman Biologi 2006, khususnya Septiyana Mangi (Septoy), Asri Sulfida (Acie), Nidya Sutanto (Nia), Mardhatilah Sariyanti, dan Indria Puti Mustika (Indrihe), serta seluruh teman Biologi angkatan 2008--2004 yang telah banyak membantu penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Biologi FMIPA UI. Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada Budi Prasetyo, S.Si atas segala bantuan moril, materil, dan kasih sayang yang luar biasa kepada penulis.
9. Teman-teman tersayang (Alberta Parinters Makur, Caecilia Speranda Gultom, Juni Anggraini Ginting, Mega Vionytha, dan Nalia Safitri) atas keceriaan dan kehangatan, serta dukungan, doa, dan bantuan materil kepada penulis.

Penulis memohon maaf apabila terdapat kesalahan dan semoga Tuhan membalas semua kebaikan pihak-pihak yang telah membantu penulis. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Munfarida
NPM : 0606029126
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

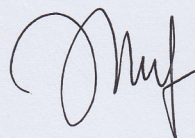
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Amplifikasi Gen *gag p7* (nukleokapsid) *Human Immunodeficiency Virus Type 1* (HIV-1) Subtipe CRF01_AE Isolat Indonesia

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal: 21 Juni 2012
Yang menyatakan



(Munfarida)

ABSTRAK

Nama : Munfarida
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Amplifikasi Gen *gag p7* (Nukleokapsid) *Human Immunodeficiency Virus Type 1* (HIV-1) Subtipe CRF01_AE Isolat Indonesia

Acquired Immunodeficiency Syndrome disebabkan oleh infeksi *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) terhadap sel-sel T CD4+, limfosit, dan makrofag. Sebanyak 90.7% penderita HIV di Indonesia terinfeksi oleh HIV-1 subtipe CRF01_AE. Protein Gag P7 yang dikode oleh gen *gag p7* dan terdapat di dalam genom HIV-1 merupakan protein yang dapat digunakan sebagai obat antiretrovirus dan kandidat antigen untuk sistem diagnostik. Penelitian bertujuan untuk memperoleh fragmen DNA *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1 yang berukuran 210 pb. Fragmen gen *gag p7* diperoleh dari hasil *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dengan menggunakan primer *forward* AE_p7F dan primer *reverse* AE_p7R. Cetakan DNA (*template*) berasal dari RNA virus yang diambil dari serum pasien penderita HIV-1 di Indonesia. Hasil visualisasi pada gel poliakrilamida 10% menunjukkan bahwa fragmen gen *gag p7* (nukleokapsid) berhasil teramplifikasi dengan ukuran 210 pb.

Kata Kunci : gen *gag p7* (nukleokapsid), HIV-1, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), subtipe CRF01_AE.

xii+ 45 halaman ; 16 gambar; 7 lampiran; 1 tabel
Daftar Referensi : 46 (1983--2012)

ABSTRACT

Name : Munfarida
Study Programme : Biology S1 Regular
Title : Amplification of *gag p7* gene (nucleocapsid) of Human Immunodeficiency Virus *Type 1* (HIV-1) Subtype CRF01_AE Isolate Indonesia

Acquired immunodeficiency syndrome caused by human immunodeficiency virus infections to the CD4+ cells, lymphocyte, and macrophage. More than 90.7 % HIV patient in Indonesia were infected by HIV-1 subtype CRF01_AE. The Gag P7 protein coded by *gag p7* gene which found in HIV genome was known as protein in which could be used for antiretroviral drugs (ARV) and diagnosis of HIV-1 infections. The purpose of research is to get DNA fragment of *gag p7* (nucleocapsid) gene of HIV-1 which has length 210 bp. Fragment of *gag p7* gene could be gotten from the process of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in which use primer forward AE_p7F and primer reverse AE_p7R. The templates is RNA virus that taken from patient's serum of HIV-1 in Indonesia. The electrophoresis visualization shown that fragment of *gag p7* (nucleocapsid) gene was success amplified in which has length 210 bp.

Keywords : *gag p7* (nucleocapsid) gene, HIV-1, *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), subtype CRF01_AE.

xii+ 45 pages ; 7 appendixes; 16 pictures; 1 table

Bibliography : 46 (1983--2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (HIV)	5
2.1.1 Struktur dan Genom HIV-1	6
2.1.2 Siklus Hidup HIV	8
2.2 Gen <i>gag p7</i> (nukleokapsid) HIV-1	9
2.3 Amplifikasi Fragmen DNA dengan Teknik <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)	11
2.4 Elektroforesis	13
2.5 Spektrofotometri	14
3. METODE PENELITIAN	15
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	15
3.2 Bahan	15
3.2.1 Cetakan DNA	15
3.2.2 Primer	15
3.2.3 <i>Buffer</i>	16
3.2.4 Bahan Kimia	16
3.3 Alat	17
3.4 Cara Kerja	17
3.4.1 Pembuatan Larutan dan <i>Buffer</i>	17
3.4.2 Amplifikasi Gen <i>gag p7</i> (nukleokapsid) dengan Teknik RT-PCR	18
3.4.2.1 Optimasi Suhu <i>Annealing</i>	18
3.4.2.1.1 Pembuatan Campuran Reaksi	18
3.4.2.1.2 Reaksi PCR	18
3.4.2.1.3 Visualisasi Produk PCR	19

3.4.2.2	Amplifikasi Gen <i>gag p7</i> (nukleokapsid) berdasarkan Optimasi Suhu <i>Annealing</i>	19
3.4.2.2.1	Pembuatan Campuran Reaksi	19
3.4.2.2.2	Reaksi PCR	19
3.4.2.2.3	Visualisasi Produk PCR	19
3.4.2.2.4	Pengukuran Konsentrasi Produk PCR ..	20
3.4.3	Purifikasi Produk PCR	21
3.4.3.1	Visualisasi DNA Produk Purifikasi	21
3.4.3.2	Pengukuran Konsentrasi DNA Produk Purifikasi..	22
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1	Optimasi dan Amplifikasi Gen <i>gag p7</i> (nukleokapsid)	23
4.2	Visualisasi dan Analisis Panjang Sekuen Produk PCR Gen <i>gag p7</i> berdasarkan Metode Kurva Standar	29
4.3	Purifikasi Hasil Amplifikasi Gen <i>gag p7</i> (nukleokapsid)	30
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	32
5.1	Kesimpulan	32
5.2	Saran	32
	DAFTAR REFERENSI	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 (1)	Peta Persebaran Subtipe HIV di Dunia	2
Gambar 1 (2)	Aktivitas Protein Prekursor Gag	3
Gambar 2.1	Genom HIV-1 dan HIV-2	5
Gambar 2.1.1 (1)	Struktur HIV-1	7
Gambar 2.1.1 (2)	Struktur Genom HIV-1	7
Gambar 2.1.2	Siklus Hidup HIV	8
Gambar 2.2 (1)	Struktur <i>Zinc Fingers</i>	9
Gambar 2.2 (2)	Struktur 3D Protein Nukleokapsid (NC-p7) HIV-1...	10
Gambar 2.2 (3)	Peranan Nukleokapsid (NC-p7) pada saat <i>Annealing ReverseTranscription</i>	11
Gambar 3.2.2 (1)	Skema Primer dengan Penambahan Sekuen Pengenalan Enzim Restriksi <i>Bam</i> HI dan <i>Sma</i> I	16
Gambar 3.2.2 (2)	Skema Pelekatan Primer untuk Amplifikasi Gen <i>gag p7</i> (nukleokapsid) HIV-1 Subtipe CRF01_AE	16
Gambar 3.4.2.2.2	Kondisi PCR	20
Gambar 4.1 (1)	Optimasi Suhu <i>Annealing</i> untuk Amplifikasi Fragmen Gen <i>gag p7</i>	24
Gambar 4.1 (2)	Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen <i>gag p7</i> dengan Teknik RT-PCR	27

Gambar 4.1 (3)	Skema Hasil Amplifikasi Gen <i>gag p7</i> (nukleokapsid)..	28
Gambar 4.3	Hasil Elektroforesis Produk Purifikasi	30

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Hasil Pengukuran Densitas pada Pita DNA Target	24
-----------	---	----

DAFTAR LAMPIRAN

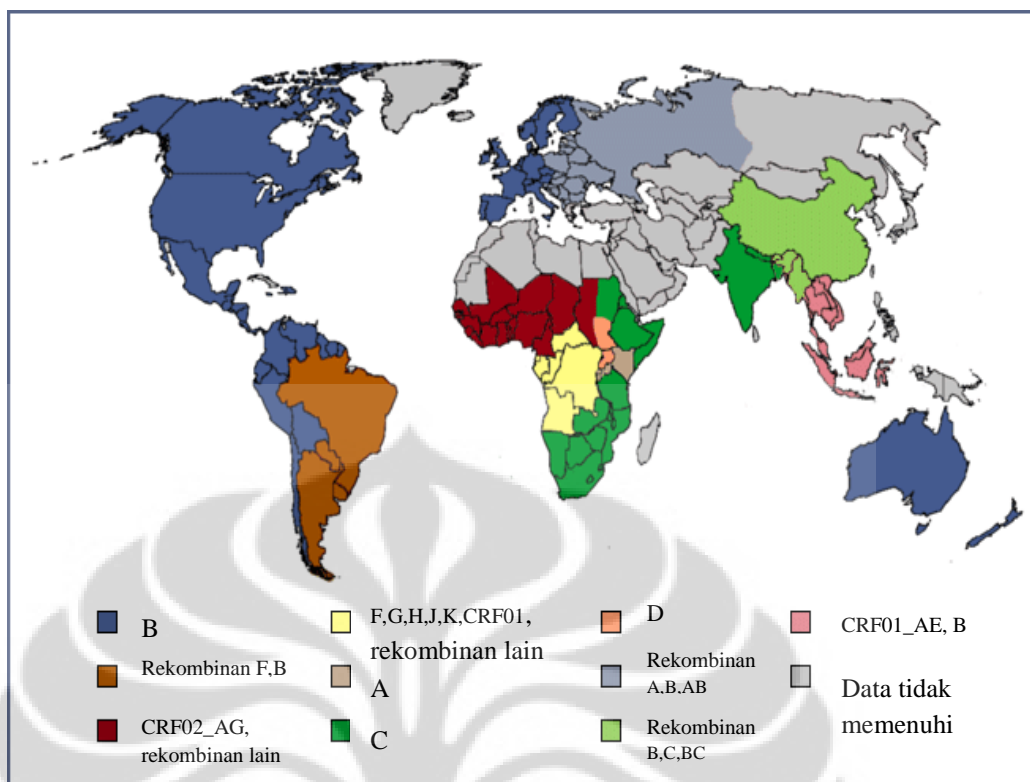
Lampiran 1	Bagan Cara Kerja Penelitian	38
Lampiran 2	Pembuatan Larutan dan <i>Buffer</i>	39
Lampiran 3	Campuran Reaksi <i>One-Step</i> RT-PCR	40
Lampiran 3 (Lanjutan)	Kondisi <i>One-Step</i> RT-PCR	40
Lampiran 4	Perhitungan <i>Temperature Melting</i> (Suhu T_m) Primer AE_p7F dan AE_p7R	41
Lampiran 5	Visualisasi Produk PCR Gen <i>gag p7</i> oleh Chen <i>dkk.</i>	42
Lampiran 6	Kurva Standar Panjang Molekul Marka DNA	43
Lampiran 7	Perhitungan Panjang Sekuen Produk PCR Gen <i>gag p7</i>	44

BAB 1 PENDAHULUAN

Penyakit *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) terhadap sel-sel T CD4⁺, limfosit, dan makrofag yang ditandai oleh kematian sel (Hunt 2009:1). *Human immunodeficiency virus* (HIV) terdiri atas dua tipe yaitu HIV-1 dan HIV-2. Penyakit AIDS umumnya disebabkan oleh virus HIV-1 yang termasuk ke dalam kelas Retrovirus dan subfamili Lentivirinae (Wang *dkk.* 2000: 131; Nazari 2008: 17).

Merati *dkk.* (2009: 2--3) menyatakan bahwa *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) secara filogenetik terbagi atas grup, subtipe, dan *circulating recombinant form* (CRF). Kelompok terbesar disebut grup M (*main, major*), kelompok lain disebut grup O (*outlier*) dan grup N (*New, non M, non O*). Grup M tersebar luas dan penyebab terbesar epidemi HIV di seluruh dunia. Grup O bersifat endemik di Kamerun dan negara sekitarnya di Afrika Barat dengan prevalensi sekitar 2--5 %, sedangkan grup N (*New, non M non O*) hanya didapatkan pada beberapa isolat dari Afrika. Subtipe dari grup M diberi nama abjad sesuai dengan urutan penemuannya dan sampai sekarang dikenal 9 subtipe yaitu subtipe A, B, C, D, F, G, H, J, dan K. Los Alamos National Laboratory (2009b: 1) menyatakan bahwa subtipe yang satu dengan subtipe lainnya dapat membentuk rekombinan yang disebut *circulating recombinant form* (CRF) dan sampai saat ini telah ditemukan sebanyak 48 CRF (Gambar 1 (1)).

Berdasarkan penelitian Merati *dkk.* (2009: 1--3 & 8) terdapat empat jenis subtipe di Indonesia yaitu subtipe B, CRF01_AE, C, dan G. Sebanyak 90,7% penderita HIV-1 di Indonesia terinfeksi oleh subtipe CRF01_AE dan keberadaannya tersebar di Pulau Bali, Jawa, Sumatera, dan Kalimantan.

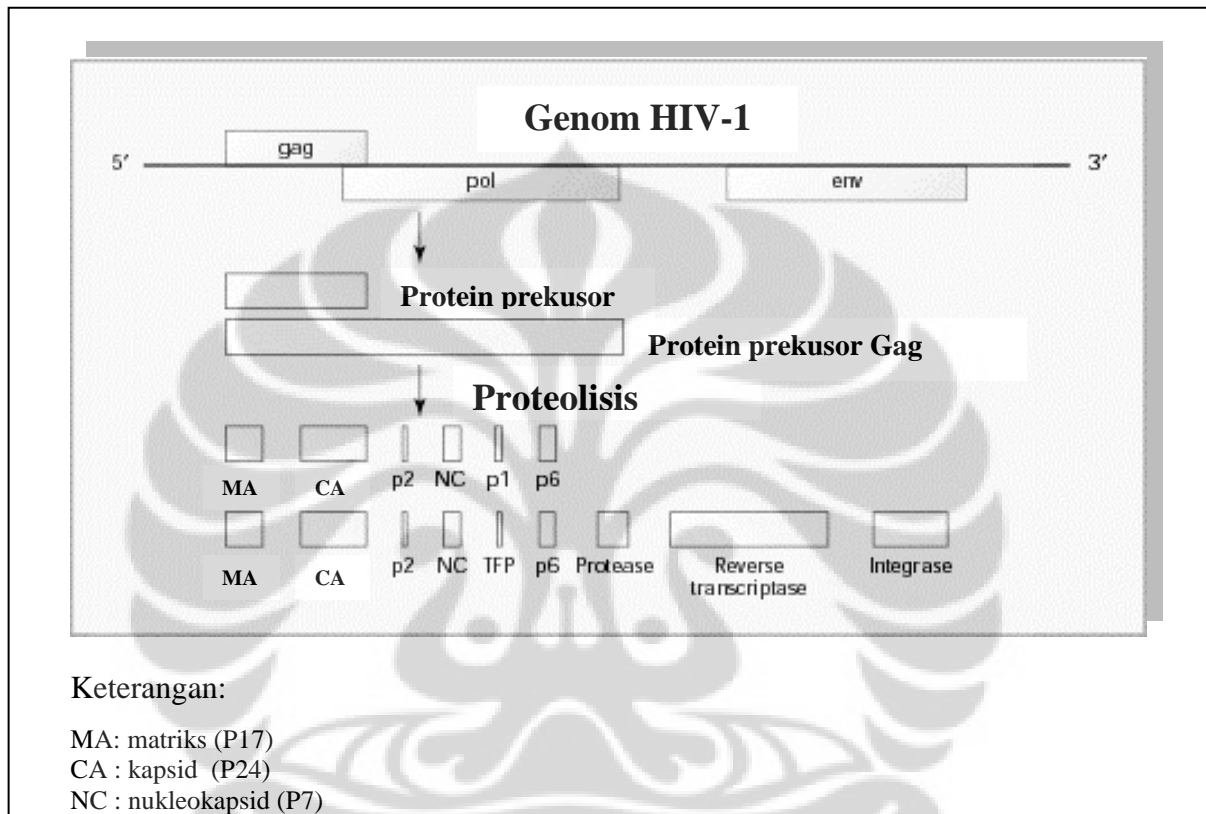


Gambar 1 (1). Peta Persebaran Subtipe HIV di Dunia
[Sumber: McCutchan 2003: 1, diterjemahkan sesuai aslinya]

Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit & Penyehatan Lingkungan (PP&PL) melaporkan bahwa angka kumulatif jumlah kasus AIDS di Indonesia sampai dengan 30 September 2009 sebanyak 18.442 kasus. Pada tahun 2014 diproyeksikan jumlah infeksi baru HIV usia 15--49 tahun sebesar 79.200 dan proyeksi untuk Orang yang hidup Dengan HIV/AIDS (ODHA) usia 15--49 tahun sebesar 501.400 kasus (Depkes 2010: 1).

Ketersediaan obat antiretrovirus merupakan bagian penting dalam strategi pengendalian infeksi HIV/AIDS. Walaupun telah tersedia berbagai jenis obat antiretrovirus seperti AZT dan 3TC, termasuk dalam analog *nucleoside reverse transcriptase inhibitor* dan tersedia di beberapa negara, termasuk Indonesia, namun obat antiretrovirus yang berasal dari Nukleokapsid HIV-1 belum mengalami perkembangan. Oleh karena itu, dilakukan penelitian yang mengarah pada pengembangan obat antiretrovirus dari Nukleokapsid. Gen *gag* merupakan salah satu gen utama HIV-1 yang *conserved* dan memiliki berbagai epitop sel T

sehingga berpotensi sebagai target antiretrovirus dan kandidat antigen untuk sistem diagnostik (Chugh 2003:77). Menurut Wang *dkk.* (2000: 132), protein Gag diekspresikan sebagai protein prekursor Gag (pr55^{gag}) yang akan dipotong oleh *protease* virus menjadi beberapa polipeptida kecil yaitu P24 (kapsid), P17 (matriks), P7 (nukleokapsid), P6 (Gambar 1 (2)).



Gambar 1 (2). Aktivitas Protein Prekursor Gag.
 [Sumber: NCBI 2006: 1, diterjemahkan sesuai aslinya]

Protein Gag P7 (nukleokapsid) HIV-1 merupakan subunit poliprotein Gag yang memiliki struktur *conserved* terdiri atas dua *zinc fingers* yang dapat mengikat RNA dan berperan dalam proses pengemasan RNA virus. Peranan utama *zinc fingers* protein Gag P7 (nukleokapsid) HIV-1 dalam fase siklus hidup HIV-1 digunakan sebagai target terapi antiretroviral. Protein nukleokapsid HIV-1 juga dapat digunakan sebagai kandidat antigen untuk sistem diagnostik (Barr *dkk.* 1999: 63; Basrur *dkk.* 2000: 14890).

Druillennec *dkk.* (1999: 11283) menyatakan bahwa ada interaksi antara protein Nukleokapsid (NC-p7) dan *reverse transcriptase* HIV-1. Interaksi terlihat saat *zinc finger* (NC-p7) memfasilitasi *reverse transcriptase* dengan meningkatkan proses penempelan primer tRNA ke RNA *primer binding site* (PBS). Musah (2004: 1605--1622) juga melakukan penelitian tentang peranan Nukleokapsid (NC-p7) dalam tahapan siklus hidup HIV yaitu *reverse transcription*, integrasi, pengenalan genom dan proses pengemasan virus (*packaging*), sehingga sangat berpotensi sebagai target terapi antiretroviral HIV-1.

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan, Laboratorium *Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia* (IHVCB-UI) berupaya untuk memproduksi protein rekombinan Gag P7 untuk digunakan dalam berbagai tujuan penelitian, salah satunya untuk proyek pengembangan obat antiretrovirus HIV-1. Tahap awal untuk memujudkan hal tersebut adalah melakukan amplifikasi gen *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1 sub tipe CRF01_AE menggunakan pasangan primer AE_p7F dan AE_p7R dan sumber cetakan DNA berasal dari RNA virus yang diekstraksi dari serum penderita HIV-1 di Indonesia. Penelitian bertujuan untuk memperoleh fragmen DNA *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1 sub tipe CRF01_AE. Hipotesis penelitian adalah gen *gag p7* HIV-1 sub tipe CRF01_AE berhasil diamplifikasi dengan metode RT-PCR.

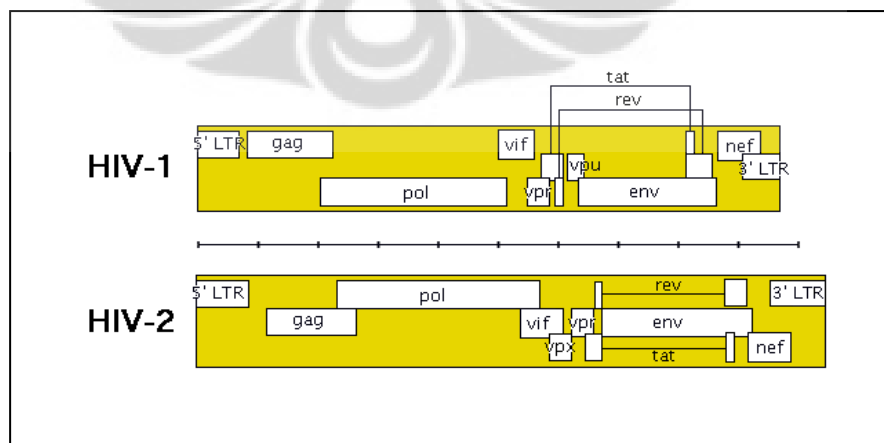
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*

Human Immunodeficiency Virus (HIV) termasuk ke dalam kelas Retrovirus, famili *Retroviridae* dan subfamili *Lentivirinae* (Wang *dkk.* 2000: 131). Virus HIV dikelompokkan ke dalam famili *Retroviridae* karena memiliki cara replikasi yang unik, materi genetik HIV berupa RNA akan ditranskripsi balik oleh *reverse transcriptase* menjadi DNA. Virus HIV dikelompokkan ke dalam subfamili *Lentivirinae* karena memiliki masa inkubasi yang lama dan sebagian besar memiliki target sel pada sistem imun dan menyebabkan imunodefisiensi. (Nester *dkk.* 2007: 735 & 737; Hunt 2009:1).

Penyakit *Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)* ditandai dengan penurunan jumlah limfosit T *cluster of differentiation 4+* (CD4+) dari jumlah normal 1.500 sel/mm³ darah menjadi kurang dari 200 sel/mm³ darah (Abbas & Lichtman 2007: 468 & 471). Berdasarkan variasi antigeniknya, virus HIV dikelompokkan menjadi dua tipe yaitu HIV-1 dan HIV-2. Kedua tipe virus tersebut memiliki struktur yang sama tetapi secara antigenik genom keduanya berbeda (Gambar 2.1).



Gambar 2.1. Genom HIV-1 dan HIV-2
[Sumber: Stowell 2006: 1]

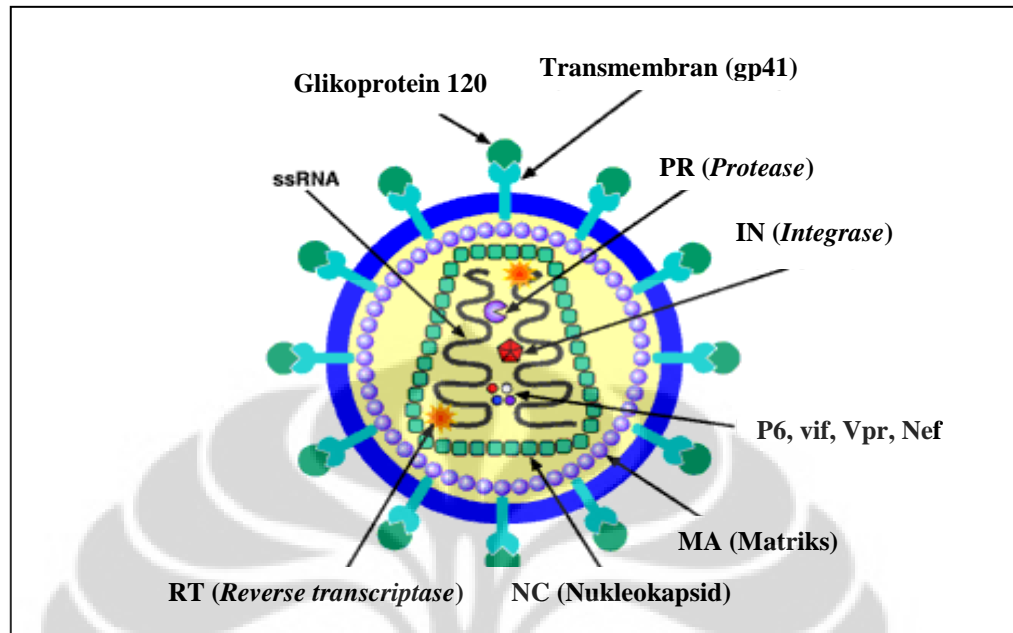
Virus HIV yang menginfeksi beberapa negara di dunia sebagian besar disebabkan oleh infeksi virus HIV-1, sedangkan infeksi virus HIV-2 hanya terbatas pada wilayah Afrika Barat (Hunt 2009:1). Virus HIV-1 dikelompokkan menjadi tiga grup, yaitu: grup N (*new*), grup O (*outlier*), dan grup M (*main, major*). Virus HIV-1 grup M dikelompokkan menjadi 9 subtipe, yaitu: A, B, C, D, E, F, G, H, J, dan K. Subtipe yang satu dengan subtipe lainnya dapat membentuk rekombinan yang disebut *circulating recombinant form* (CRF) dan sampai saat ini telah ditemukan sebanyak 48 CRF di dunia, di antaranya adalah CRF03_AB (gabungan dari subtipe A dan B), CRF02_AG (gabungan dari subtipe A dan G), dan CRF01_AE (gabungan dari subtipe A dan E). Subtipe CRF01_AE keberadaannya paling banyak tersebar di Pulau Bali, Jawa, Sumatera, dan Kalimantan. (Los Alamos National Laboratory 2009b: 1; Merati *dkk.* 2009: 2--3 & 8).

2.1.1. Struktur dan Genom HIV-1

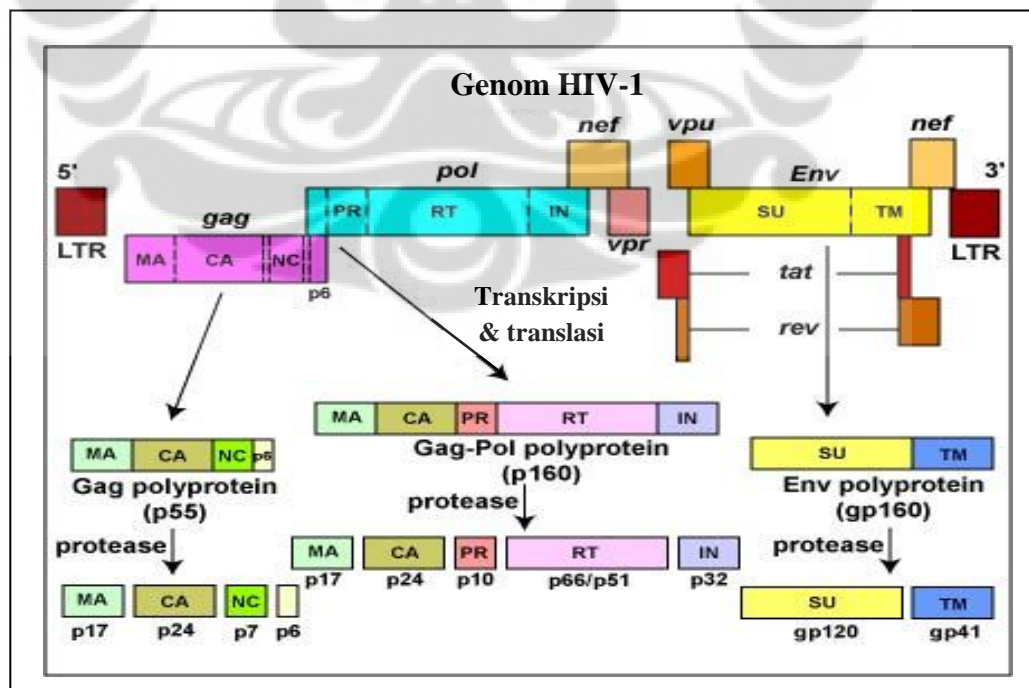
Virus HIV-1 memiliki bentuk seperti bola (*spherical*) dengan ukuran diameter 100--150 nm dan diselubungi oleh membran lipid yang berasal dari sel inang. Menurut Pavlakis (1997: 46), inti partikel virus yang tersusun dari kapsid, enzim-enzim virus (*protease, reverse transcriptase, integrase*), dan protein nukleokapsid yang memiliki bentuk *icosahedral* yang dikelilingi oleh selubung lipid bilayer (Gambar 2.1.1 (1)). Genom HIV merupakan RNA untai tunggal dan dikategorikan ke dalam RNA untai-positif. Setiap virion memiliki dua molekul genomik yang identik, sehingga secara genetik dikatakan diploid (Voyles 2002: 155).

Genom HIV-1 yang berukuran 9,8 kb terdiri dari tiga gen utama yaitu *envelope* (*env*) yang mengkode protein selubung berupa glikoprotein (gp) dengan berat molekul 120 (gp120) dan 41 (gp41), polimerase (*pol*) yang mengkode enzim untuk replikasi virus, dan *group specific antigen* (*gag*) yang mengkode protein prekursor 55 (Pr 55^{Gag}). Poliprotein prekursor Gag 55 mengalami proteolisis menjadi polipeptida-polipeptida kecil berupa matriks (MA) (p17), kapsid (CA) (p24), p6 dan nukleokapsid (NC) (p7). Genom HIV-1 juga memiliki gen

regulator (*tat*, *rev*) dan gen aksesoris (*rev*, *vpr*, *nev*, *vpu* dan *vif*) (Gambar 2.1.1 (2)) (Sinoussi 1996: 31; Macpherson *dkk.* 1999: 498).



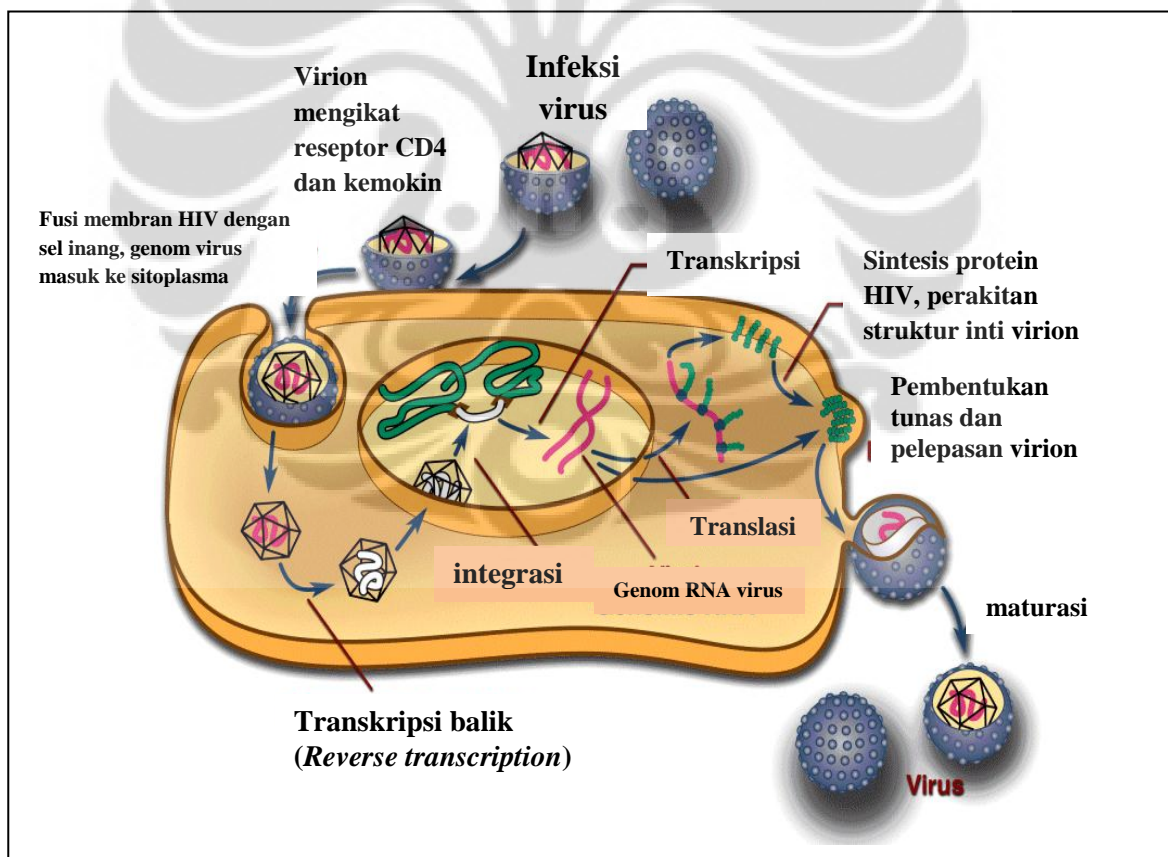
Gambar 2.1.1 (1). Struktur HIV-1
[Sumber: Brookscote 2010: 1, diterjemahkan sesuai aslinya]



Gambar 2.1.1 (2). Struktur Genom HIV-1
[Sumber: Biowiki 2007: 1, diterjemahkan sesuai aslinya]

2.1.2. Siklus Hidup HIV

Infeksi virus HIV diawali dengan melekatnya virus pada sel kemudian masuk menembus membran plasma, enzim *reverse transcriptase* akan mengubah RNA virus menjadi DNA. DNA dibawa menuju nukleus dan bergabung dengan DNA sel inang melalui bantuan enzim integrase. DNA retrovirus (provirus) yang telah bergabung dengan DNA sel inang kemudian akan menggunakan perangkat transkripsi sel inang untuk mengekspresikan RNA virus. DNA provirus memiliki dua peran, yaitu sebagai RNA genom yang tergabung dalam virion dan sebagai RNA *messenger* yang menghasilkan protein-protein virus. RNA genom dan RNA *messenger* disusun ke dalam partikel virus, yang akan dikeluarkan dari sel dan menginfeksi sel-sel baru dengan melekat pada reseptor spesifik (Gambar 2.1.2) (Pavlakis 1997: 47).

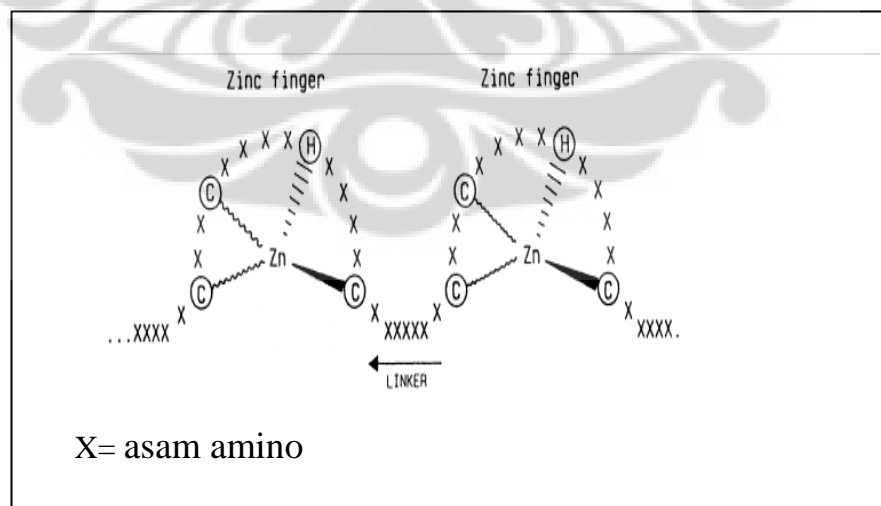


Gambar 2.1.2. Siklus Hidup HIV

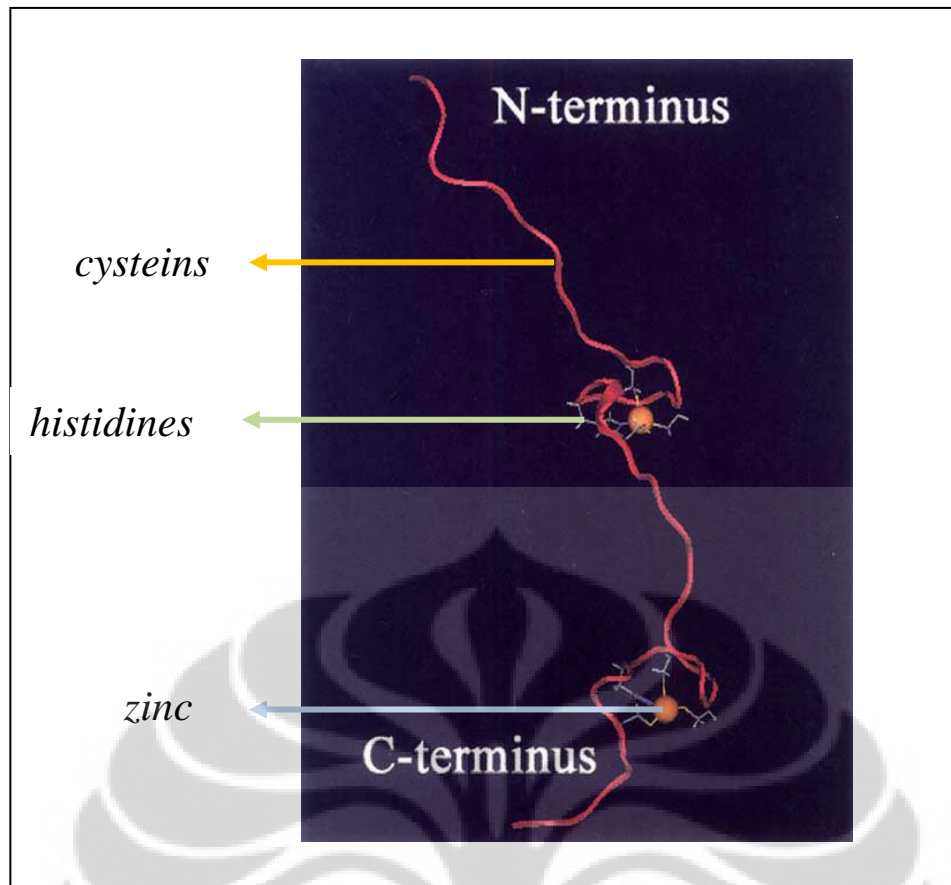
[Sumber:NCBI 2009:1, diterjemahkan sesuai aslinya]

2.2 Gen *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1

Gen *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1 memiliki ukuran fragmen 210 pb (Chen *dkk.* 2007: 351). Gen *gag p7* (nukleokapsid) terdiri atas dua salinan *zinc fingers* yang memiliki struktur *conserved* dan diistilahkan sebagai kotak Cys-His (CXXCXXXXHXXXXC) (Gambar 2.2 (1)). Residu Cys dan His berkoordinasi dengan *zinc* (Zn^{2+}) untuk membentuk domain struktur yang stabil (Gambar 2.2 (2)). *Zinc fingers* tersebut memiliki beberapa peranan penting, yaitu saat proses *reverse transcription* dalam fase siklus hidup virus, meningkatkan pengemasan genom virus yang berupa RNA, dan menstabilkan bentuk RNA virus menjadi suatu bentuk dimer (Morikawa 2003: 4; Stephen *dkk.* 2003: 33). Protein nukleokapsid diketahui memiliki tiga peranan saat proses *reverse transcription*, yaitu memfasilitasi terjadinya proses *annealing* primer tRNA ke *primer binding site* (PBS) RNA virus yang berfungsi sebagai cetakan (Gambar 2.2 (3)), meningkatkan prosesifitas dan efisiensi *reverse transcriptase* selama proses sintesis DNA virus, dan meningkatkan pergantian cetakan pada proses *reverse transcription* untuk menghasilkan *full length* DNA virus (Musah 2004: 1607--1608).

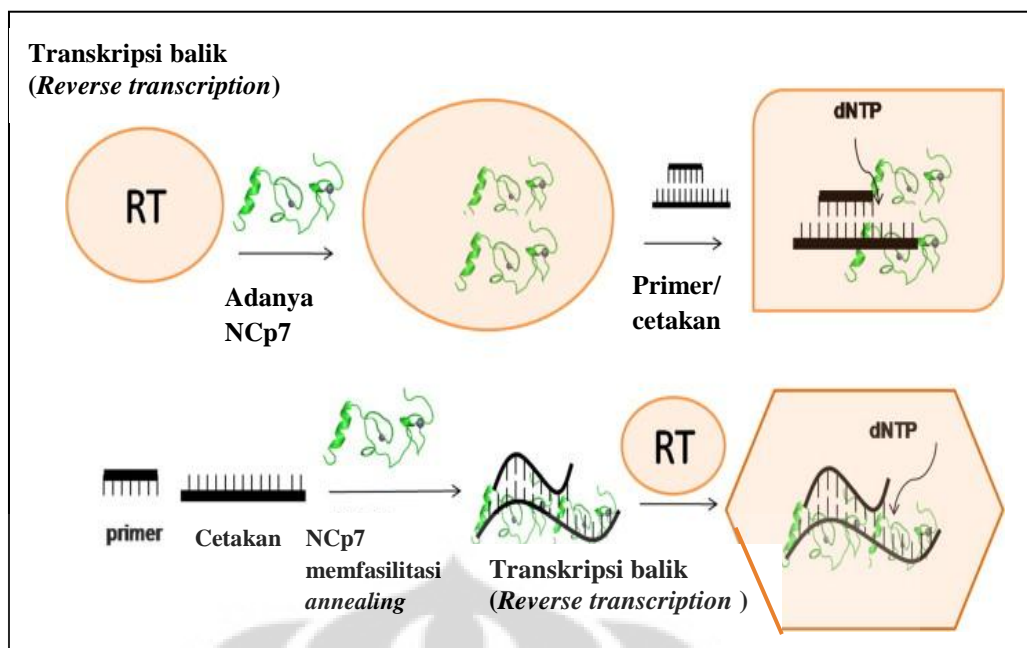


Gambar 2.2 (1). Struktur *Zinc fingers*
[Sumber: Clercq 1997: 185]



Gambar 2.2 (2). Struktur 3D Protein Nukleokapsid (NC-p7) HIV-1
[Sumber: Musah 2004: 1607]

Fungsi penting yang dimiliki nukleokapsid saat tahapan awal dan akhir dari siklus hidup virus, menjadikannya kandidat sebagai target terapi obat antiretroviral (ARV). Beberapa kelompok obat tersebut adalah *aldrithiol*, *pyridinialkanoyl thioester* (PATE), *3-nitrosobenzopyrone* (NOBA) dan *6-nitroso-1-2-benzopyrone* (NOBP) (Stephen *dkk.* 2003: 34; Musah (2004: 1611). Musah (2004: 1611) menyatakan bahwa NOBA dan NOBP dapat menghambat infeksi HIV-1. Senyawa obat tersebut bereaksi dengan 18 residu peptida yang terletak pada domain N-terminal dari *zinc finger*. Senyawa obat *aldrithiol* diketahui dapat menginaktivasi *zinc finger* pada nukleokapsid.



Gambar 2.2 (3). Peranan Nukleokapsid (NCp7) pada saat *Annealing Reverse Transcription*

[Sumber: Kim1 *dkk.* 2012: 866—880, diterjemahkan sesuai aslinya]

2.3 Amplifikasi Fragmen DNA dengan Teknik *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) merupakan teknik yang mengubah RNA menjadi cDNA dan mengamplifikasi sebagian genom dengan menggunakan primer yang melekat secara spesifik ke daerah target (Sambrook & Russell 2001b: 8.46). Teknik *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* terdiri atas *one-step* dan *two-step* RT-PCR. Penelitian amplifikasi gen *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1 menggunakan teknik *one-step* RT-PCR [QIAGEN]. Komponen-komponen penting dalam reaksi *one-step* RT-PCR antara lain *template* RNA sebagai cetakan untuk sekuen yang akan diamplifikasi, *one-step* RT-PCR *buffer* digunakan untuk mempertahankan keseimbangan ionik pH dalam proses PCR, *dNTP mix* yang dapat membentuk basa komplementer dari cetakan, *Q-solution* dapat meningkatkan suboptimal RT-PCR dan memfasilitasi amplifikasi cetakan yang banyak mengandung basa G & C, primer *mix*, *one-step* RT-PCR enzim *mix*, dan RNase *inhibitor* merupakan protein yang berukuran 50 kDa yang dapat menghambat RNase A, B, dan C, seperti RNase plasenta manusia.

RNase *inhibitor* membantu meminimalkan resiko terdegradasinya RNA selama percobaan berlangsung (QIAGEN 2010: 8--13).

One-step RT-PCR enzim *mix* terdiri atas *omniscrypt*, *sensicript reverse transcriptase*, dan *hotstartaq DNA polymerase*. *Omniscrypt* dan *sensicript reverse transcriptase* memiliki efisiensi yang tinggi dan spesifik terhadap *reverse transcription*. Kedua enzim *reverse transcriptase* tersebut menunjukkan afinitas yang tinggi terhadap RNA, memfasilitasi transkripsi melalui struktur sekundernya yang dapat menghambat enzim *reverse transcriptase* lain. Enzim *hotstartaq DNA polymerase* berfungsi untuk meningkatkan hasil PCR, memiliki sensitivitas dan spesifitas PCR yang tinggi, tahan terhadap suhu tinggi yaitu 95° C dan hanya aktif setelah inkubasi 15 menit. Selama proses *reverse transcription*, enzim *hotstartaq DNA polymerase* tidak aktif dan tidak memengaruhi kerja *reverse transcriptase* (QIAGEN 2010: 8).

Selain enzim *mix*, komponen *buffer* juga sangat penting dalam proses RT-PCR. Komposisi *buffer* yang unik menyebabkan proses *reverse transcription* dapat berjalan dengan suhu yang tinggi yaitu 50° C. Kombinasi dari enzim *mix* dan *one-step* RT-PCR *buffer* dengan komposisi yang unik dapat meningkatkan efisiensi *one-step* RT-PCR (QIAGEN 2010: 8--9; Sambrook & Russel 2001b: 8.8).

Primer merupakan rantai tunggal pendek yang mengandung nukleotida dan bersifat spesifik. Primer akan melekat pada sekuen yang komplemen dan mengapit sekuen spesifik yang akan diamplifikasi. Primer yang umum digunakan adalah primer *forward* dan *reverse* (Wolfe 1995: 139). Beberapa syarat primer yang baik adalah berkomplemen dengan DNA cetakan spesifik yang diinginkan, memiliki panjang basa 18--25 basa, memiliki *temperature melting* (T_m) 50--60° C, mengandung 40--60 % basa guanin (G) dan sitosin (C), tidak membentuk dimer antar primer (Sambrook & Russell 2001b: 8.14).

Selain komponen-komponen untuk RT-PCR, kondisi dan banyaknya siklus juga berpengaruh terhadap proses amplifikasi. Kondisi RT-PCR terdiri atas beberapa tahapan siklus reaksi yaitu *reverse transcription*, denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi atau sintesis untai DNA baru. *Reverse transcription* merupakan tahapan perubahan RNA menjadi cDNA pada suhu 50° C. Tahapan inisiasi atau

denaturasi awal dengan suhu 95° C selama 15 menit mengaktifkan enzim *hotstartaq* DNA polymerase sekaligus menonaktifkan enzim *reverse transcriptase*. Tahap selanjutnya adalah *annealing* yaitu proses pelekatan primer pada cetakan DNA. Suhu *annealing* biasanya berada antara 3--5° C lebih rendah dari Tm terendah primer. Oleh karena itu, suhu *annealing* bergantung pada primer dan nilai Tm. Suhu *annealing* yang biasa digunakan antara 50--68° C. Tahap selanjutnya adalah polimerisasi yang merupakan proses pemanjangan dari oligonukleotida primer dengan bantuan DNA *polymerase*. Jumlah siklus yang digunakan antara 25--40 siklus, jumlah siklus bergantung pada jumlah cetakan RNA dan banyaknya target transkrip (Strachan & Read 1999: 119; Sambrook & Russell 2001b: 8.8--8.9; QIAGEN 2010: 14).

2.4. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi, memisahkan fragmen DNA berdasarkan berat molekul DNA. Teknik tersebut mampu memisahkan campuran fragmen DNA sesuai dengan ukurannya secara akurat. Analisis fragmen DNA dapat dilakukan menggunakan gel poliakrilamida dan gel agarosa. Gel poliakrilamida memiliki pori-pori gel yang lebih kecil daripada gel agarosa sehingga lebih efektif untuk memisahkan fragmen DNA antara 10--1000 pb. Gel agarosa dapat memisahkan fragmen DNA 100 pb--50 kb namun tergantung konsentrasi gel agarosa. Analisis fragmen DNA berupa pita pada gel elektroforesis dapat menggunakan pewarna etidium bromida (EtBr). Etidium bromida bersifat karsinogenik sehingga digunakan dengan konsentrasi rendah (Fairbanks & Andersen 1999: 279—280; Fatchiyah 2006: 1).

Molekul DNA penanda atau marka digunakan untuk mengetahui ukuran molekul-molekul DNA hasil isolasi, restriksi maupun purifikasi. Ukuran molekul DNA tersebut dapat diketahui ukurannya dengan cara membandingkan posisi pita yang terbentuk dengan posisi marka pada gel yang digunakan untuk elektroforesis. Marka DNA yang umumnya digunakan dalam analisis genetika molekular, di antaranya adalah marka lamda *HindIII*, *2log ladder*, *BstEII*, dan *BstNI* (Ausubel *dkk.* 1990: 2.5A.7).

2.5. Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah pengukuran kuantitatif suatu partikel yang terlarut dalam suatu zat cair. Prinsip spektrofotometri adalah perhitungan intensitas cahaya yang diserap dan dilewati oleh suatu objek. Spektrofotometri dilakukan menggunakan alat yang disebut spektrofotometer. Spektrofotometer terdiri atas dua perangkat, yaitu spektrometer memproduksi sinar atau cahaya pada warna (panjang gelombang) tertentu dan fotometer untuk mengukur intensitas cahaya. Cahaya yang diserap oleh objek atau sampel sering disebut dengan absorbansi (A), sedangkan cahaya yang diteruskan oleh sampel disebut transmittan (T). Semakin keruh suatu sampel, maka absorbansi akan semakin tinggi dan transmittan rendah. Sebaliknya, semakin bening sampel, maka absorbansi semakin rendah dan transmittan semakin tinggi (Caprette 2005: 1).

Spektrofotometri dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian suatu asam nukleat dan protein. Metode pengukuran kemurnian asam nukleat dan protein dapat dilakukan dengan menggunakan dua panjang gelombang, yaitu 260 nm dan 280 nm. Rasio dari dua panjang gelombang dapat menunjukkan kemurnian suatu asam nukleat dan protein. Rasio perbandingan $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ merupakan rentang suatu asam nukleat dianggap murni. Apabila rasio kurang dari 1,8, maka suatu DNA dianggap terkontaminasi pengotor berupa protein atau fenol (Seidman & Mowery 2006: 1).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia* (IHVCB-UI), Gedung IASTH lantai 8, Jalan Salemba Raya no. 4, Jakarta. Penelitian berlangsung selama 8 bulan, yaitu dimulai dari bulan Agustus 2011 hingga April 2012.

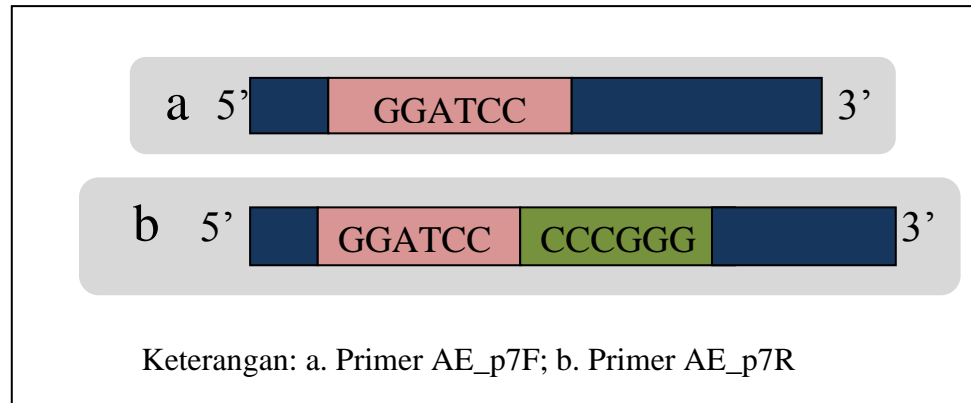
3.2 Bahan

3.2.1 Cetakan DNA

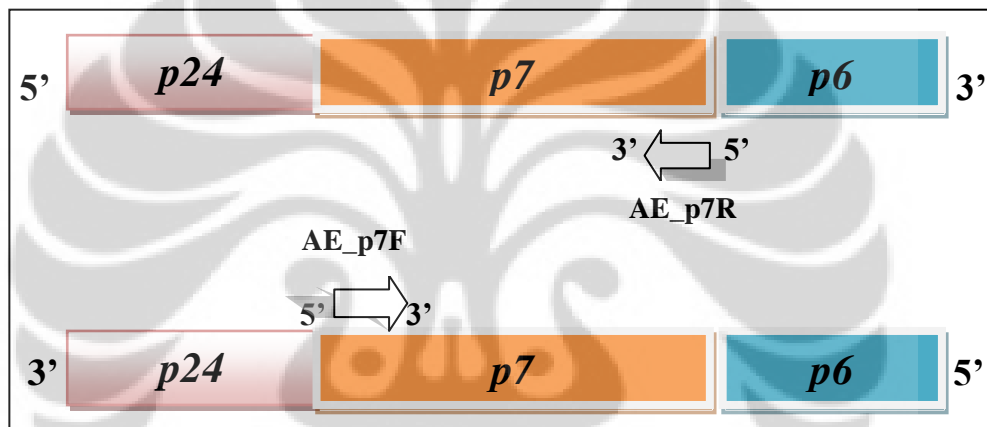
Cetakan DNA yang digunakan dalam penelitian adalah serum penderita HIV-1 di Indonesia yang merupakan koleksi Laboratorium IHVCB-UI. Cetakan DNA berasal dari RNA virus HIV-1 yang memiliki ukuran 210 pb.

3.2.2 Primer

Pasangan primer yang digunakan dalam penelitian adalah AE_p7F (5' ATG **TGG ATC** CAT GCA GAG AGG CAA TTT TAA GG 3') dan AE_p7R (5' CGG **CGG ATC CCC CGG** GTT AAT TAG CCT GTC TCT CAG TGC 3'). Kedua primer memiliki tambahan situs pengenalan enzim restriksi di dekat ujung 5'. Primer AE_p7F memiliki situs enzim restriksi *Bam*HI (**G↓GATCC**), sedangkan primer AE_p7R memiliki situs enzim restriksi *Bam*HI (**G↓GATCC**) dan *Sma*I (**CCC↓GGG**) (Gambar 3.2.2 (1)). Skema pelekatan primer pada cetakan DNA dapat dilihat pada Gambar 3.2.2 (2).



Gambar 3.2.2 (1). Skema Primer dengan Penambahan Sekuen Pengenalan Enzim restriksi *Bam*HI (5' GGATCC 3') dan *Sma*I (5' CCCGGG 3')



Gambar 3.2.2 (2). Skema Pelekatan Primer untuk Amplifikasi Gen *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1 Subtipe CRF01_AE

3.2.3 Buffer

Buffer yang digunakan adalah Tris *acetic acid* EDTA (TAE), Tris *borate* EDTA (TBE), *loading dye* 6X, 5X *buffer* RT [QIAGEN], *elution buffer* (EB) [QIAGEN], QXI [QIAGEN], QIAEX II [QIAGEN], PE [QIAGEN].

3.2.4 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan selama penelitian adalah alkohol [Merck], H₂O [Sigma], dNTP 10μM [QIAGEN], enzim *mix* [QIAGEN], RNase

[QIAGEN], penanda DNA 2 Log ladder [NEB], *low melted agarosa* (LMA) [Invitrogen], gel poliakrilamida, etidium bromide [Sigma], 3 M natrium asetat pH 5.0 [QIAGEN], 5X Q-*solution* [QIAGEN], etanol [Merck].

3.3 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah mikropipet [Pipetmen, transferpette], tip [Axygen Scientific], tabung mikrosentrifus [Axygen], *QIAquick Spin Column* (QSC) [QIAGEN], *thermal cycler engine* [PTC-200], inkubator [Bainstead], perangkat elektroforesis [BIO-RAD SUB-CELL], komputer [DELL], *Gel Doc* [BIO-RAD], *microwave* [SANYO], timbangan digital [Shimadzu], mesin sentrifugasi [Sorvall], *timer* [Cooks Club], *Freezer -20° C* [Forma Scientific], *freezer -80° C* [Forma -86° C ULT Freezer], vorteks [Heidolph], *Bio Safety Cabinet* (BSC) [Esco], *ice maker* [Hoshizaki], *pass through box* [Esco], *magnetic stirrer* [Lab. Companion HP-3000], rak tabung [Nalgene], *power supply* [Bio Rad], *nanodrop 2000 spectrophotometer* [Thermo Scientific], sarung tangan karet [Sensi gloves], masker, alat *heatblock*, kertas parafilm, dan peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium IHVCB-UI.

3.4 Cara Kerja

Bagan cara kerja penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

3.4.1 Pembuatan Larutan dan *Buffer*

Cara pembuatan larutan dan *buffer* yang digunakan selama penelitian dapat dilihat pada lampiran 2.

3.4.2 Amplifikasi Gen *gag p7* (nukleokapsid) dengan Teknik RT-PCR

Amplifikasi gen *gag p7* (nukleokapsid) dengan teknik RT-PCR dilakukan berdasarkan Sambrook & Russell (2001b: 8.51--8.53) dan QIAGEN (2010: 12--14).

3.4.2.1 Optimasi Suhu *Annealing*

3.4.2.1.1 Pembuatan Campuran Reaksi

Campuran reaksi terdiri atas 5 μ l ddH₂O, 10 μ l 5x *buffer* RT-PCR, 2 μ l dNTP 10 μ l, 10 μ l 5x *Q-solution*, 10 μ l primer *mix* (AE_p7F dan AE_p7R), 2 μ l enzim *mix*, dan 1 μ l RNase *inhibitor*. Sebanyak 8 μ l dari campuran reaksi diambil untuk selanjutnya ditambahkan dengan 2 μ l ddH₂O (digunakan sebagai kontrol negatif PCR). Cetakan DNA sebanyak 8 μ l dimasukkan ke dalam tabung yang berisi sisa campuran reaksi, kemudian dilakukan *aliquote* ke dalam 4 tabung PCR dengan volum masing-masing 10 μ l (Lampiran 3).

3.4.2.1.2 Reaksi *One-step* RT-PCR

Reaksi PCR dilakukan sebanyak 40 siklus. Kondisi *one-step* RT-PCR dapat dilihat pada lampiran 3. Reaksi PCR diawali dengan proses *reverse transcription* dengan suhu 50° C selama 30 menit. Tahapan denaturasi awal dilakukan pada suhu 95° C selama 15 menit. Tahapan selanjutnya adalah denaturasi pada suhu 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55° C; 57° C; 59° C; dan 60° C selama 1 menit, serta polimerisasi pada suhu 72° C selama 1 menit. Semua tahapan dilakukan sebanyak 39 siklus dan ketika mencapai 40 siklus, ditambahkan tahapan polimerisasi akhir pada suhu 70° C selama 10 menit.

3.4.2.1.3 Visualisasi Produk PCR

Produk PCR divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida 10%.

3.4.2.2 Amplifikasi Gen *gag p7* (nukleokapsid) berdasarkan Hasil Optimasi Suhu *Annealing*

3.4.2.2.1 Pembuatan Campuran Reaksi

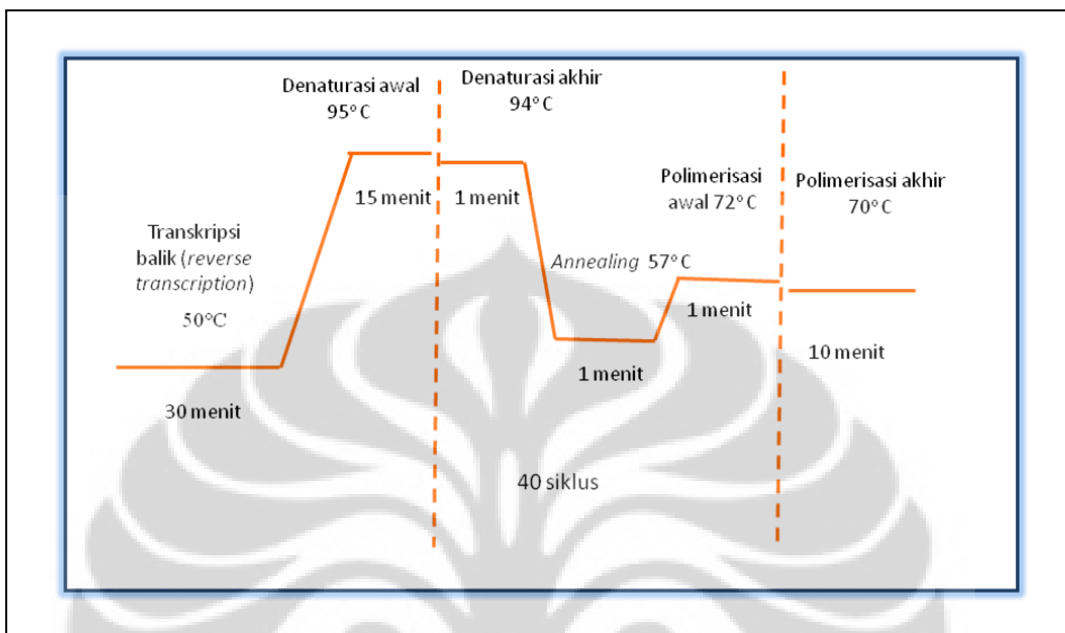
Campuran reaksi terdiri atas 7 μl ddH₂O, 14 μl 5x *buffer* RT-PCR, 2,8 μl dNTP 10 μl , 14 μl 5x *Q-solution*, 14 μl primer *mix* (AE_p7F dan AE_p7R), 2,8 μl enzim *mix*, dan 1,4 μl RNAse *inhibitor*. Sebanyak 8 μl dari campuran reaksi diambil untuk selanjutnya ditambahkan dengan 2 μl ddH₂O (digunakan sebagai kontrol negatif PCR). Cetakan DNA sebanyak 8 μl dimasukkan ke dalam tabung yang berisi sisa campuran reaksi, kemudian dilakukan *aliquote* ke dalam 6 tabung PCR dengan volum masing-masing 10 μl .

3.4.2.2.2 Reaksi *One-step* RT-PCR

Reaksi PCR dilakukan sebanyak 40 siklus. Gambaran kondisi *one-step* RT-PCR dapat dilihat pada gambar 3.4.2.2.2. Reaksi PCR diawali dengan proses *reverse transcription* dengan suhu 50° C selama 30 menit. Tahapan denaturasi awal dilakukan pada suhu 95° C selama 15 menit. Tahapan selanjutnya adalah denaturasi pada suhu 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 57° C selama 1 menit, serta polimerisasi pada suhu 72° C selama 1 menit. Semua tahapan dilakukan sebanyak 39 siklus dan ketika mencapai 40 siklus, ditambahkan tahapan polimerisasi akhir pada suhu 70° C selama 10 menit.

3.4.2.2.3 Visualisasi Produk PCR

Produk PCR divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida 10 %.



Gambar 3.4.2.2.2. Kondisi *One-step* RT-PCR

3.4.2.1.4 Pengukuran Konsentrasi DNA Produk PCR

Produk PCR diukur dengan menggunakan nanodrop 2000 *spectrophotometer*. Pengukuran diawali dengan membersihkan bagian alas tempat meletakkan *sample (pedestal)* menggunakan ddH₂O, kemudian dilakukan pengukuran *blank*. *Blank* yang digunakan adalah *elusion buffer* 1/3 EB sebanyak 2 µl, kemudian klik *measurement* pada *software* PC. Setelah pengukuran *blank*, dilakukan pengukuran *sample* DNA produk PCR sebanyak 2 µl, kemudian klik *measurement* pada *software* PC. Sebelum mesin dimatikan, *pedestal* dibersihkan kembali menggunakan ddH₂O.

3.4.3 Purifikasi Produk PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan berdasarkan protokol QIAGEN (2008: 12--14). Tahapan purifikasi DNA produk PCR diawali dengan mengambil 30 µl DNA produk PCR, ditambahkan 5 µl *loading dye* untuk selanjutnya di elektroforesis pada media gel *Low Melted Agarose* (LMA) 1,2 % selama 2,5 jam pada voltase 50 volt, kemudian gel LMA 1,2 % direndam dalam larutan Etidium Bromida (EtBr) selama 30 detik, di *destaining* dalam larutan 1x TAE selama 30 detik. Visualisasi gel LMA 1,2 % dilakukan menggunakan sinar UV. Gel LMA 1,2 % yang mengandung DNA spesifik, kemudian dipotong dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml.

Gel tersebut ditimbang, kemudian ditambahkan berturut-turut dengan *buffer* QX I, 10 µl QIAEX II, dan 10 µl Natrium Asetat, kemudian campuran diinkubasi pada suhu 50° C selama 40 menit, dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang, residu dicuci dengan 500 µl QX I, divorteks, kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang, residu dicuci dengan 500 µl PE(+EtOH), kemudian divorteks, dan disentrifus kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Pencucian residu dengan 500 µl PE(+EtOH) dilakukan sebanyak 2x, kemudian di elusi dengan 1/3 EB sebanyak 20 µl, divorteks, dan diinkubasi pada suhu 50° C selama 10 menit. Sentrifugasi dilakukan kembali dengan kecepatan 12.000 rpm, selama 1 menit, supernatan dipindahkan ke tabung eppendorf baru 1,5 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 50° C selama 30 menit.

3.4.3.1 Visualisasi Produk Purifikasi PCR

Produk purifikasi PCR divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida 10%.

3.4.3.2 Pengukuran Konsentrasi DNA Produk Purifikasi

Produk purifikasi DNA diukur dengan menggunakan nanodrop 2000 *spectrophotometer*. Pengukuran diawali dengan membersihkan bagian alas tempat meletakkan *sample (pedestal)* menggunakan ddH₂O, kemudian dilakukan pengukuran *blank*. *Blank* yang digunakan adalah *elusion buffer 1/3 EB* sebanyak 2 µl, kemudian klik *measurement* pada *software PC*. Setelah pengukuran *blank*, dilakukan pengukuran *sample* DNA produk purifikasi DNA sebanyak 2 µl, kemudian klik *measurement* pada *software PC*. Sebelum mesin dimatikan, *pedestal* dibersihkan kembali menggunakan ddH₂O.



BAB 4

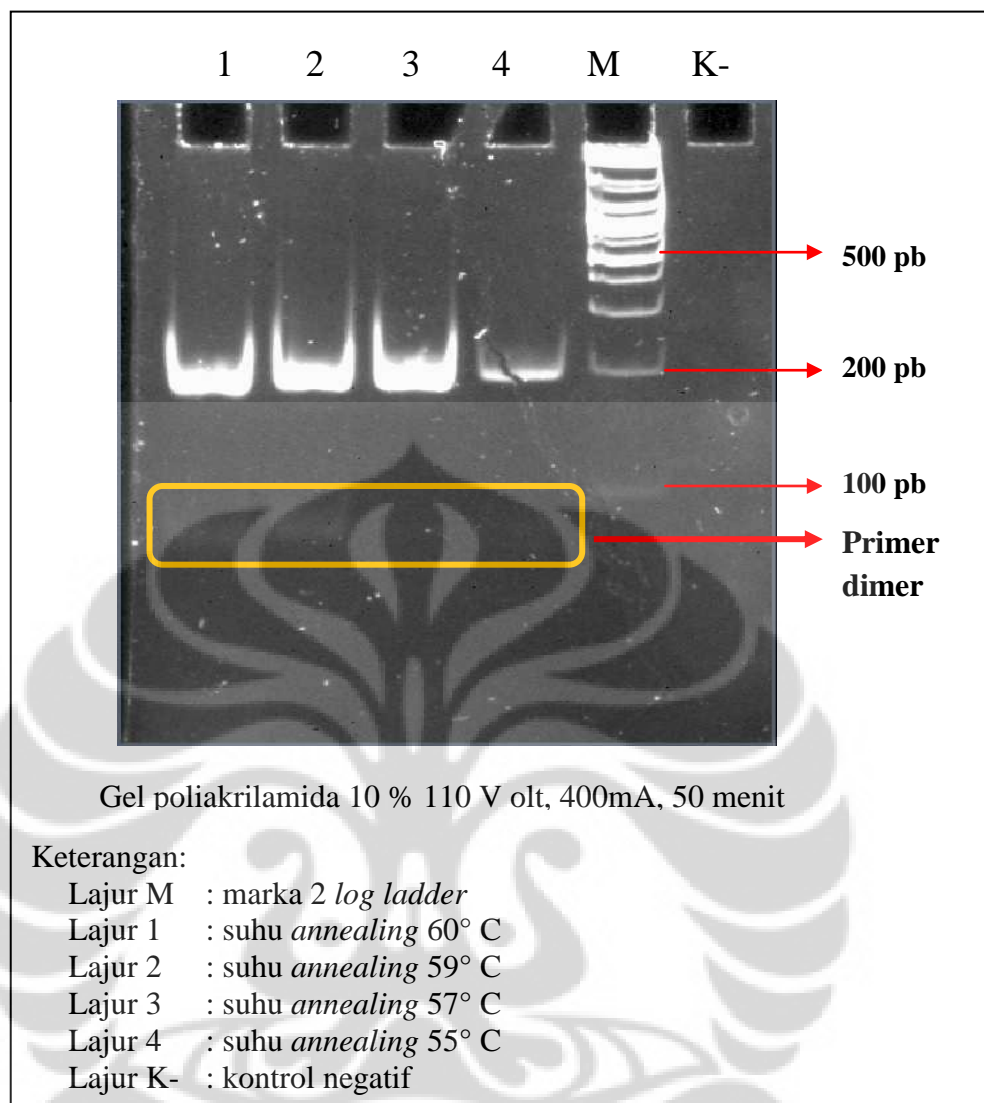
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Optimasi dan Amplifikasi Gen *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1 Subtipe CRFO1_AE

Hasil visualisasi optimasi suhu *annealing* (Gambar 4.1 (1)) dan pengukuran densitas pita DNA (Tabel 4.1) menunjukkan bahwa pada suhu 57° C terbentuk pita DNA yang paling tebal dibandingkan dengan variasi suhu lainnya (55° C; 59° C; dan 60° C) dengan panjang pita DNA 210 pb. Penggunaan variasi suhu *annealing* tersebut dilakukan secara *gradient* saat proses PCR untuk menentukan suhu *annealing* yang optimal (Prezioso & Jahns 2000: 2).

Kontrol negatif PCR hasil visualisasi optimasi (Gambar 4.1 (1), lajur K-) tidak menunjukkan adanya pita DNA, hal tersebut mengindikasikan bahwa tidak adanya kontaminasi selama pembuatan campuran reaksi PCR. Suhu *annealing* yang digunakan dalam proses optimasi ditentukan mulai dari 3°--5° C di bawah *melting temperature* (suhu T_m) primer (QIAGEN 2010: 18). Suhu T_m pada setiap primer (AE_p7F dan AE_p7R) dalam penelitian dapat dilihat pada lampiran 3. Hasil perhitungan menunjukkan suhu T_m pada tiap primer adalah 56,7° C dan 67,8° C. Berdasarkan hasil tersebut, variasi suhu *annealing* yang digunakan dalam optimasi adalah 55°--60° C.

Hasil visualisasi optimasi (Gambar 4.1 (1)) menunjukkan bahwa suhu *annealing* yang digunakan dalam proses optimasi masih belum optimal untuk mengamplifikasi fragmen gen *gag p7* karena masih terdapat primer dimer. Hal tersebut dapat disebabkan oleh rancangan primer yang kurang tepat yaitu primer saling berkomplemen dengan pasangan primer lainnya, sehingga oligonukleotida akan mengalami kesulitan untuk menempel pada DNA target, dan juga dapat menyebabkan ujung 3' dari primer untuk membentuk struktur *hairpin* (Sambrook & Russell 2001b: 8.14).



Gambar 4.1 (1). Optimasi Suhu *Annealing* untuk Amplifikasi Fragmen gen *gag p7*

Tabel 4.1. Hasil Pengukuran Densitas pada Pita DNA Target

Suhu <i>annealing</i>	Nilai Densitas Pita (piksel)
60° C	179.371,71
59° C	197.392,60
57° C	223.085,50
55° C	95.294,57

Faktor yang perlu diperhatikan saat optimasi PCR selain suhu *annealing* adalah rancangan primer (Weissensteiner *dkk.* 2004: 65). Primer merupakan komponen penting dalam proses PCR sehingga harus dirancang secara spesifik. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *gag p7* (nukleokapsid) adalah primer AE_p7F (5'-ATG TGG ATC CAT GCA GAG AGG CAA TTT TAA GG-3') dan primer AE_p7R (5'-CGG CGG ATC CCC CGG GTT AAT TAG CCT GTC TCT CAG TGC-3'). Kedua primer tersebut dirancang oleh kelompok peneliti IHVCB-UI berdasarkan sekuen kompendium HIV. Pada saat melakukan perancangan primer ditambahkan sekuen pengenalan enzim restriksi *Bam*HI dan *Sma*I pada ujung 5' dikarenakan kedua enzim tersebut tidak akan memotong fragmen gen yang akan diklonasi dan juga telah disesuaikan dengan situs pengklonasi pada vektor (Walker & Gaastra 1983: 202).

Primer AE_p7F memiliki panjang 32 nukleotida yang terdiri atas 22 nukleotida primer, 6 nukleotida untuk situs pengenalan enzim restriksi *Bam*HI dan 4 nukleotida tambahan, sedangkan primer AE_p7R memiliki panjang 39 nukleotida yang terdiri atas 23 nukleotida primer, 6 nukleotida untuk situs pengenalan enzim restriksi *Bam*HI, 6 nukleotida untuk situs pengenalan enzim restriksi *Sma*I, dan 4 nukleotida tambahan. Primer yang terlalu pendek dapat menyebabkan primer sulit untuk menempel pada cetakan, sedangkan primer yang terlalu panjang dapat menyebabkan hasil amplifikasi yang tidak spesifik. Umumnya, panjang primer yang digunakan berkisar 18--25 nukleotida (Elion 1997: 4 ; Sambrook & Russell 2001b: 8.14).

Primer AE_P7F memiliki kandungan GC sebesar 43,75 %, sedangkan primer AE_P7R memiliki kandungan GC sebesar 61,54 %. Kandungan GC pada primer dapat memengaruhi suhu denaturasi karena semakin tinggi kandungan GC pada primer, maka suhu denaturasi akan semakin tinggi. Hal tersebut berkaitan dengan ikatan hidrogen antara basa sitosin (C) dan basa guanin (G) yang memiliki tiga ikatan hidrogen. Kandungan GC yang baik pada primer sebaiknya berada pada kisaran 40--60 % (Sambrook & Russell 2001b: 8.8).

Enzim yang digunakan dalam reaksi PCR adalah enzim *mix* (*Omniscript*, *Sensiscript reverse transcriptase*, dan *Hotstartaq DNA polymerase*). Enzim *omniscript* dan *sensiscript reverse transcriptase* memiliki afinitas yang tinggi

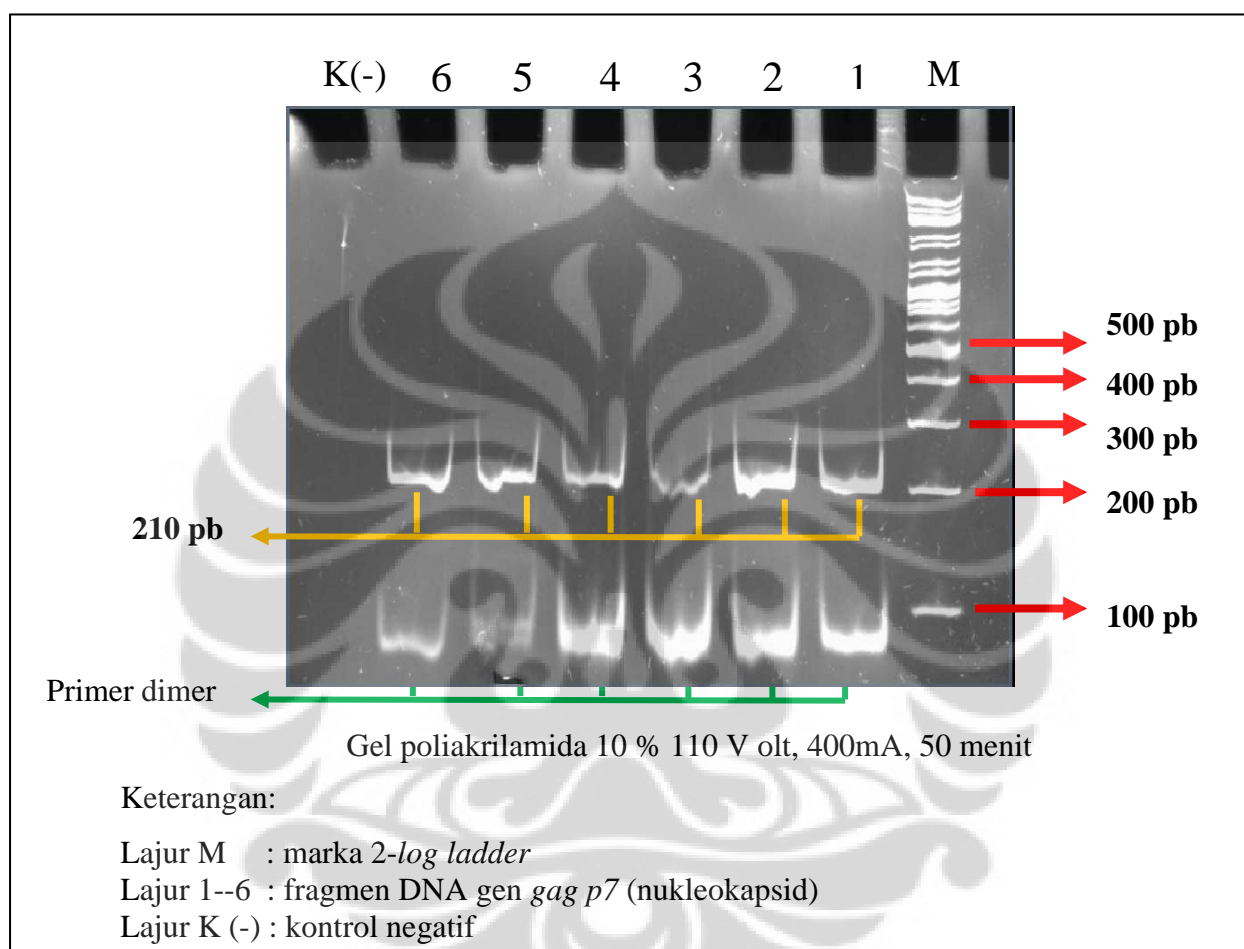
terhadap cetakan RNA yang memiliki kuantitas sebesar 1 pg--2 µg, sedangkan enzim *hotstartaq* DNA *polymerase* memiliki aktivitas *hot star* yang berarti enzim akan diaktifkan ketika suhu denaturasi mencapai suhu 95° C selama 15 menit. Enzim tersebut juga dapat meningkatkan spesifitas dan meningkatkan hasil PCR serta memiliki fungsi untuk menginaktivasi *reverse transcriptase* (QIAGEN 2010: 7).

Berdasarkan hasil optimasi suhu *annealing*, maka tahapan PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen *gag p7* diawali dengan tahapan *reverse transcription* pada suhu 50° C selama 30 menit dilanjutkan dengan denaturasi awal pada suhu 95° C selama 15 menit dan denaturasi akhir pada suhu 94° C selama 1 menit. Sambrook & Russell (2001b: 8.8--8.9), menyatakan bahwa denaturasi dapat dilakukan pada kisaran suhu 94--95° C, suhu denaturasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan primer sulit untuk menempel pada cetakan, sedangkan suhu denaturasi yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer berlekatan di berbagai tempat sehingga hasil PCR menjadi tidak spesifik (Rybicki 2001b: 1).

Tahap selanjutnya setelah denaturasi adalah *annealing* yang merupakan tahap menempelnya primer pada sekuen target. Suhu *annealing* berhubungan dengan nilai T_m dari primer yang dirancang, nilai T_m masing-masing primer adalah 56,7° C dan 67,8° C. Berdasarkan hasil optimasi suhu *annealing* yang diperoleh adalah 57° C. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penempelan primer pada cetakan menjadi kurang optimal, sedangkan suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer berlekatan tidak spesifik. Waktu yang dapat digunakan pada tahap *annealing* berkisar antara 30--60 detik (Sambrook & Russel 2001b: 8.8). Berdasarkan hasil visualisasi gen *gag p7* (nukleokapsid) pada gel poliakrilamida 10 %, ketebalan pita DNA tidak sama meskipun menggunakan campuran reaksi dan kondisi PCR yang sama. Hal demikian dikarenakan adanya kesalahan pada saat *pipetting* campuran reaksi PCR.

Tahapan setelah proses *annealing* adalah polimerisasi yang merupakan tahapan pemanjangan untai DNA. Polimerisasi berlangsung pada suhu 72° C selama 1 menit dilanjutkan dengan polimerisasi akhir pada suhu 70° C selama 10

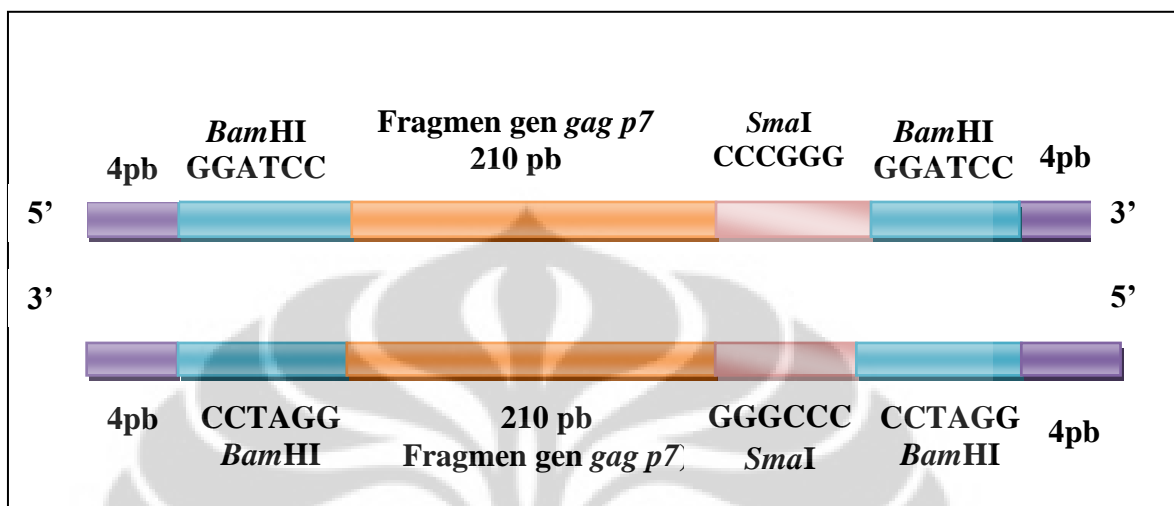
menit yang bertujuan untuk menyempurnakan proses pemanjangan untai DNA. Polimerisasi dapat berlangsung pada kisaran suhu 68--72° C. Jumlah siklus PCR yang digunakan dalam penelitian adalah 40 siklus. Jumlah siklus yang dapat digunakan berkisar antara 25--40 siklus (QIAGEN 2010: 14).



Gambar 4.1 (2). Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen *gag p7*

Hasil amplifikasi gen *gag p7* (nukleokapsid) divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida. Hasil visualisasi elektroforesis gel poliakrilamida 10% menunjukkan terbentuknya pita DNA berukuran sekitar 210 pb (Gambar 4.1 (2), lajur 1--6). Fragmen gen *gag p7* pada penelitian memiliki ukuran 184 pb (Kuiken 2009: 43--44). Namun, ukuran produk amplifikasi fragmen gen *gag p7* menjadi bertambah besar karena telah

ditambahkan 26 basa yang terdiri atas 18 basa untuk situs pengenalan enzim restriksi dan 8 basa tambahan. Oleh karena itu, hasil positif produk amplifikasi gen *gag p7* adalah terbentuknya pita DNA berukuran 210 pb. Skema hasil amplifikasi gen *gag p7* dapat dilihat pada gambar 4.1 (3).



Gambar 4.1 (3). Skema Hasil Amplifikasi Gen *gag p7*

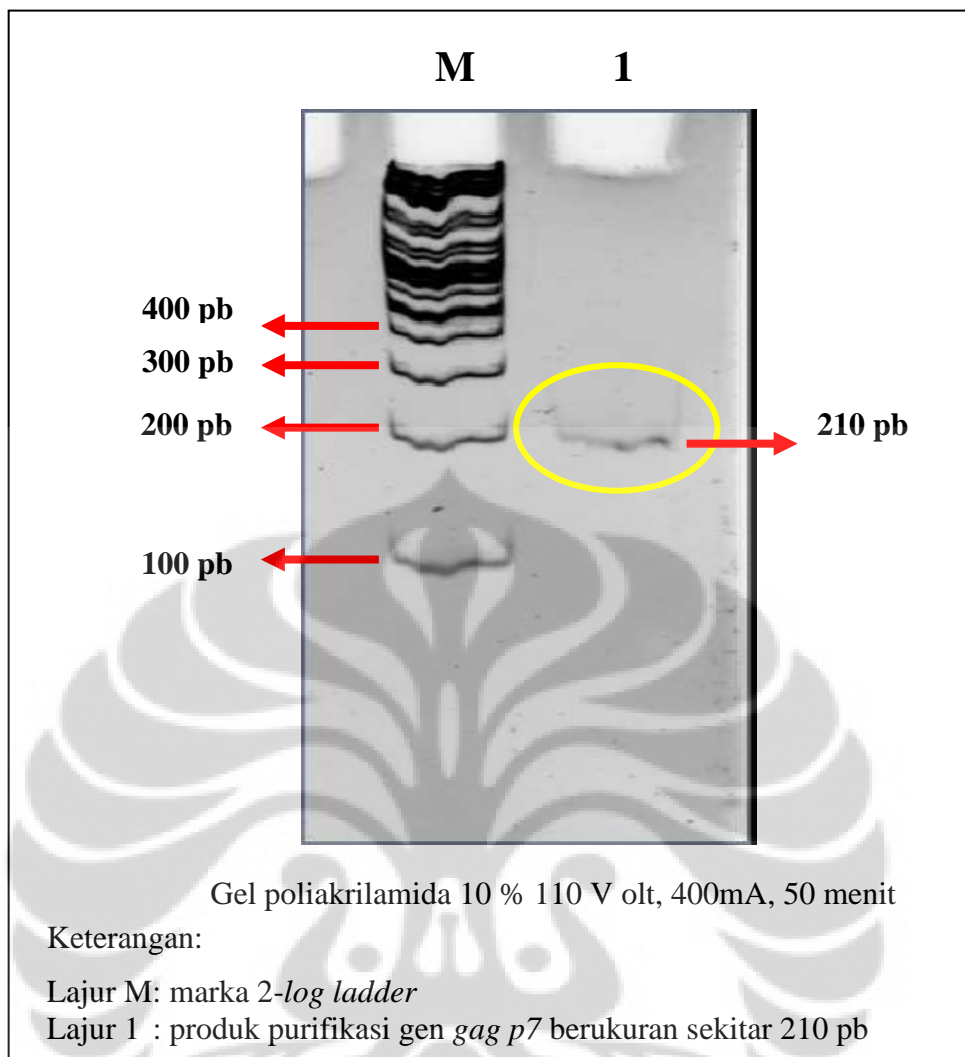
Hasil elektroforesis fragmen gen *gag p7* sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Chen *dkk.* (2007: 351--352) (Lampiran 5). Chen *dkk.* (2007: 351--352) telah berhasil mengamplifikasi fragmen gen *gag p7* dan 15 gen HIV-1 lain yang berasal dari pNL4-3 subtype B dengan metode PCR. Gen *gag p7* (nukleokapsid) yang berukuran 210 pb diperoleh dengan cara membandingkan pita DNA pada marka 2-log ladder yang telah diketahui ukurannya. Hasil visualisasi pada kontrol negatif PCR tidak menunjukkan adanya pita DNA, hal tersebut mengindikasikan bahwa tidak adanya kontaminasi selama pembuatan campuran reaksi PCR. Hasil amplifikasi produk PCR diukur menggunakan *ThermoScientific Nanodrop 2000 Spectrophotometer* sebesar 595,5 ng/ μ l. Gen *gag p7* yang telah teramplifikasi masih belum spesifik karena rancangan primer masih menimbulkan primer dimer pada ujung 3', sehingga dilakukan purifikasi DNA dari gel agarosa.

4.2 Visualisasi dan Analisis Panjang Sekuen Produk PCR Gen *gag p7* berdasarkan Metode Kurva Standar

Hasil visualisasi pada gel poliakrilamida 10 % menunjukkan bahwa gen *gag p7* bermigrasi hampir sejajar dengan marka 200 pb. Berdasarkan marka DNA, gen *gag p7* memiliki panjang ~210 pb. Analisis panjang sekuen produk PCR gen *gag p7* dilakukan menggunakan kurva standar panjang molekul marka DNA. Kurva standar merupakan korelasi antara nilai *Retention factor* (Rf) dan nilai logaritma panjang molekul marka DNA (Gallagher 1995: 10.1.30). Berdasarkan kurva standar panjang molekul marka DNA (Lampiran 6), diperoleh persamaan garis linear $y = -2,889x + 3,554$ dengan nilai $R^2 = 0,934$. Hasil analisis (Lampiran 7) menunjukkan bahwa gen *gag p7* memiliki panjang 209,120 pb \approx 210 pb.

4.3 Purifikasi Hasil Amplifikasi Gen *gag p7* (nukleokapsid)

Produk amplifikasi PCR dipurifikasi dari gel agarosa 1,2% dengan menggunakan QIAEX II *gel extraction kit* berdasarkan protokol QIAGEN (2008: 12--14). Hasil visualisasi DNA pada gel poliakrilamida 10 %, terbentuk pita DNA yang tipis berukuran sekitar 210 pb (Gambar 4.3). Hal tersebut menunjukkan bahwa produk PCR berhasil dipurifikasi. Purifikasi DNA menggunakan QIAEX II *gel extraction kit* untuk menghilangkan primer dimer dan mendapatkan DNA yang spesifik. Produk purifikasi selanjutnya diukur menggunakan *ThermoScientific Nanodrop 2000 Spectrophotometer* sebesar 85,6 ng/ μ l dan perhitungan DNA *recovery* sebesar 9,6 %. Menurut Iznaga *dkk.* (2007: 42--43), proses purifikasi dapat mengurangi konsentrasi DNA karena campuran seperti protein, lipid, dan sisa reaksi enzimatik dipisahkan dari DNA, sehingga DNA menjadi murni namun konsentrasi DNA berkurang.



Gambar 4.3. Hasil Elektroforesis Produk Purifikasi

Penurunan konsentrasi DNA yang tajam dari hasil amplifikasi dan purifikasi dikarenakan pada saat pemberian *buffer* QXI tidak berada pada kondisi pH yang optimal. Hal tersebut dapat diketahui dari indikator warna QX I yang berwarna oranye dengan pH >7.5, sedangkan pH optimal *buffer* QX I < 7.5 yang ditandai dengan warna kuning. Perubahan indikator warna pH QX I tidak terlalu signifikan sehingga perubahan warna yang mengindikasikan perubahan pH tersebut seringkali tidak disadari. Perubahan pH *buffer* yang semakin tinggi menyebabkan pengikatan DNA oleh partikel silika QIAEX II menjadi tidak efisien (QIAGEN 2008: 10--11). Perubahan pH *buffer* dapat disebabkan oleh udara di luar yang terlalu sering kontak langsung dengan *buffer*. Hal tersebut

dapat diatasi dengan meng-*aliquot buffer*, sehingga *stock buffer* tidak terlalu sering terpapar oleh udara di luar saat pembukaan dan penutupan tutup botol *buffer*.

Faktor lain yang menyebabkan penurunan konsentrasi DNA adalah proses pencucian (*washing*) yang kurang sempurna selama proses purifikasi. Prinsip dasar purifikasi dengan QIAEX II *gel extraction kit* adalah absorpsi asam nukleat oleh partikel-silika QIAEX II pada lingkungan berkadar garam tinggi. Proses purifikasi menggunakan *buffer QX I* yang memiliki kadar garam tinggi, sehingga partikel QIAEX II dapat mengikat DNA. Selain hal tersebut, *buffer QX I* juga membuat gel agarosa menjadi larut. Proses pencucian pada proses purifikasi dilakukan dua kali, yaitu menggunakan *buffer QX I* dan *buffer PE*. Tahap pencucian pertama menggunakan *buffer QX I* untuk menghilangkan pengotor berupa sisa gel agarosa, protein, dan lipid, sedangkan tahap pencucian kedua menggunakan *buffer PE* untuk menghilangkan sisa-sisa garam (QIAGEN 2008: 7-11).

Proses pembuangan *buffer QX I* yang masih meninggalkan sisa dan tahap pencucian menggunakan *buffer PE* yang tidak sempurna menyebabkan *buffer QX I* masih tersisa dengan garam-garam berkonsentrasi tinggi. Garam-garam yang tersisa menyebabkan lingkungan berkonsentrasi garam tinggi saat elusi DNA, sehingga masih banyak DNA yang tertahan pada partikel QIAEX II, oleh karena hal tersebut, hasil elusi DNA tidak optimal dan konsentrasi DNA berkurang (QIAGEN 2008: 20).

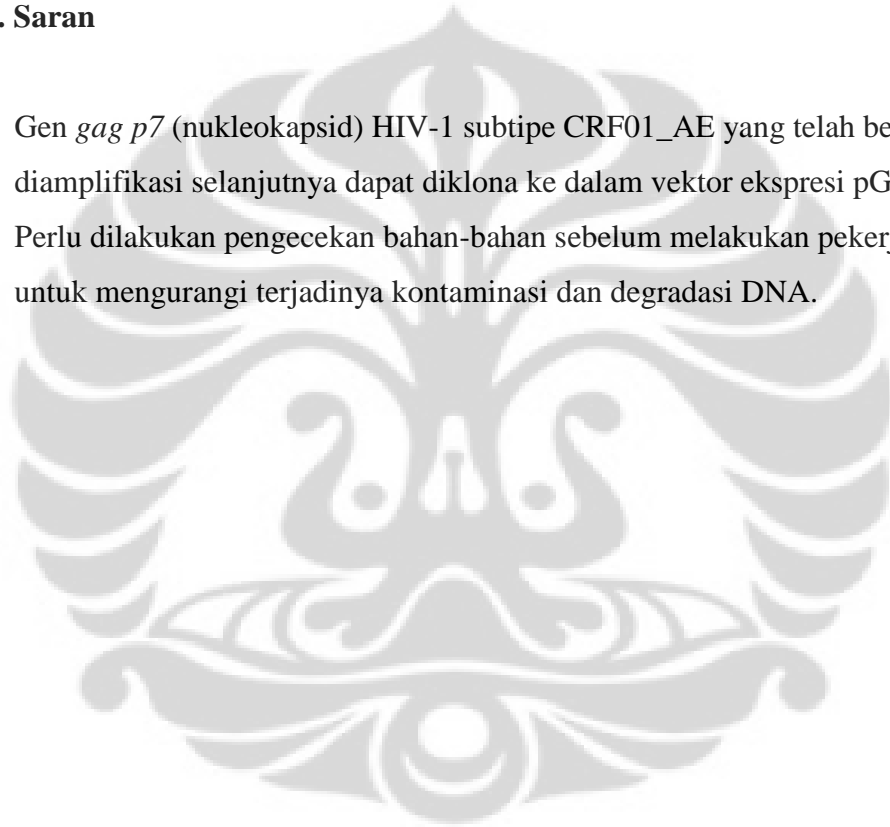
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Gen *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1 sub tipe CRF01_AE berhasil diamplifikasi dengan teknik RT-PCR.

5.2. Saran

1. Gen *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1 sub tipe CRF01_AE yang telah berhasil diamplifikasi selanjutnya dapat diklona ke dalam vektor ekspresi pGEX-6P1.
2. Perlu dilakukan pengecekan bahan-bahan sebelum melakukan pekerjaan untuk mengurangi terjadinya kontaminasi dan degradasi DNA.



DAFTAR ACUAN

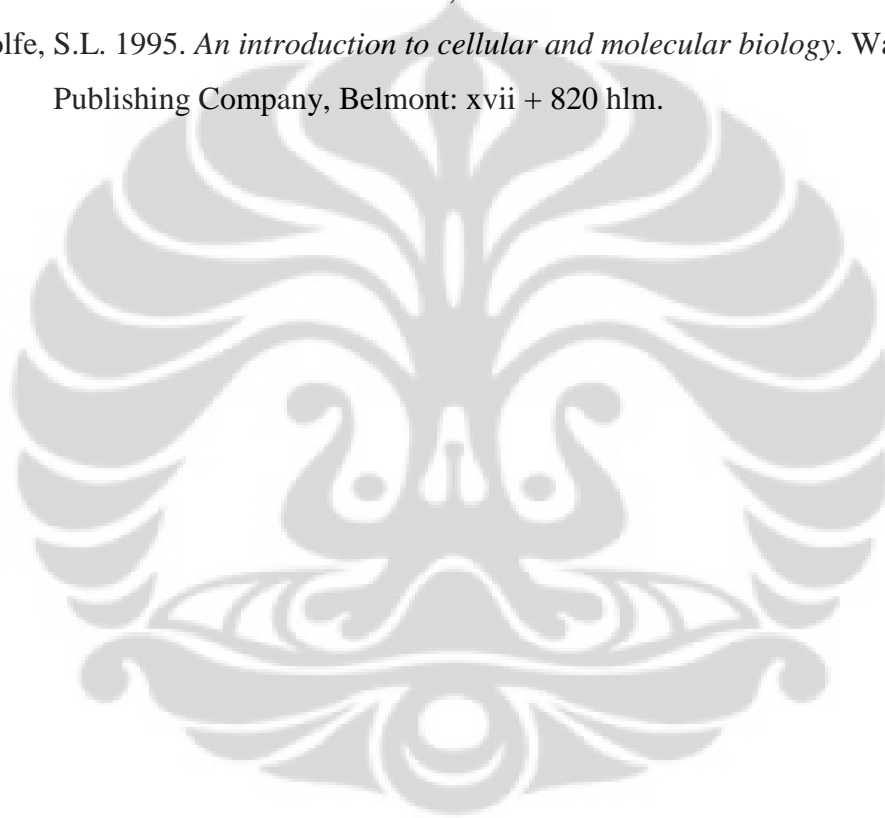
- Abbas, A.K. & A.H. Lichtman. 2007. *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. Elsevier Inc., Philadelphia: 566 hlm.
- Ausubel, F.M., R.Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 1990. *Current protocols in molecular biology*. Volume I. John Wiley & Sons, Inc., New York: xx + 1.0.1--9.9.3.
- Baar, M.P., K.H.M. Horn, J. Goudsmit, A. Ronde, & F. Wolf. 1999. Detection of human immunodeficiency virus type I nucleocapsid protein p7 in vitro and in vivo. *Journal of Clinical Microbiology* **37** (1): 63--67.
- Basrur, V., Y.Song, S.J. Mazur, Y.Higashimoto, J.A. Turpin, W.G Rice, J.K. Inman, & E. Appella. 2000. Inactivation of HIV-1 nucleocapsid protein p7 by pyridinioalkanoyl thioesters. *Journal of Biological Chemistry* **275** (20): 14890--14897.
- Biowiki. 2007. HIV genomes. 1 hlm.
<http://biowiki.org/HIVFitnessLandscapeLabMeeting>, 04 Agustus 2010, 17.56.
- Brookscole. 2010. The HIV life cycle. 1 hlm.
http://www.brookscole.com/chemistry_d/templates/student_resources/003022318, 04 Agustus 2010, 17.00.
- Caprette, D.R. 2005. Principle of spectrophotometry. 19 Mei 2005: 1 hlm.
<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/spectrophotometer.html>, 28 Mei 2010, pk. 20.30.
- Chen, H., Z. Xu, X. Yin, & P. Cen. 2007. Cloning and expression of the HIV protein in *Escherichia coli* cell-free system. *Applied Microbiology Biotechnology* **77**: 347--354.
- Chugh, P. 2003. Cloning of gag gene of HIV-1 subtype C (Indian strain) into a mammalian expression vector and in vitro expression studies. *Indian Journal of Medical Microbiology* **21** (2): 77--81.
- Clercq, E.D. 1997. Antiviral metal complexes. *Rega Institute for Medical Research* **4** (3): 173--192.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2010. Jumlah kumulatif penderita AIDS di Indonesia 18.442 kasus. 1 hlm.
<http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/449-jumlah-kumulatif-penderita-aids-di-indonesia-18442-kasus.html>, 13 April 2010, 14.45.
- Druillenec, S. A. Caneparo, H. de Rocquigny, & B.P. Roques. 1999. Evidence of interactions between the nucleocapsid protein NCp7 and the reverse transcriptase of HIV-1. *The Journal of Biological Chemistry* **274** (16): 11283-11288.
- Elion, E.A. 1997. Constructing recombinant DNA molecules by the polymerase chain reaction. (?): 7 hlm. <http://www.does.org/master/cpmb0317.htm>. 14 April 2011, pk. 2045.
- Fairbanks, D.J & W.R. Andersen. 1999. *Genetics the continuity of life*. Wadsworth Publishing ompany, New York: xiii + 438 hlm.
- Fatchiyah. 2006. Gel elektroforesis. 6 hlm.
<http://inherent.brawijaya.ac.id/biomol/materi/midterm/GEL%20ELEKTROFORESIS-fat.doc>. 25 Desember 2009, 12.00.
- Gallagher, S. 1995. *One-Dimensional SDS gel electrophoresis of protein*. Dalam: Coligan, J.E., B.M. Dunn, D.W. Speicher, & P.T. Wingfield. 2004. *Current Protocol in Protein Science Volume 3*. John Wiley & Sons, Inc., Washington : 10.1.1—10.1.34
- Hunt, R. 2009. Human immunodeficiency virus and AIDS. 14 September 2009: 1 hlm. <http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/hiv9.htm>, 12 Januari 2010, 15.00.
- Iznaga, A.B., M.C. Frontera, J.R. Uramis, J.B.T. Gonzales & Y.M. Gonzales. 2007. DNA removal from a purification process of recombinant hepatitis B surface antigen. *Electronic Journal of Biotechnology* **10**(1): 37--47.
- KimI, J., A. Roberts1, H. Yuan, Y. Xiong, & K.S. Anderson. 2012. Nucleocapsid protein annealing of a primer template enhances (+)-strand DNA synthesis and fidelity by HIV-1 reverse transcriptase. 3 Februari. *Journal of Molecular Biology* **415**(5): 866--880.

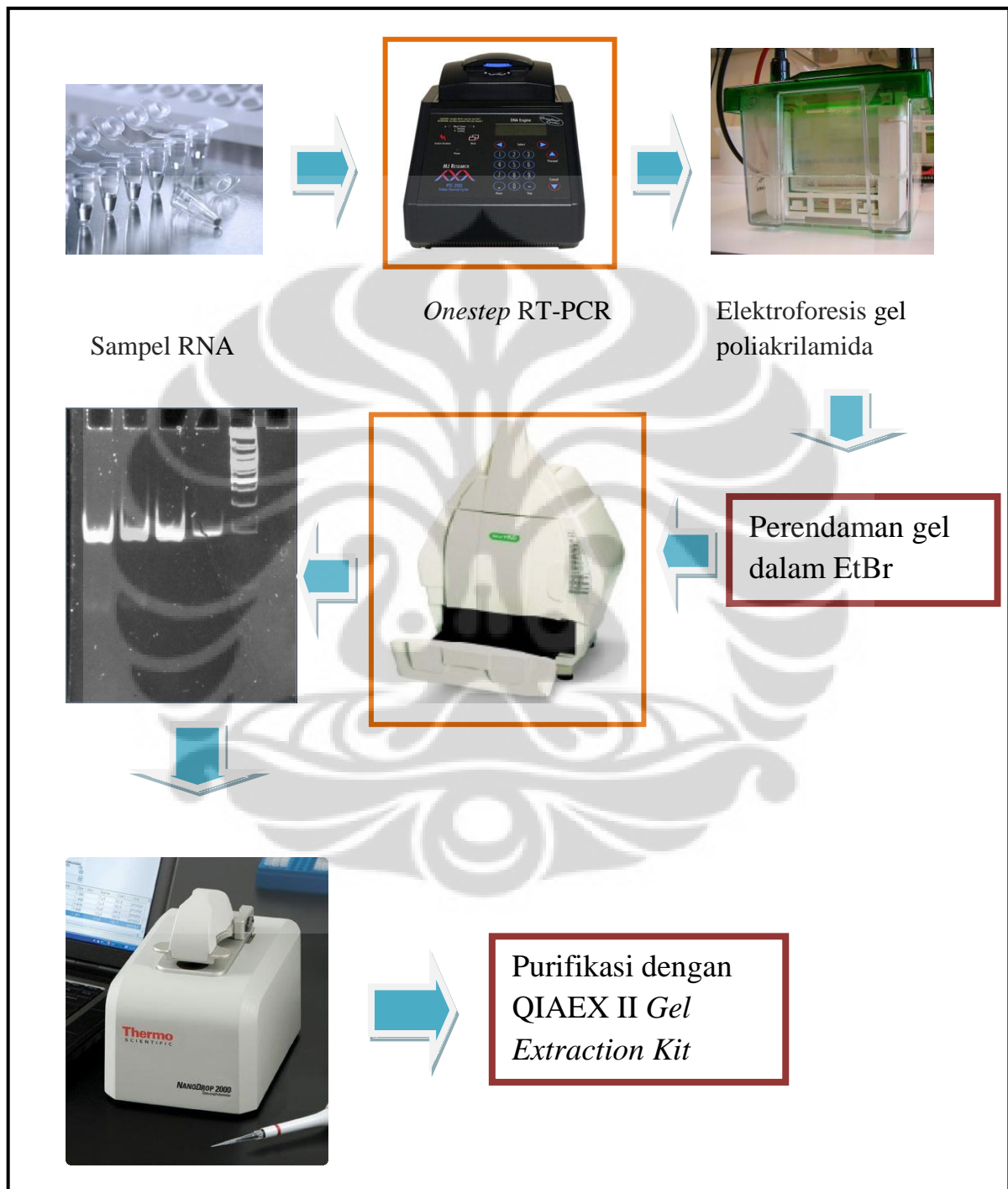
- Kuiken, C., B. Foley, P. Marx, S. Wolinsky, T. Leitner, B. Hahn, F. McCutchan, & B. Korber. 2009. HIV sequence compendium. <http://www.hiv.lanl.gov/>, 11 Maret 2010, 15.10.
- Los Alamos National Laboratory. 2009b. The circulating recombinant forms (CRFs). 29 September: 31 hlm. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>. 4 Oktober 2010, pk. 16.30.
- Macpherson, J.L., J.A. Ely, L.Q. Sun & G.P. Symonds. 1999. Ribozymes in gene therapy of HIV-1. *Frontiers in Bioscience* 4 (?): 497--505.
- McCutchan, F.E., & H.M. Jackson. 2003. HIV-1 global distribution. 1 hlm. <http://www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/aids/atlas/clade.html>, 03 Agustus 2010, 16.00.
- Merati, T.P., C. Ryan, S. Turnbull, D.N. Wirawan, B. Otto, I.M. Bakta, & S. Crowe. 2009. Subtipe HIV-1 di beberapa daerah di Indonesia dan perannya sebagai petunjuk dinamika epidemi HIV. 25 hlm. http://www.e_journal_tuti_parwati.pdf, 27 Januari 2010, 16.00.
- Morikawa, Y. 2003. HIV capsid assembly. *Current HIV Research* 1: 1--14.
- Musah, R. A. 2004. The HIV-1 nucleocapsid zinc finger protein as a target of antiretroviral therapy. *Current Topics in Medical Chemistry*, 4: 1605--1622.
- Nazari, R. 2008. RNA and DNA inactivation strategies to prevent or inhibit HIV-1 replication via gene therapy. *University of Toronto*, 190 hlm.
- NCBI. 2006. Resistance to protease inhibitor. 1 hlm. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=antiretro&part=A177&rendertype=figure&id=A179>, 03 Agustus 2010, 16.15.
- NCBI. 2009. Retrovirus genomes. 1 hlm. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/retroviruses/>, 12 April 2012, 17.45.
- Nester, E.W., D.G. Anderson, C.E. Roberts & M.T. Nester. 2007. *Microbiology: A human perspective*. 5th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York: xxxviii + 811 hlm.
- Pavlakakis, G.N. 1997. *The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1*. Dalam: Vita, V.T., S. Hellman & S.A. Rosenberg. (Ed.). 1997.

- AIDS: Biology, diagnosis, treatment and prevention*. 4th ed. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia: 746 hlm.
- Prezioso, V.R. & A. Jahns. 2000. Using gradient PCR to determine the optimum annealing temperature. 27 Maret: 4 hlm.
<http://www.bioresearchonline.com/article.mvc/Using-Gradient-to-Determine-the-Optimum-A-0001?VNETCOOKIE=NO>, 1 Mei 2011, 17.15.
- QIAGEN. 2008. QIAEX II[®] Handbook. Oktober: 24 hlm.
http://www.QIAEX_II_Handbook.pdf, 03 Agustus 2010, 17.00.
- QIAGEN. 2010. QIAGEN[®] OneStep RT-PCR kit handbook. Oktober: 44 hlm.
http://www.QIAGEN_OneStep_RT-PCR_Kit_Handbook.pdf . 8 September 2011, pk. 14.50.
- Riybicki, E.P. 2001b. Molecular biology techniques manual: PCR primer design and reaction optimization. 7 hlm.
<http://bric.postech.ac.kr/myboard/read.php?id=1843&Board=protocol>, 28 Agustus 2011, 16.50.
- Sambrook, J. & D.W. Russel 2001b. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol 2. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 8.1--14.53 hlm.
- Seidman, L. & J. Mowery. 2006. UV spectrophotometry of DNA, RNA, and proteins. 25 September: 9 hlm.
http://matcmadison.edu/biotech/resources/methods/labManual/unit_4/exercise_15.htm. 28 April 2011, pk.14.42 wib.
- Sinoussi, F.B. 1996. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* **348**: 31--35.
- Stephen, A.G., A. Rein, R.J. Fisher & R.H., Shoemaker. 2003. *The nucleocapsid protein as a target for novel anti-HIV drugs*. SAIC-Frederick & National Cancer Institute, USA: 33--36 hlm.
- Stowell, D. 2006. HIV genom. 1 hlm.
<http://www.mclld.co.uk/hiv/?q=HIV%20genome>, 03 Agustus 2010, 16.20.
- Strachan, T. & A.P. Read. 1999. *Human molecular genetics 2*. 2nd ed. A John Wiley & Sons, Inc., New York: xxiii + 576 hlm.

- Voyles, B.A. 2002. *The biology of viruses*. 2nd ed. The McGraw-Hill Companies, Boston: xv + 408 hlm.
- Walker, J.M. & W. Gaastra. 1983. *Techniques in molecular biology*. Croom Helm, London: 333 hlm.
- Wang, W.K., M.Y. Chen, C.Y. Chuang, K.T. Jeang, & L.M Huang. 2000. Molecular biology of human immunodeficiency virus type I. *Journal Microbiology Immunology Infection* **33**: 131--140.
- Weissensteiner, T., H.G. Griffin & A. Griffin. 2004. *PCR technology current innovation*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton: 392 hlm.
- Wolfe, S.L. 1995. *An introduction to cellular and molecular biology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont: xvii + 820 hlm.



Lampiran 1
Bagan Cara Kerja Penelitian



Lampiran 2
Pembuatan Larutan dan *Buffer*

Larutan dan <i>buffer</i>	Komposisi	Cara pembuatan
Tris Acetic Acid EDTA (TAE) 50X	<i>Tris base</i> 121 g EDTA 18,6 g Asam asetat glasial 28,55 ml Akuades 500 ml	Semua bahan dicampur kemudian dihomogenkan dengan <i>magnetic stirrer</i> dan diautoklaf pada suhu 121° C, 2 atm, selama 20 menit.
Tris Acetic Acid EDTA (TAE) 1X	TAE 50X 40 ml Akuades	<i>Buffer</i> TAE dilarutkan dengan akuades hingga 2000 ml.
Gel <i>Low Melted</i> Agarose (LMA) 1,2 %	Bubuk LMA 1,2 g TAE 1X	Sebanyak 1,2 g bubuk LMA dilarutkan dengan TAE 1X hingga mencapai volume 100 ml, kemudian dihomogenkan dengan <i>magnetic stirrer</i> .

[Sumber: Sambrook & Russel 2001: A1.1--A2.12.]

Lampiran 3
Campuran Reaksi *Onestep* RT-PCR

Komponen	Volume (μ l) 1x reaksi
5x buffer RT-PCR	2
dNTP 10 mM	0.4
5x Q-solution	2
Primer mix	2
QIAGEN <i>Onestep</i> RT-PCR Enzim mix	0.4
RNase inhibitor	0.2
Distilled water (ddH₂O)	1
Template RNA	2
Volume total	10

[Sumber: QIAGEN 2010: 17]

Kondisi *One-step* RT-PCR

Tahapan siklus	Waktu (menit)	Suhu ($^{\circ}$ C)	Keterangan
Reverse transcription (RT)	30	50	Suhu 50 $^{\circ}$ C sangat direkomendasikan untuk proses RT. Namun, apabila tidak diperoleh hasil maka suhu bisa dinaikkan menjadi 60 $^{\circ}$ C.
Denaturasi awal	15	95	Enzim <i>HotstarTaq</i> DNA polymerase diaktifkan pada suhu 95 $^{\circ}$ C. Sedangkan enzim <i>omniscrypt</i> dan <i>sensicrypt reverse transcriptase</i> dinonaktifkan.
Denaturasi	1	94	
Annealing	1	57	Sekitar 5 $^{\circ}$ C dibawah nilai T _m primer
Polimerisasi	1	72	
Polimerisasi akhir	10	70	
Jumlah siklus	40		Jumlah siklus tergantung dari jumlah cetakan RNA dan target transkrip, biasanya dalam kisaran 25--40 siklus.

[Sumber: QIAGEN 2010: 14]

Lampiran 4

Perhitungan *Temperature Melting* (Tm) Primer AE_p7F dan AE_p7R

$$\begin{aligned}
 T_m &= \{81,5 + 16,6 \log_{10} [0,05] + 0,41 (\% G + \% C) - (675/N)\} \\
 &= \{(81,5 - 21,597098) + 0,41 (\% G + \% C) - (675/N)\} \\
 &= \{59,902902 + 0,41 (\% G + \% C) - (675/N)\}
 \end{aligned}$$

Tm primer AE_p7F

$$\begin{aligned}
 &= 59,902902 + 0,41 [(10/32 \times 100\%) + (4/32 \times 100\%)] - (675/32) \\
 &= 59,902902 + 0,41 (31,25 + 12,5) - 21,09375 \\
 &= 59,902902 + 0,41 (43,75) - 21,09375 \\
 &= 59,902902 + 17,9375 - 21,09375 \\
 &= 56,7^\circ \text{C}
 \end{aligned}$$

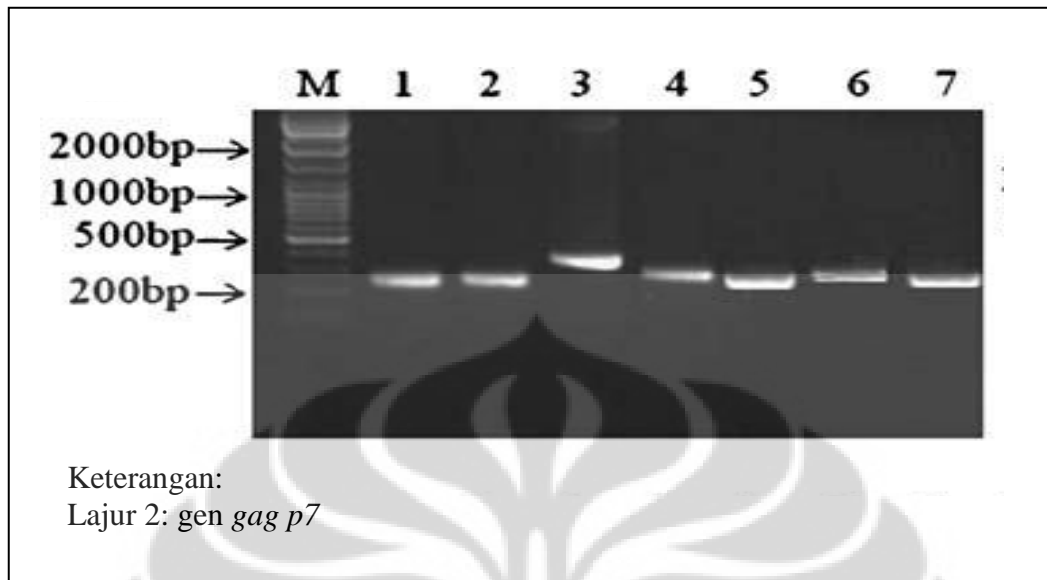
Tm primer AE_p7R

$$\begin{aligned}
 &= 59,902902 + 0,41 [(10/39 \times 100\%) + (14/39 \times 100\%)] - (675/39) \\
 &= 59,902902 + 0,41 (25,64 + 35,90) - 17,30769 \\
 &= 59,902902 + 0,41 (61,54) - 17,30769 \\
 &= 59,902902 + 25,2314 - 17,30769 \\
 &= 67,8^\circ \text{C}
 \end{aligned}$$

[Sumber: Sambrook & Russell 2001b: 8.15]

Lampiran 5

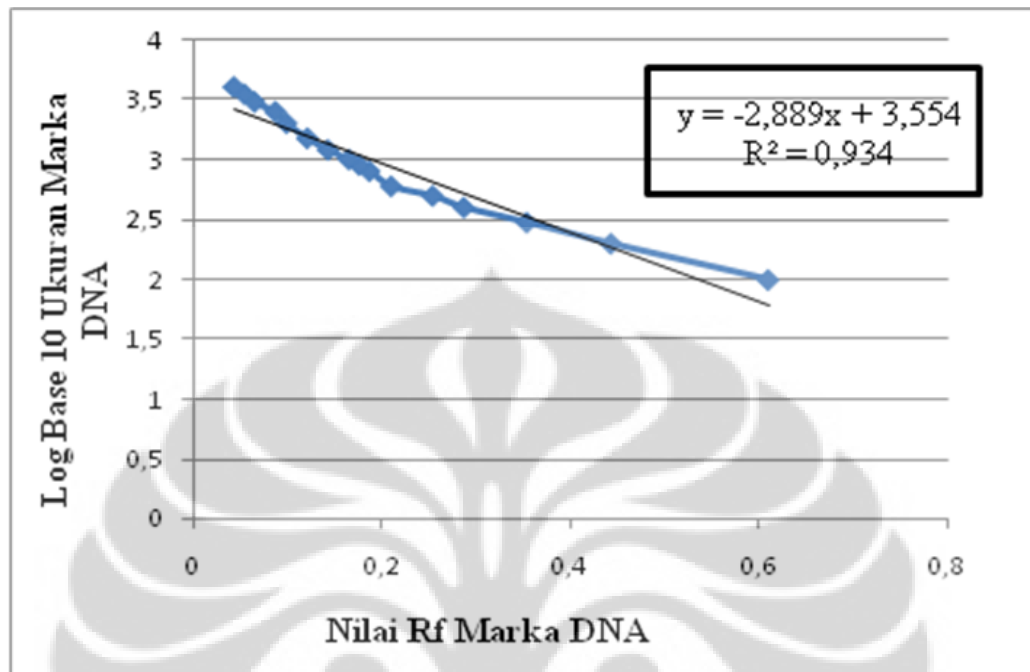
Hasil Elektroforesis Produk PCR Gen *gag p7* oleh Chen *dkk.*



[Sumber: Chen *dkk.* 2007: 351]

Lampiran 6

Kurva Standar Panjang Molekul Marka DNA



Lampiran 7

Perhitungan Panjang Sekuen Produk PCR Gen *gag p7*

Panjang Molekul (ML)Marka DNA standar (pb)	Nilai Rf (X)	Log base 10 dari ML (Y)
100	0,611	2
200	0,444	2,301
300	0,355	2,477
400	0,288	2,602
500	0,255	2,698
600	0,211	2,778
800	0,188	2,903
900	0,177	2,954
1000	0,166	3
1200	0,144	3,079
1500	0,122	3,176
2000	0,1	3,301
2500	0,088	3,397
3000	0,066	3,477
3500	0,055	3,544
4000	0,044	3,602

Jarak migrasi larutan = 9,0 cm

Rf sampel (x) = jarak migrasi sampel : jarak migrasi larutan

$$= 3,85 \text{ cm} : 9,0 \text{ cm} = 0,427$$

Kurva standar (Gambar 4.2) dari Rf (x) vs Log ML (y) menghasilkan persamaan

linear $y = -2,889x + 3,554$

Berdasarkan persamaan linear tersebut, maka diperoleh

$$\begin{aligned} Y (\text{Log ML}) &= -2,889 (0,427) + 3,554 \\ &= 2,320397 \end{aligned}$$

ML = anti-log 2,320397 = 209,120 pb.

Kesimpulan: gen *gag p7* (nukleokapsid) HIV-1 mempunyai panjang sebesar ~210 pb

